

·技术研究·

细胞内抗嗜肺军团菌药物有效浓度测定

朱翔, 毕筱刚, 席云, 张永标, 黄煌, 洗盈, 张扣兴*

(中山大学附属第三医院感染性疾病科, 广东广州 510630)

摘要:【目的】探讨红霉素、环丙沙星、左氧氟沙星、莫西沙星4种抗菌药物对细胞内嗜肺军团菌的抗菌活性。【方法】分别采用E-test法和有限稀释法测定上述4种药物对嗜肺军团菌ATCC 33152的细胞外抗菌活性,再用噻唑蓝比色法(MTT法)测定上述药物对嗜肺军团菌ATCC 33152的细胞内抗菌活性。【结果】细胞外抗菌活性E-test法:红霉素0.047 μg/mL、环丙沙星0.38 μg/mL、左氧氟沙星0.125 μg/mL、莫西沙星0.125 μg/mL;有限稀释法:红霉素0.125 μg/mL、环丙沙星0.03 μg/mL、左氧氟沙星0.016 μg/mL、莫西沙星0.016 μg/mL。4种药物的细胞内抗菌活性分别为:红霉素0.25 μg/mL、环丙沙星0.016 μg/mL、左氧氟沙星0.016 μg/mL、莫西沙星0.004 μg/mL。【结论】氟喹诺酮类药物在U937细胞模型中对嗜肺军团菌ATCC 33152具有很强的细胞内抗菌活性。其中莫西沙星的细胞内抗菌活性最强。MTT法是一种行之有效的用于检测药物对细胞内嗜肺军团菌抗菌活性的方法,可同时检测并对比各种药物样本的细胞内抗菌活性。

关键词: 嗜肺军团菌; U937细胞; 抗菌活性

中图分类号: R563.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-3554(2010)02-0282-06

Assay System for Antimicrobial Concentration of Drugs against Intracellular *Legionella Pneumophila*

ZHU Xiang, BI Xiao-gang, XI Yun, ZHANG Yong-biao, HUANG Huang, XIAN Ying, ZHANG Kou-xing
(Department of Infectious Disease, The Third Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China)

Abstract: 【Objective】 To explore the intracellular antimicrobial activities of erythromycin, ciprofloxacin, levofloxacin, moxifloxacin against *Legionella pneumophila*. 【Methods】 The minimum inhibition concentration (MIC) of each antibiotic was evaluated by E-test method and microdilution method respectively. The minimal extracellular concentration inhibiting intracellular multiplication (MIEC) of each antibiotic was evaluated by the MTT colorimetric assay system. 【Results】 The MIC concentration for each drug by E-test method were: erythromycin, 0.047 μg/mL; ciprofloxacin, 0.38 μg/mL; levofloxacin, 0.125 μg/mL; moxifloxacin, 0.125 μg/mL, the MIC concentrations for each drug by microdilution method were: erythromycin, 0.125 μg/mL; ciprofloxacin, 0.03 μg/mL; levofloxacin, 0.016 μg/mL; moxifloxacin, 0.016 μg/mL. The MIEC concentration for each drug were: erythromycin, 0.25 μg/mL; ciprofloxacin, 0.016 μg/mL; levofloxacin, 0.016 μg/mL; moxifloxacin, 0.004 μg/mL. 【Conclusions】 Fluoroquinolones have superior activity than erythromycin in U937 cells infected with *L. pneumophila*. Moxifloxacin is the most potent drug among the four tested antimicrobials. Our results indicated that the MTT assay system allows comparative and quantitative evaluations of the intracellular activities of antibiotics against *L. pneumophila* and efficient processing of a large number of samples.

