

封面式樣

計畫編號：DOH91-DC-1016

行政院衛生署疾病管制局九十一年度科技研究發展計畫

細胞激素在創傷弧菌感染症所扮演的角色

研究報告

執行機構：財團法人奇美醫院

計畫主持人：湯宏仁

研究人員：莊銀清、李智隆

執行期間：91年1月1日至91年12月31日

* 本研究報告僅供參考，不代表衛生署疾病管制局意見 *

目 錄

	頁 碼
封面	
目錄	
一、計畫中英文摘要	(3)
二、前言	(8)
三、材料與方法	(8)
四、討論與結果	(12)
五、結論與建議	(23)
六、參考文獻	(24)

一、摘要：

細胞激素為血液生成及免疫反應中不可或缺的一環，其中發炎細胞激素 (inflammatory cytokines) 如：tumor necrosis factor alpha (TNF- α)、interleukin-1 (IL-1) 及 IL-6 的濃度與細菌感染引起的敗血症有相當大的關聯。若利用 Soluble TNF receptor 及 IL-1 receptor antagonist 抑制老鼠體內的 TNF- α 及 IL-1 生物活性，則可降低敗血症致死率。另外，有些抗生素 (如 ceftazidime) 會提高動物體內發炎細胞激素的濃度。因此本研究將利用動物模式以 ELISA 及 RT-PCR 等方法分析各發炎細胞激素及敗血症死亡率之間的關係，並比較不同藥物的使用對發炎細胞激素濃度變化的影響。

從國科會購買四到五週大 BALB/c 母鼠，於奇美醫學中心之動物中心檢疫室固定供給飼料與水，靜待五至七天以利於之後實驗之進行。從-80 取自臨床分離之 *Vibrio vulnificus* Yu Yu (Vv 5823) 並將之畫於 Nutrient Agar plates。挑選出單一菌落叢並接種於 10ml 的 Mueller Hinton Broth，於 37 培養箱中培養一夜 (約 15-16 小時) 之後取出 400 μ l 的菌液，加至另一瓶 20 ml 的 Mueller Hinton Broth 中，在 37 培養箱繼續培養四小時。四小時後將 20 ml 菌液倒至圓底離心管中，以 10000rpm、於 24 下離心 10 分鐘。接著倒掉上清液，以 20 ml 之生理食鹽水將離心之沉澱物重新打散混勻 (vortex)。混勻後之菌液需將其 OD600 調至 0.22-0.25 (大約是取 1ml 生理

食鹽水打散之菌液加上 12-14 ml 之生理食鹽水), 然後再稀釋十倍, 此時其所含之菌濃度約為 10^6 CFU/100。將老鼠依不同治療或處理分成幾組, 每一種治療在每一時間點最少有 6 隻老鼠。舉例來說, 在我們目前的實驗中分為感染不治療組 (PC)、Moxifloxacin 治療 (Mo)、Minocyclin 治療 (Mi)、Cefotaxime 治療 (Cefo) 及 cefotaxime 與 Minocyclin 合併治療 (M/C) 等五組。所有老鼠皆須接受致病菌經腹腔注射感染, 之後則在不同時間點以心臟採血方法收集鼠血。而抗生素治療則於感染後第二小時開始, 劑量為每隻老鼠需接受 $100 \mu\text{l}$ 之抗生素注射; 合併治療之組別則為一種抗生素各注射 $100 \mu\text{l}$ 。治療的時間間隔則依據不同之抗生素之說明書進行。採集到的血液樣本可靜置於室溫 2 小時或靜置於 4 °C 冰箱過夜; 之後再以 5000rpm、室溫離心 20 分鐘後將上清液分離並分裝至 1.5 ml 之微量離心管。在最初的實驗中我們曾在感染後第 1、3、6、9、12、24、30 小時採樣, 但由初步 ELISA 觀察所得, 我們於接下來的實驗中都只採第 3、6、9 小時之樣本。鼠體血清中的細胞激素為以自 R&D 購得的 ELISA kits 測定。其中定量是以每次測定時所作之標準曲線為依據而決定, 每次的測試須 duplicate。所有測試程序則依照 kit 中所附之說明書進行, 感染後 3 小時明顯有較低的濃度。而由測得的細胞激素結果看來, 不同抗生素治療對於細胞激素影響之間比較起來似乎並無顯著的差距; 亦即所有此實驗中所使用的抗生素治療後都可