Key words: *Legionella pneumophila*; U937 cells; antimicrobial activities

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2010, 31(2): 282-287; 292]

嗜肺军团菌(*Legionella pneumophila*, Lp)是一种兼性细胞内寄生菌,可在巨噬细胞和肺泡上皮

细胞内存活并繁殖,并能导致具有潜在致死性的社区获得性肺炎和医院获得性肺炎。凭借着在巨

收稿日期: 2009-09-26

基金项目: 广东省科技计划项目(2009B030801094)

作者简介: 朱翔,医学硕士,住院医师,E-mail:0628zhuxiang@163.com; 课题负责人:毕筱刚,医学硕士,副主任医师,E-mail:bxg65@163.com; * 通信作者:张扣兴,主任医师,E-mail:kxz6210@126.com

噬细胞内生长的特性, Lp 能够逃逸机体免疫防御作用。治疗 Lp 感染的关键是选用能在吞噬细胞内达到有效抑菌浓度的抗菌药物。红霉素曾被推荐用以治疗 Lp 感染, 但用红霉素治疗往往疗程长、副作用大。近年来, 有报道称氟喹诺酮类、新大环内酯类药物更适合治疗 Lp 感染且副作用更少^[1-2]。我们注意到, 必须将药物的细胞外抗菌活性测定(即 MIC 测定)和细胞内抗菌活性测定结合起来才能更准确的评估药物对 Lp 的临床疗效^[3]。然而在药物的细胞内抗 Lp 活性测定方面, 现有的试验方法常需耗费大量的时间和材料用于裂解细胞并将裂解液进行培养及计算菌落的个数^[4], 若要同时测定多种药物的细胞内抗 Lp 活性并对比其疗效时, 现有方法的缺点就更加明显。因此需要一种适于评价多种药物对细胞内 Lp 抗菌活性的方法。在本研究中, 我们提供了一种基于 U937 细胞模型的测定系统, 可以同时多种药物的细胞内抗 Lp 活性进行快速、定量的分析。

1 材料与方 法

1.1 菌 株

Lp 菌株 ATCC 33152(解放军 301 医院临床药理研究所, 王睿教授惠赠), 由中山大学附属第三医院细菌室保存。将细菌解冻后挑取适当菌液接种于缓冲活性炭酵母浸液琼脂(buffered charcoal yeast extract, BCYE)平板(广州迪景公司), 置 37 °C 细菌培养箱内培养 2 ~ 3 d 至长出肉眼可见的灰白色菌落, 挑取单个菌落, 用缓冲酵母浸液(buffered yeast extract- α , BYE- α)培养液将菌液调整至 0.5 号麦氏管浓度标准(1.5×10^8 /mL)。置于摇菌仪内摇菌过夜(12 ~ 18 h), 再以 3 000 r/min($r = 18$ cm)离心 20 min 收集细菌, 用无菌磷酸盐缓冲液(PBS)调整浓度为 1×10^7 /mL, 备用。

1.2 细 胞

U937 细胞(武汉, 中国典型培养物保藏中心), 用 90% RPMI 1640 培养液(添加 1.5 g/L 碳酸氢钠、4.5 g/L 葡萄糖、10 mmol/L HEPES、1.0 mmol/L 丙酮酸钠)加上 100 mL/L 胎牛血清为培养液, 置于细胞培养箱中培养。根据细胞密度规律传代, 传代超过 10 代之细胞即弃去不再使用。试验前向细胞培养液中加入终浓度为 20 ng/mL 的佛波酯(PMA)对 U937 细胞进行诱导, 置于细胞培

养箱中继续培养 48 h 后, 用 37 °C 预热的 RPMI 1640 培养液轻轻冲洗培养物 3 遍以洗去剩余的 PMA 和未贴壁的细胞, 剩下的贴壁细胞即为不再分化, 具有巨噬细胞表型特性的类巨噬细胞, 备用。

1.3 主要试剂及抗菌药物

环丙沙星(ciprofloxacin, CI)、莫西沙星(moxifloxacin, MO)购自北京拜耳医药保健有限公司, 左氧氟沙星(levofloxacin, LE)购自北京第一制药有限公司, 红霉素(erythromycin, EM)、MTT 购自北京鼎国生物技术有限责任公司。

1.4 细胞病理效应测定

通过 MTT 法测定感染 Lp 后存活的 U937 细胞数来反映细胞病理效应(cytopathic effect, CPE)。首先, 为了解吸光值和存活的细胞数目之间的对应关系, 将诱导后的 U937 细胞连续稀释后铺入 96 孔板, 加入 50 μ L 的 MTT 溶液(5 mg/mL), 在 37 °C 下孵育 4 h。弃去上清, 每孔加入 150 μ L 的二甲基亚砷(DMSO)后充分振荡, 将培养板置于酶标仪下读数(以 DMSO 为对照)。

由于活细菌也被认为可以和 MTT 反应而呈色^[5], 既往研究表明细菌浓度至少需达到 10^8 /mL 才能影响吸光值, 而本研究中所用的细菌浓度不曾达到该浓度, 因此细菌和 MTT 溶液的反应不会影响到实验数据的可靠性。

将诱导后的 U937 细胞铺入 96 孔板中并以不同浓度的细菌去感染它, 加入含有 50 μ g/mL 庆大霉素的培养液继续培养 2 h, 洗涤细胞后加入 100 μ L 培养液, 之后在各个时间点加入上述 MTT 溶液, 并用酶标仪在 570 nm 处读取各孔的吸光值 $D(570 \text{ nm})$ 。CPED₅₀ 定义为导致 50% 细胞死亡的细菌数目。为了精确测定该值, 我们将试验用细胞分为 2 组, 其中一组为非感染组(即未加干预措施的对照组, 视为不产生 CPE 效应), 另一组为 0.1% 皂苷处理组(由于皂苷可导致细胞死亡, 该组即为最大 CPE 对照组), 2 个对照组在 570 nm 处吸光值的平均值被定义为 CPED₅₀, 如此便可推算出导致 CPED₅₀ 的 Lp 浓度。

1.5 细胞外抗菌活性 MIC 测定

分别采用 E-test 法和有限稀释法测定试验所用药物对 Lp ATCC 33152 的最低抑菌浓度(MIC)值。具体如下:

E-test 法: 取培养 48 h 的菌落数个, 混悬于生

理盐水中,调整浓度至 $1.5 \times 10^8/\text{mL}$ 。均匀接种于 BCYE 平板。将 E-test 试纸条贴于琼脂表面。置 37°C 培养箱 48 h 后观察结果,抑菌椭圆环与试条交界处的刻度即为最小抑菌浓度 MIC。

有限稀释法:抗菌药物和 BYE- α 培养液制备同普通肉汤稀释法。①MIC 板制备:将倍比稀释后不同浓度的抗菌药物溶液分别加到灭菌的 96 孔板中,第 1 至第 11 孔加药液,每孔 $10\ \mu\text{L}$,第 12 孔不加药作为生长对照,冰冻干燥后密封, -20°C 保存备用。②接种物制备:将细菌悬液浓度调整至 0.5 麦氏比浊管标准,经 BYE- α 培养液 1:1 000 稀释后,向每孔中加 $100\ \mu\text{L}$,密封后置 37°C 培养箱,48 h 判断结果。此时,第 1 孔至第 11 孔药物浓度分别为 128、64、32、16、8、4、2、1、0.5、0.25、0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。③结果判断:以在小孔内完全抑制细菌生长的最低药物浓度为 MIC。当阳性对照孔(即不含抗生素)内细菌明显生长试验才有意义。当出现单一的跳孔时,记录抑制细菌生长的最高药物浓度。如出现多处跳孔,则不报告结果,重复试验。

1.6 细胞内抗菌活性 MIEC 测定

采用 MTT 法测定各抗菌药物的细胞内抗菌活性,即抑制胞内菌生长的最低胞外抗菌药物浓度(minimum extracellular concentration, MIEC),具体如下:用 $10^5/\text{孔}$ 浓度(20 倍 CPED₅₀)的 *Lp* ATCC 33152 感染诱导后的 U937 细胞 (2×10^5 个/孔)。感染 2 h 后除去胞外未被吞噬的细菌,加入含抗菌药物的培养液,继续培养至第 72 h,加入 $20\ \mu\text{L}$ 的 MTT 溶液, 37°C 孵育 4 h。弃上清,每孔中加入 $150\ \mu\text{L}$ DMSO 后充分振荡,将 96 孔培养板置于酶标仪下读数,在 570 nm 处测得各孔的吸光值 $D(570\ \text{nm})$ 。