降低細胞激素的分泌，而降低的程度並無顯著差異。此外，若單純就數據看來，將此次細胞激素的結果與之前施打 10^7 CFU/ml 之結果相比，可發現此次實驗的細胞激素濃度較高一點，但以統計方式來看，則無顯著差距；若比較 10^6 CFU/ml 與 10^7 CFU/ml 之實驗，則可看出在細胞激素量上有明顯差異。此外，O.D 值 0.233 的感染劑量雖然無培養基的 CFU 數量佐證，但可看到老鼠健康狀況較之前所有實驗惡化，死亡情形較嚴重，包況接受治療的組別在內，亦有大量老鼠死亡。死亡時間則主要集中於第 5、6 小時。

以 V_v 感染與未感染隻控制組相比較，則受感染之個體其細胞激素量有明顯之上升，尤以第 6 及 9 小時可看見明顯之變化， V_v 感染後未治療之組別與接受治療之組別細胞激素有顯著不同表現量，所有本實驗中所使用的抗生素皆可使 V_v 感染後之細胞激素量下降，但不同抗生素治療之間下降的程度並無明顯的差異，不同菌感染 (V_v vs. Ah) 所造成之細胞激素表現量有明顯差別，感染之菌量會影響細胞激素的表現量，但其表現量有 limitation。 eg., 細胞激素在不同之感染劑量下之表現如後， $10^5 < 10^6 < 10^7$ ；且感染 10^5 CFU 之老鼠幾乎不會死亡，健康狀態良好，只有輕微之不適狀，亦可存活至 30 小時。

中文關鍵詞：創傷弧菌、抗生素、細胞激素、敗血症、內毒素、

革蘭氏陰氏菌

ABSTRACT :

Vibrio vulnificus, a halophilic vibrio, has been a dramatic increase in the number of reported case in Taiwan. It causes localized wound infection and primary septicemia. The wound infections are acquired through exposure of a wound to salt water or shellfish, it is characterized by an intense acute cellulites which spreads along the subcutaneous tissue where as septicemia is usually acquired through oral ingestion of organisms. The mortality rate of the primary septicemia is 61% ,89% of patients suffering from *V. vulnificus* primary septicemia reported having an underlying chronic disorder. Disorders most frequently associated with *V. vulnificus* septicemia are those that result in iron overload, such as chronic cirrhosis, hemochromatosis and thalassemia, chronic renal insufficiency and use of immunosuppressive drugs have also been associated with *V. vulnificus* infection.

Cytokine-related systemic intravascular inflammation may represent a common pathogenic link between initial insult and multiple organ failure in septic shock patients. *V. vulnificus* LPS and CPS may cause a significant pyrogenic response and hypotension which led to cardiovascular shock. The LPS and CPS play role in pathogenesis by modulating inflammatory-associated cytokine (including TNF-alpha, IL-6, IL-1) production. However, there were no detail study to the proinflammatory cytokine study in the *V. vulnificus* infection. We very interested to the proinflammatory cytokine production in *V. vulnificus* infection. And to the correlation between the mortality rate with cytokine productin *in vivo*.

Prior study showed that tetracycline may need for treatment in *V. vulnificus*

infection, however, we conducted that combination therapy with cefotaxime and minocycline is distinctly more advantageous than therapy with the single antibiotic regimen for the treatment of severe experimental *V. vulnificus* infection, It was applied in clinical regimen with combined therapy with good result. However Moxifloxacin is a new 8-methoxyquinolone antibiotic with against Gram's negative and positive bacteria, it has long duration therapy effect and it can be taking by oral form. We designed a study also by using Moxifloxacin alone or using combined therapy with minocycline and cefotaxime to treat the *V. vulnificus* infection mice, We has very interested to the therapeutic effect in mice with *V. vulnificus* inctection and the cytokine change in mice after antibiotics treatment.

Keyword: *vibrio vulnificus*, proinflammatory cytokine, fluoroquinolone

二、前言：

細胞激素為血液生成及免疫反應中不可或缺的一環，其中發炎細胞激素 (inflammatory cytokines) 如：tumor necrosis factor alpha (TNF-) interleukin-1 (IL-1) 及 IL-6 的濃度與細菌感染引起的敗血症有相當大的關聯。若利用 soluble TNF receptor 及 IL-1 receptor antagonist 抑制老鼠體內的 TNF- 及 IL-1 生物活性，則可降低敗血症致死率。另外，有些抗生素 (如 ceftazidime) 會提高動物體內發炎細胞激素的濃度。因此本研究將利用動物模式以 ELISA 及 RT-PCR 等方法分析各發炎細胞激素及敗血症死亡率之間的關係，並比較不同藥物的使用對發炎細胞激素濃度變化的影響。

三、材料與方法：

老鼠

從國科會購買四到五週大 BALB/c 母鼠，於奇美醫學中心之動物中心檢疫室固定供給飼料與水，靜待五至七天以利於之後實驗之進行。

感染菌的準備

從-80 取自臨床分離之 *Vibrio vulnificus* Yu Yu (Vv 5823) 並將之畫於 Nutrient Agar plates。挑選出單一菌落叢並接種於 10ml 的 Mueller Hinton Broth，於 37 培養箱中培養一夜(約 15-16 小時) 之後取出 400 μ l 的菌液，加至另一瓶 20 ml 的 Mueller Hinton Broth 中，在 37 培養箱繼續培養四小

時。四小時後將 20 ml 菌液倒至圓底離心管中，以 10000rpm、於 24 °C 下離心 10 分鐘。接著倒掉上清液，以 20 ml 之生理食鹽水將離心之沉澱物重新打散混勻 (vortex)。混勻後之菌液需將其 OD600 調至 0.22-0.25 (大約是取 1ml 生理食鹽水打散之菌液加上 12-14 ml 之生理食鹽水)，然後再稀釋十倍，此時其所含之菌濃度約為 10^6 CFU/100 μ l。

動物實驗

將老鼠依不同治療或處理分成幾組，每一種治療在每一時間點最少有 6 隻老鼠。舉例來說，在我們目前的實驗中分為感染不治療組 (PC)、Moxifloxacin 治療 (Mo)、Minocyclin 治療 (Mi)、Cefotaxime 治療 (Cefo) 及 Cefotaxime 與 Minocyclin 合併治療 (M/C) 等五組。所有老鼠皆須接受致病菌經腹腔注射感染，之後則在不同時間點以心臟採血方法收集鼠血。而抗生素治療則於感染後第二小時開始，劑量為每隻老鼠需接受 100 μ l 之抗生素注射；合併治療之組別則為一種抗生素各注射 100 μ l。治療的時間間隔則依據不同之抗生素之說明書進行。採集到的血液樣本可靜置於室溫 2 小時或靜置於 4 °C 冰箱過夜；之後再以 5000rpm、室溫離心 20 分鐘後將上清液分離並分裝至 1.5 ml 之微量離心管。在最初的實驗中我們曾在感染後第 1、3、6、9、12、24、30 小時採樣，但由初步 ELISA 觀察所得，我們於接下來的實驗中都只採第 3、6、9 小時之樣本。

抗生素準備

Cefotaxime (Claforan 1.0 or 0.5, Hoechst AG, Germany) 治療劑量為 30 mg/kg , 每 6 小時施打一次。將 0.5 g claforan 溶於 5 ml 無菌的 MQ , 取 5 ml 加至另外 28.3 ml 的無菌水中。接著以 0.22 μ m filter 過濾並分裝每管 1 ml 於微量離心管中 , 存放於-20 冰箱。使用前需要以無菌水以 1 : 1.5 (stock : 無菌水) 倍數進行稀釋。

Minocycline (Minocin, Lederle, USA) 之治療劑量為第一次 4 mg/kg , 之後則為 2 mg/kg ; 治療間隔為每 12 小時一次 首先溶解 100 mg Minocyclin 於 5ml 無菌水中 , 再作四倍稀釋 , 使抗生素濃度為 4 mg/ml ; 經 0.22 μ m filter 過濾並分裝後存於-20 冰箱。使用前加入 4 ml 無菌水稀釋備用。

Moxifloxacin (standard powder, at 4) 注射至鼠體內的劑量濃度應為 1.6 mg/ml。將 80 mg 之 Moxifloxacin 粉末溶於 10 ml 無菌水裡並過濾 , 分裝於微量離心管中並存於-20 。使用前一樣以 4 ml 無菌水稀釋。

細胞激素的測定

鼠體血清中的細胞激素為以自 R&D 購得的 ELISA kits 測定。其中定量是以每次測定時所作之標準曲線為依據而決定 , 每次的測試須 duplicate。所有測試程序則依照 kit 中所附之說明書進行。