1.7 数据处理

用 SPSS 11.5 软件进行统计描述和分析,实验数据以均数标准差来表示,实验组之间的差异用 analysis of variance, ANOVA 进行分析,多组方差齐性检验用 Levene 法,多个样本均数的两两比较用 SNK 法, $P < 0.05$ 视为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 *Lp* 对 U937 细胞产生的细胞病理效应

将诱导后的 U937 细胞浓度调整至 10^6 个/mL

(2×10^5 个/孔),每孔 $200\ \mu\text{L}$ 接种 96 孔板,以不同浓度的 *Lp* ATCC 33152 ($1 \sim 10^7/\text{孔}$) 去感染细胞。置细胞培养箱中 2 h 使细菌被吞噬,洗去胞外未被吞噬的细菌。加入不含抗菌药物的培养液 ($200\ \mu\text{L}$) 继续培养至 72 h,用 MTT 法检测存活下来的 U937 细胞,并以 $D(570\ \text{nm})$ 来表示。结果(图 1)显示:随着感染复数(MOI)的增大,被破坏的 U937 细胞逐渐增多,U937 细胞的破坏程度和感染的剂量呈一定的比例关系,在以 10^7 感染时,被破坏的细胞最多。CPED₅₀ 值为 $5 \times 10^3/\text{孔}$ 。

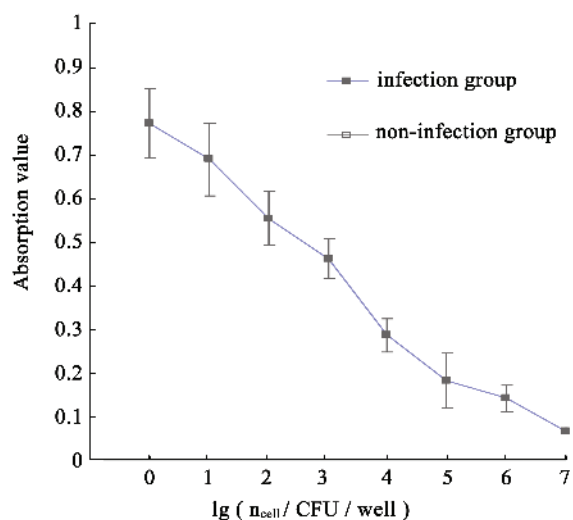


图 1 嗜肺军团菌 ATCC 33152 对 U937 细胞的细胞病理效应

Fig.1 Cytopathic effect of *L. pneumophila* ATCC 33152 against U937 cells

The induced U937 cells ($2 \times 10^5/\text{well}$) were seeded in a 96-well microplate. The cell monolayers were then infected with *L. pneumophila* ATCC 33152 at various inoculum sizes. The microplates were cultured at 37°C for 2 h, and the plates were then washed 3 times to remove extracellular medium and bacteria. New culture medium ($200\ \mu\text{L}$) without any antibiotics was added to each well. U937 cells after 72 h of incubation were quantified by the MTT assay and were expressed as the optical density at 570 nm. Each point represents the mean \pm SD for 3 wells.

2.2 细胞外抗菌活性 MIC 测定

分别采用 E-test 法和有限稀释法测定抗菌药物对 *Lp* ATCC 33152 的 MIC 值。结果显示:两种测定法结果差异较大 ($P < 0.05$)。E-test 法:EM 0.047 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、CI 0.38 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、LE 0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、MO 0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 稀释法:EM 0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、CI 0.03 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、LE 0.016 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、MO 0.016 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2.3 细胞内抗菌活性测定

Lp ATCC 33152 的 CPED₅₀ 约为 5×10^3 /孔, 以 1×10^5 /孔(20 倍 CPED₅₀)感染上述诱导成熟后的 U937 细胞(2×10^5 个/孔)。加入经连续稀释的 6 种浓度的抗菌药物,继续培养至第 72 h,检测其吸光值 $D(570 \text{ nm})$,为排除药物对细胞产生的毒性作用,设置仅加入药物而未用细菌感染的对照组。结果提示:实验所用 4 种抗菌药物没有明显的细胞毒性作用(图 2), $D(570 \text{ nm})$ 与阴性对照组相比没有显著性差异($P > 0.05$)。实验组的结果示:当浓度 $> 0.0156 \mu\text{g/mL}$,MO、LE、CI 能够很好的抑制 CPE,EM 对 U937 细胞的保护作用呈剂量依赖性(图 3)。 $D(570 \text{ nm})$ 值和胞内菌的数目呈相反的关系,提示这些药物能够有效的抑制胞内菌的生长并抑制其造成的 CPE。

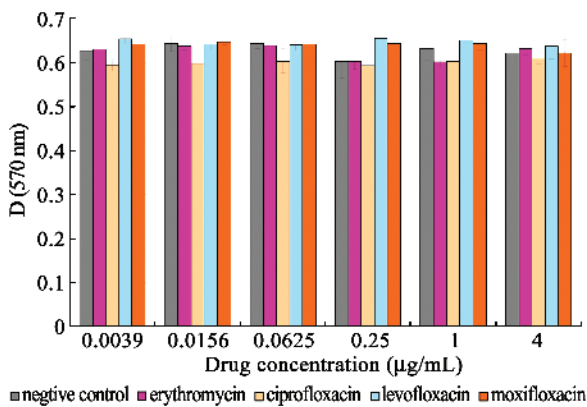


图 2 不同抗菌药物产生细胞病理效应的情况

Fig.2 Cytopathic effect caused by antibiotics

The induced U937 cells (2×10^5 /well) were seeded in a 96-well microplate. Antibiotics were added to the wells at the indicated concentrations. After 72 h of culture the remaining induced U937 cells were stained with MTT and the optical density of the purple formazan product was quantified at 570 nm. Each column represents the mean \pm SD for 3 wells.

用药物抑制细菌造成的 CPE 来评估其细胞内抗菌活性。MIEC 定义为能抑制大于 50%细胞病理效应(CPE)产生的胞外药物浓度。结果(图 4)显示:MO($4 \mu\text{g/mL}$)产生最大的 CPE 抑制,视为 100% CPE 抑制;未加入任何抗菌药物的阴性对照组即为最小 CPE 抑制,视为 0% CPE 抑制;大于 50% CPE 抑制的即为各药物之 MIEC 值。实验所用 4 种药物的 MIEC:EM $0.25 \mu\text{g/mL}$ 、CI $0.016 \mu\text{g/mL}$ 、LE $0.016 \mu\text{g/mL}$ 、MO $0.004 \mu\text{g/mL}$ 。EM 的

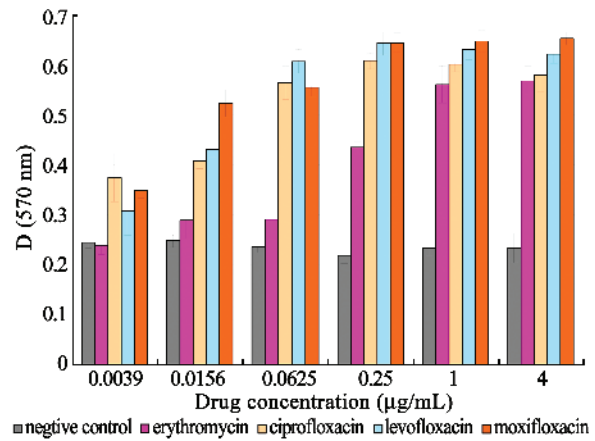


图 3 不同抗菌药物对细胞内嗜肺军团菌导致细胞病理效应的抑制作用

Fig.3 Inhibition by antibiotics of cytopathic effect of intracellular *L. pneumophila*

The induced U937 cells were infected with *L. pneumophila* ATCC 33152 at 1×10^5 CFU/well (20 times the CPED₅₀) for 2 h. After the extracellular bacteria were washed out, antibiotics were added to the wells at the indicated concentrations. After 72 h of culture the remaining induced U937 cells were stained with MTT and the optical density of the purple formazan product was quantified at 570 nm. Each column represents the mean \pm SD for 3 wells.