PS : 我們測量的是 pro-inflammatory cytokines , 包括了 TNF- α 、 IL-1 β 、 IL-6

在測定這些細胞激素時，有些 sample 可能需要經過稀釋；尤其是 IL-6，某些 IL-6 的點甚至需要稀釋 100-500 倍，例如感染未治療 6、9 小時的 sample。每次做 ELISA 時最好由 IL-6 開始測定，因為 IL-6 通常需要較多倍數的稀釋；由 IL-6 開始做起我們可以稍微預測此批 sample 其他細胞激素的測定是否需要調整稀釋倍數。

標準曲線：

依照實驗室的標準步驟培養菌液：10 ml MHB 隔夜培養、1：50 renew 培養四小時、離心 10 分鐘 10000rpm、重新混勻於 20 ml saline、1：12-15 比例稀釋等步驟後，約可得到 O.D.值 0.20-0.25 的菌液，此時的菌濃度約為 10^8 CFU/ml。

四、討論與結果：

EXPI:

Date: 09-18-2001

Inoculation bacterium: Vv Yu Yu

Inoculation size: 1.89×10^6 CFU/100 μ l

Objective：感染與未感染 vv 之細胞激素變化

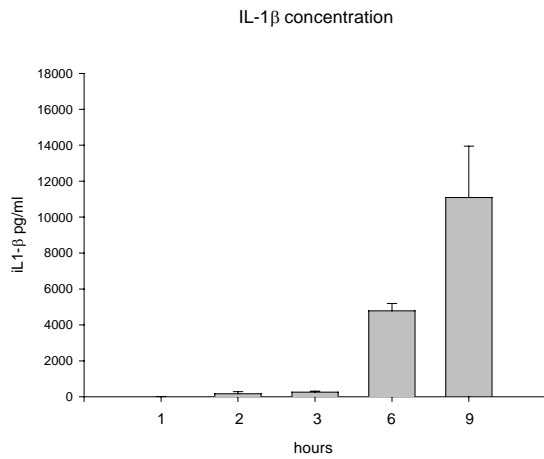


Fig. IL-1 β in mouse serum after *Vibrio vulnificus* i.p. infection.

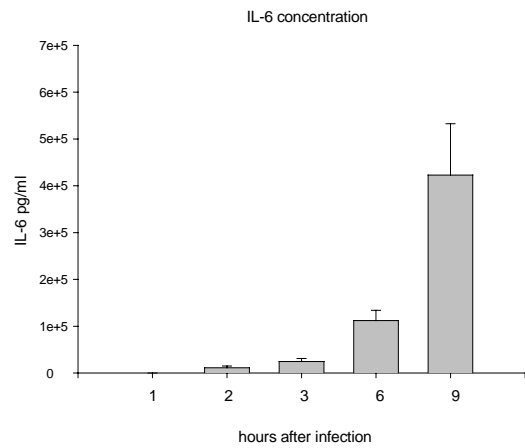


Fig. IL-6 in mouse serum after *Vibrio vulnificus* i.p. infection

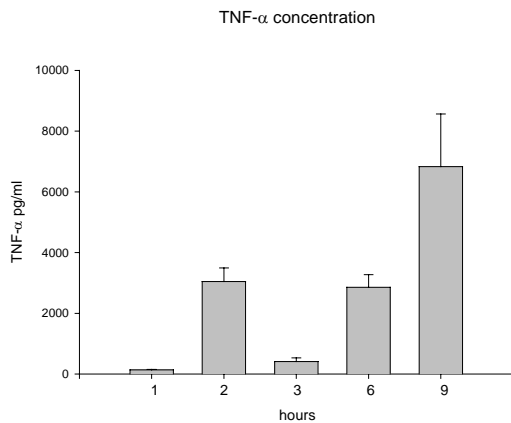


Fig. TNF- α in mouse serum after *Vibrio vulnificus* i.p. infection.

在圖一我們只有感染與未感染的組別（但未感染組別因為數據低而未表示出來）。我們可看到IL-6與IL-1的濃度隨著時間增加而上升，TNF-亦是，但比較奇怪的是其在感染後3小時明顯有較低的濃度。不過我們後來並沒有再做相類似的時間點，所以無法比較此次數據為variation抑或truth。

EXP II:

Date: 12-26-2001

Inoculation bacterium: Vv Yu Yu

Inoculation size: 1.89×10^6 CFU/100 μ l

Objective : Vv 感染後與治療後之細胞激素量變化

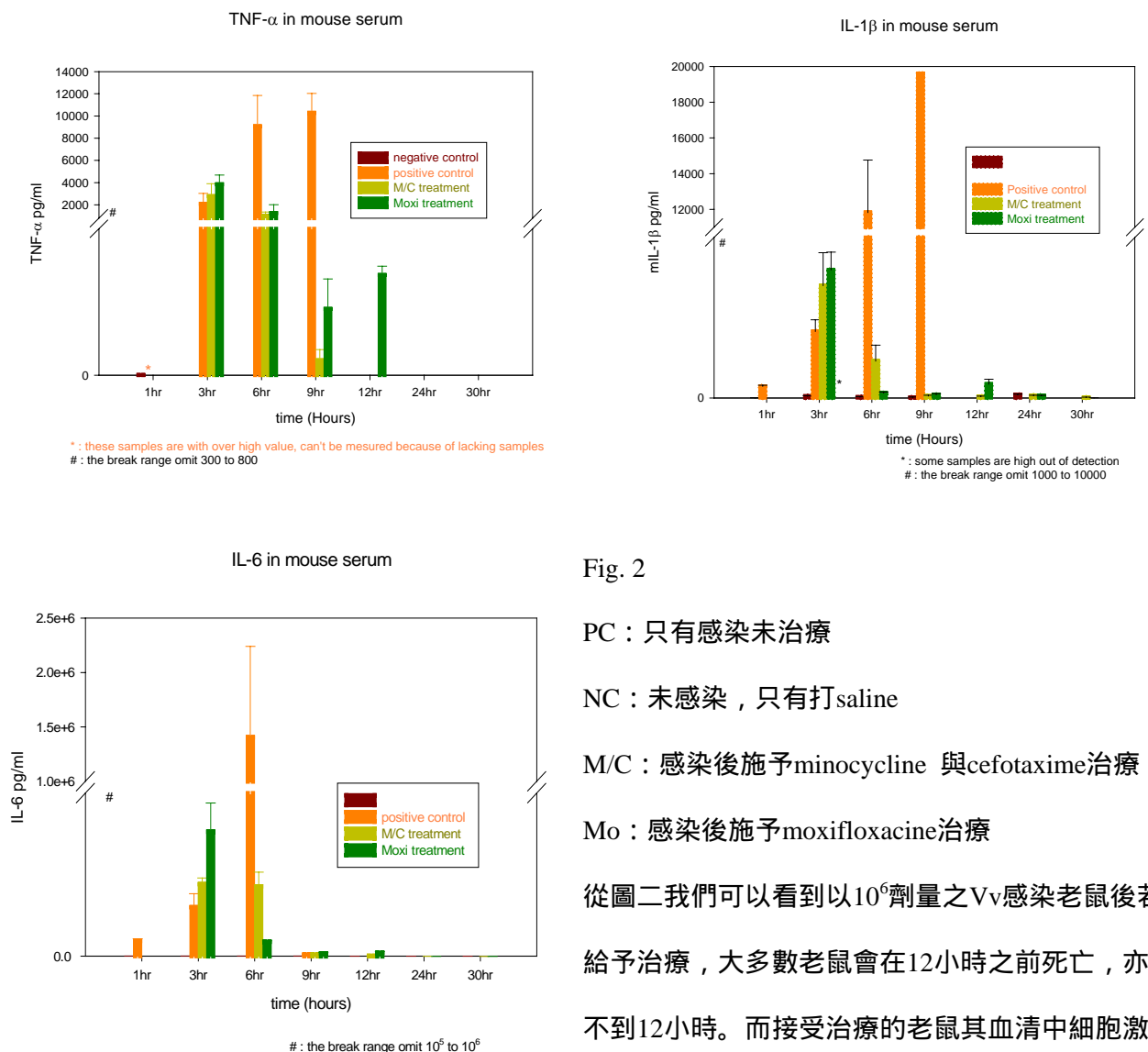


Fig. 2

PC : 只有感染未治療

NC : 未感染，只有打saline

M/C : 感染後施予minocycline 與cefotaxime治療

Mo : 感染後施予moxifloxacin治療

從圖二我們可以看到以 10^6 劑量之Vv感染老鼠後若未給予治療，大多數老鼠會在12小時之前死亡，亦即活不到12小時。而接受治療的老鼠其血清中細胞激素的量皆有明顯的下降，且濃度下降至接近未感染老鼠的細胞激素濃度；其健康狀態也有明顯的進步。

EXP III:

Date: 02-26-2002

Inoculation bacterium: Vv Yu Yu

Inoculation size: 2.5×10^5 CFU/100 μ l

Objective : Vv 感染後與治療後之細胞激素量變化

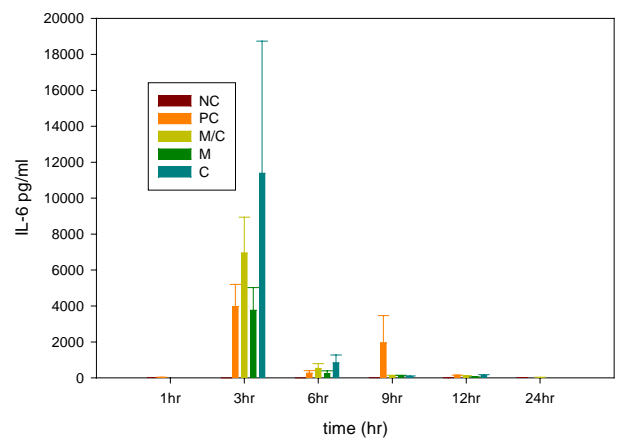
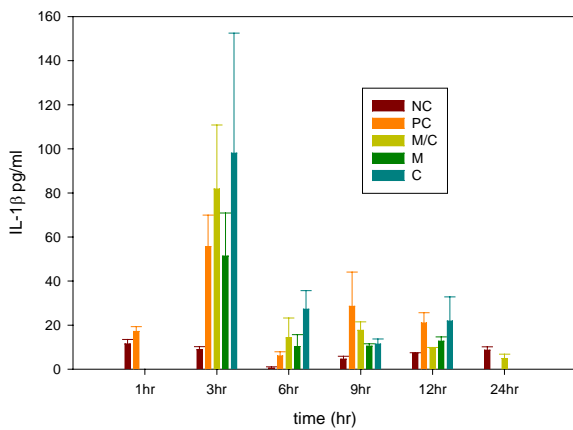


Fig. 3

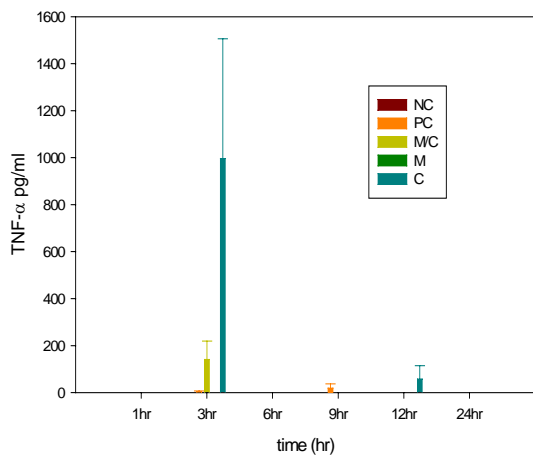
PC : 只有感染未治療

NC : 未感染，只有打saline

M/C : 感染後施予minocyclin 與cefotaxime
治療

M : 感染後施予minocyclin治療

C : 感染後施予cefotaxime治療



EXP IV:

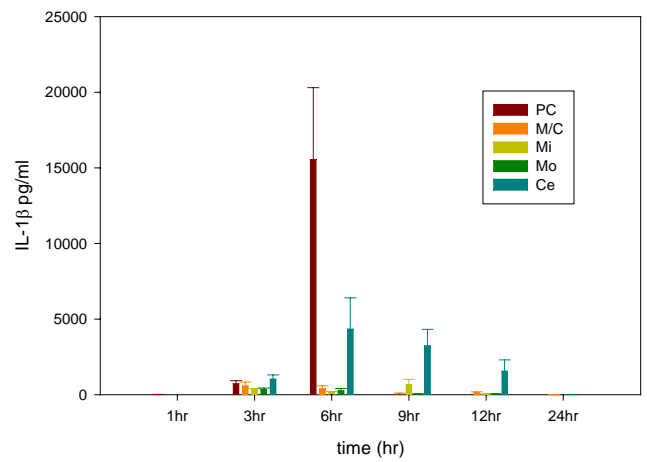
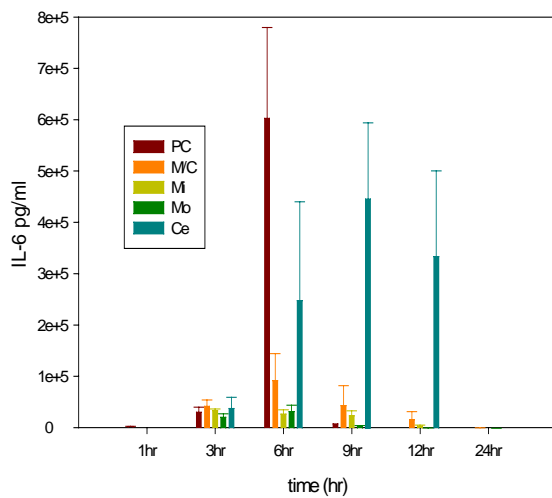
Date: 03-27-2002