MIEC 明显高于其 MIC 值,其它 3 种氟喹诺酮药物的 MIEC 比各自的 MIC 低,提示上述四种药物都能够抑制 *Lp* 在细胞内增殖,MO 的抑制作用最强($0.004 \mu\text{g/mL}$)。

3 讨论

MIEC 的概念最早由 Vilde 等^[4]于 1986 年提出,定义为能在第 24 h 将 *Lp* 总数目(胞内加胞外)降至对照组(不含抗菌药物)的 10% 以下的最低胞外药物浓度,以此作为评价药物细胞内抗菌活性的指标之一;后来,Higa 等^[6]报道了基于鼠类巨噬细胞(J774.1 细胞系)的对细胞内 *Lp* 抗菌活性的简化定量分析法并将 MIEC 定义为能抑制大于 50%细胞病理效应(CPE)产生的胞外药物浓度。尽管上述两种 MIEC 的定义不同,但已有研究表明这两种方法所得出的 MIEC 值相近,由于 Vilde 等用于测定胞内菌生长的技术需耗费大量时间和材料去裂解细胞并将裂解液进行培养及计算菌落的个数,不便于对多种抗菌药物的抗菌活性进行比较。而 Higa 等采用的比色分析法就简单

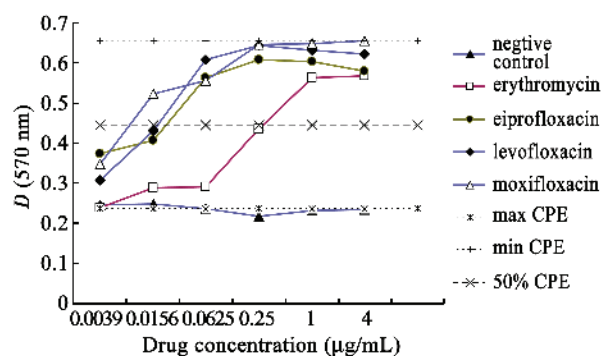


图 4 各种抗菌药物的剂量反应曲线

Fig.4 Dose-response curves demonstrating the effect of different concentrations of various antimicrobial agents on the cytopathic effect (CPE) of *L. pneumophila* ATCC 33152

The induced U937 cells (2×10^5 /well) were cultured in 96-well microplates and were infected with *L. pneumophila* ATCC 33152 (at 1×10^5 CFU/well; 20 times the CPED50) for 2 h. Then the extracellular medium and bacteria were removed, and new culture medium (200 μ L) containing twofold dilution series of different antibiotics was added to each well. The viability of the U937 cells was quantified 72 h later by the MTT assay and was expressed as the optical density at 570 nm. Maximum inhibition of the cytopathic effect was obtained when the cells were treated with moxifloxacin (4 μ g/mL); minimum inhibition of the cytopathic effect was recorded when no antibiotic was used. The MIEC resulting in 50% inhibition of the bacterial cytopathic effect was defined as the MIEC of each drug, representing an indicator of the intracellular activity of the antibiotic.

易行,加之细菌对宿主细胞产生的 CPE 和机体受到感染的严重程度是息息相关的,对细菌导致的 CPE 以及抗菌药物对 CPE 的抑制情况直接进行测定将比对细胞内的细菌数日本身的测定更有价值,也更能反映临床上药物在体内的对 Lp 感染真实效果。因而本文沿用其 MIEC 定义方法。

虽然 MIC 及 MBC 可作为衡量抗菌药物活性的指标,但临床上常遇到一些感染性疾病,药敏试验显示某种药物对致病菌高度敏感,但该药物治疗效果不好,如 Lp 感染^[1]。我们的结果提示 4 种抗菌药物对 Lp 感染都有效,但 MIC 和 MIEC 存在差异(表 2):EM 的 MIEC 为 MIC 的 2 倍,然而氟喹诺酮类抗菌药物如 CI 的 MIEC 仅为 MIC 值的 0.53 倍、MO 的 MIEC 仅为 MIC 值的 0.25 倍,虽然 MIEC 值大小受诸如药物对细胞吞噬体的渗透性、吞噬体的外周环境和药物本身在细胞内的存在方式等因素影响^[2-3],这些都会造成 MIC 和 MIEC 之