Inoculation bacterium: Vv Yu Yu

Inoculation size: 1.39×10^6 CFU/100 μ l

Objective : Vv 感染後與治療後之細胞激素量變化

2D Graph 1



2D Graph 1

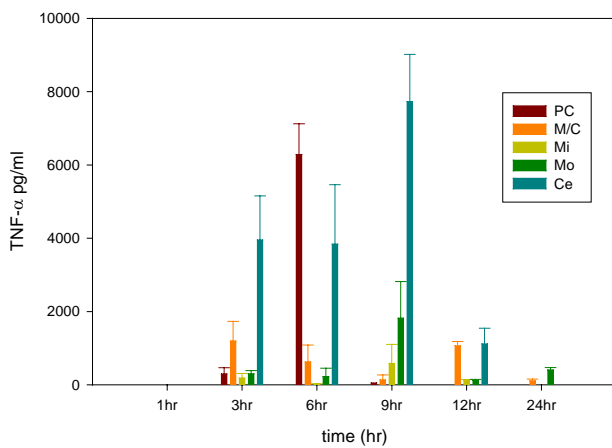


Fig. 4-1

PC : 只有感染未治療^a

M/C : 感染後施予minocyclin 與cefotaxime治療

Mi : 感染後施予minocyclin治療^b

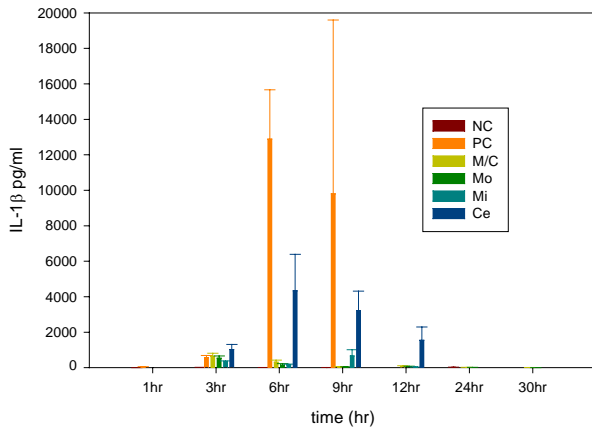
Mo : 感染後施予moxifloxacin治療

Ce : 感染後施予cefotaxime治療^b

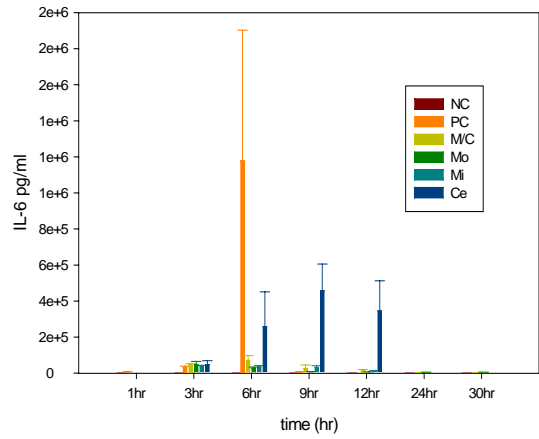
a : 9小時的老鼠只有1隻，且其健康狀況良好，可能有操作誤差所導致。

b : n=3

IL-1 β concentration combination



IL-6 concentration combination



TNF- α concentration combination

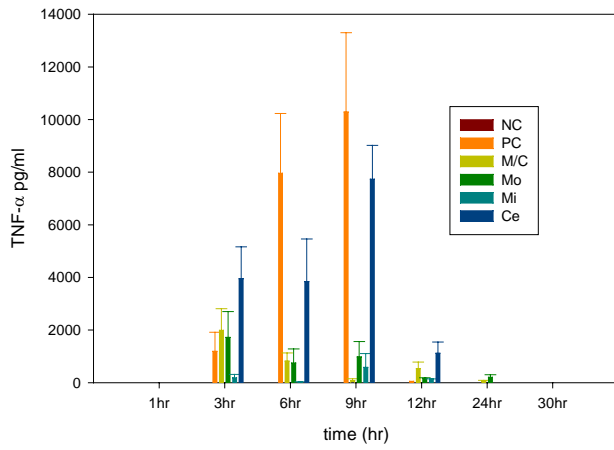


Fig. 4-2

為圖二與圖四-1結合，將實驗sample
數量增大。

EXP V :