间的不同。然而在同一批次试验中, MIC 和 MIEC 的差异主要由药物对细胞膜的渗透性决定。MIEC 值越小,反映出药物对细胞膜的渗透性越好。一些在体外拥有足够抗菌效价的抗菌药物若不能渗透入细胞内将导致治疗失败。对于一些可在细胞内增殖的病原菌如 Lp、结核杆菌来说尤其如此。因此,在评估一种药物对细菌是否有效时,必须同时评估其细胞内抗菌效价。

通过试验结果我们发现 E-test 和有限稀释法两种测定法得出的 Lp ATCC 33152 的 MIC 值差异较大;通过 E-test 法测定的 CI 的 MIC 是有限稀释法的 12.67 倍,而通过 E-test 法测定的 EM 的 MIC 仅为有限稀释法的 0.376 倍。造成这种差异的原因主要是由于现阶段对于 Lp 的药敏试验检测方案依然没有一个通用的标准^[7]。由于 Lp 在 BCYE 培养板上生长状况极好,分离 Lp 属首选 BCYE 平板^[8],早期的药敏试验也采用该平板进行测定^[9]。但后来的研究认为 BCYE 平板中的活性炭成分会抑制部分抗菌药物(如氟喹诺酮类药物)的活性^[10-12],而提倡采用一些不含活性炭的培养介质如:BSYE (buffered starch yeast extract)^[13]、BYE^[14]液体培养基或琼脂培养基以期获得更为精确的药敏试验结果。另一些学者则认为:尽管 BCYE 中的活性炭成分对药物的活性有抑制作用,但 Lp 在各种介质中的生长状况差异很大,部分菌株在 BSYE 中甚至不能生长,因此活性炭所引起的 MIC 值的误差相比起由于细菌生长状况差而带来的潜在误差来说是可以接受的,而且使用 BCYE 平板进行药敏试验可重复性好,因此在药敏试验中用 BCYE 平板代替 BSYE 平板是可行的^[7]。本研究中采用的 E-test 法中使用的平板即为 BCYE 平板,而有限稀释法采用为不含炭成分的 BYE- α 培养液,这两种方法所得结果的差异性也印证了前人的研究结果,当然,如何选择一个最适当的药敏试验检测方案依然需要我们去进行更深入的研究。

到目前为止,临床上对 Lp 感染的治疗方案仍然以红霉素为主。Segreti 等^[15]于 1996 年研究了 Lp 对 3 种大环内酯类药物(红霉素、甲基红霉素和阿齐霉素)的敏感性,他们试验了 5 种 Lp 菌株,发现 3 种受试药物都能有效抑制这几种 Lp 菌株在细胞内的生长。1999 年 Edelstein 等^[16]报告了 Sch27899、红霉素和氧氟沙星对细胞内受试 Lp 菌株的 MICs 分别是 0.25、0.5、0.06 μ g/mL。

2001年 Rhomberg^[17] 利用体外试验研究了 Lp 对 BMS-284756 (T-3811ME) 敏感性, 试验对象以 Lp 血清型 1 为主, 还有其他 Lp 种和 Lp 的其他血清型, 发现 BMS-284756 比其它氟喹诺酮类和大环内酯类更有效, 其 MIC₉₀ 值在 0.008 ~ 0.03 mg/L 之间, 在所有受试药物中最低, 而且所有的受试菌都对其敏感。其它的受试药物主要有氟喹诺酮类 (如左氧氟沙星、莫西沙星和环丙沙星) 和大环内酯类 (如红霉素, 甲基红霉素和阿奇霉素) 等。这与 1997 年 Marc 的结果相一致, 而且所有受试喹诺酮类药物的效果要比大环内酯类受试药物好^[18]。Edelstein 的研究提示对病情严重、院内感染及免疫功能缺陷的患者应首选喹诺酮类药物治疗。新开发的氟喹诺酮类药物 (加替沙星、莫西沙星、司帕沙星、克林沙星等), 其共同特点是保持了早期开发的氟喹诺酮类药物 (氧氟沙星、环丙沙星) 对革兰氏阴性菌的优秀活性, 且对革兰氏阳性菌、厌氧菌也具有优秀的活性, 同时对非典型微生物如: 衣原体、支原体和 Lp 也具有较好的活性。我们的研究结果也证实了氟喹诺酮类药物在治疗 Lp 感染方面确实要比红霉素更胜一筹, 莫西沙星具有很强的细胞内抗菌活性, 这与以往报道是基本一致的。对比鼠源性的 J774 细胞系^[6], 人源性的 U937 细胞系更能真实的反映人体受 Lp 感染后的状况, 实验结果也能更好的为临床用药提供依据。

致谢: 感谢解放军 301 医院临床药理研究所王睿教授惠赠的 Lp (ATCC 33152) 菌株。

参考文献:

- [1] Edelstein PH. Antimicrobial chemotherapy for legionnaires' disease: a review[J]. Clin Infect Dis, 1995, 21 Suppl 3: S265-276.
- [2] Kitsukawa K, Hara J, Saito A. Inhibition of Legionella pneumophila in guinea pig peritoneal macrophages by new quinolone, macrolide and other antimicrobial agents[J]. J Antimicrob Chemother, 1991, 27(3): 343-353.
- [3] Takemura H, Yamamoto H, Kunishima H, et al. Evaluation of a human monocytic cell line THP-1 model for assay of the intracellular activities of antimicrobial agents against Legionella pneumophila[J]. J Antimicrob Chemother, 2000, 46(4): 589-594.
- [4] Vilde JL, Dournon E, Rajagopalan P. Inhibition of Legionella pneumophila multiplication within human macrophages by antimicrobial agents[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1986, 30(5): 743-748.
- [5] Gebran SJ, Newton CA, Yamamoto Y, et al. A rapid colorimetric assay for evaluating Legionella pneumophila growth in macrophages in vitro[J]. J Clin Microbiol, 1994, 32(1): 127-130.
- [6] Higa F, Kusano N, Tateyama M, et al. Simplified quantitative assay system for measuring activities of drugs against intracellular Legionella pneumophila[J]. J Clin Microbiol, 1998, 36(5): 1392-1398.
- [7] Pendland SL, Martin SJ, Chen C, et al. Comparison of charcoal- and starch-based media for testing susceptibilities of Legionella species to macrolides, azalides, and fluoroquinolones[J]. J Clin Microbiol, 1997, 35(11): 3004-3006.
- [8] Pasculle AW, Feeley JC, Gibson RJ, et al. Pittsburgh pneumonia agent: direct isolation from human lung tissue[J]. J Infect Dis, 1980, 141(6): 727-732.
- [9] Pasculle AW, Dowling JN, Weyant RS, et al. Susceptibility of Pittsburgh pneumonia agent (Legionella micdadei) and other newly recognized members of the genus Legionella to nineteen antimicrobial agents [J]. Antimicrob Agents Chemother, 1981, 20(6): 793-799.
- [10] Barker J, Farrell ID. The effect of charcoal on MICs for Legionella[J]. J Antimicrob Chemother, 1986, 17(1): 127-135.
- [11] Bornstein N, Roudier C, Fleurette J. Determination of the activity on Legionella of eight macrolides and related agents by comparative testing on three media [J]. J Antimicrob Chemother, 1985, 15(1): 17-22.
- [12] Marques T, Piedade J. Susceptibility testing by E-test and agar dilution of 30 strains of Legionella spp. isolated in Portugal[J]. Clin Microbiol Infect, 1997, 3(3): 365-368.
- [13] Saito A, Koga H, Shigeno H, et al. The antimicrobial activity of ciprofloxacin against Legionella species and the treatment of experimental Legionella pneumonia in guinea pigs[J]. J Antimicrob Chemother, 1986, 18(2): 251-260.
- [14] Dubois J, Joly JR. In-vitro activity of RP 59500, a new synergic antibacterial agent, against Legionella spp [J]. J Antimicrob Chemother, 1992, 30 Suppl A: 77-81.
- [15] Segreti J, Meyer P, Kapell K. In vitro activity of macrolides against intracellular Legionella pneumophila [J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 1996, 25(3): 123-126.
- [16] Edelstein PH, Edelstein MA. In vitro activity of SCH