Date: 04-26-2002

Inoculation bacterium: Vv Yu Yu

Inoculation size: 1.65×10^6 CFU/100 μ l Objective : Vv 感染後與治療後之細胞

激素量變化

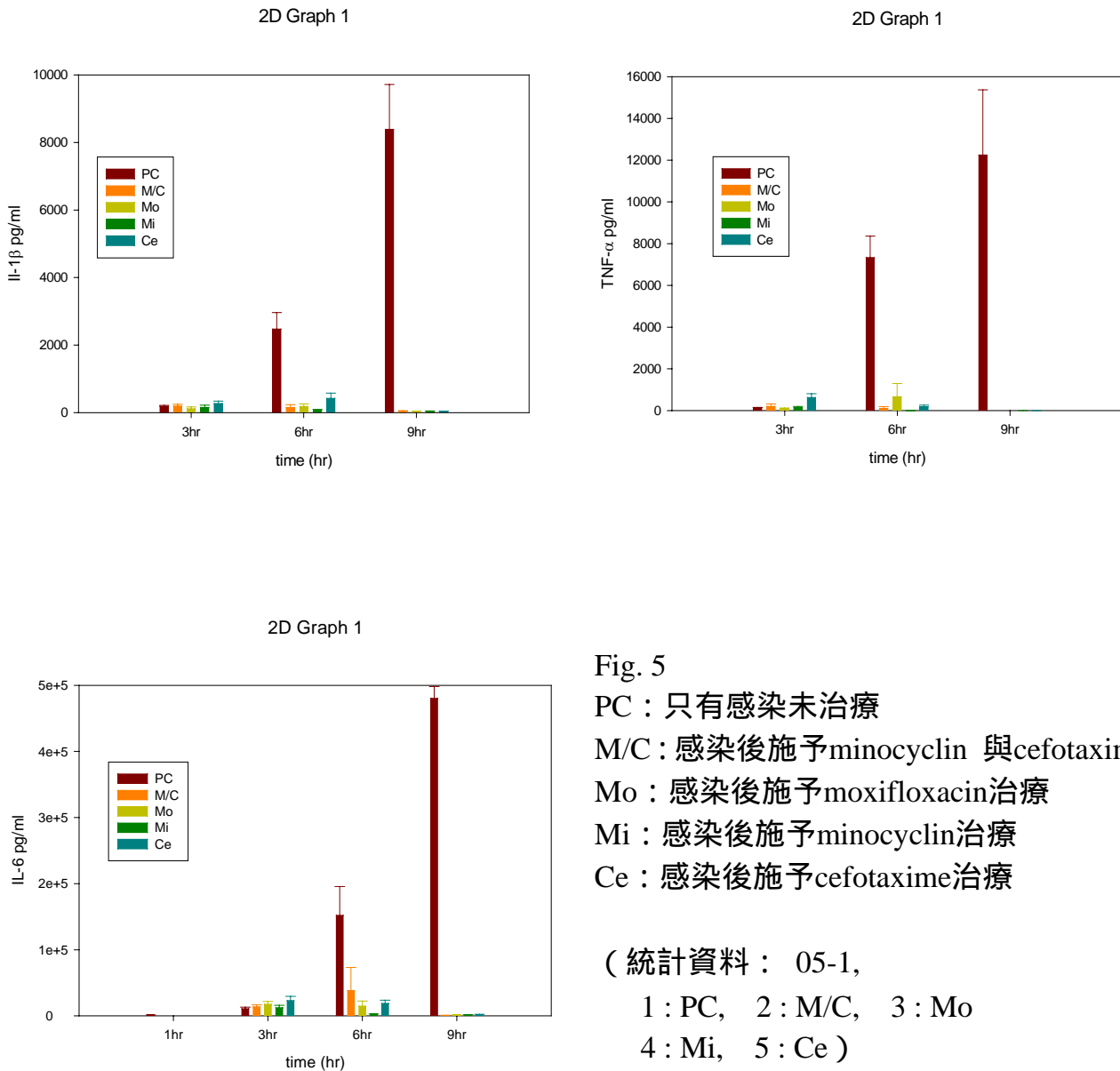


Fig. 5

PC : 只有感染未治療

M/C : 感染後施予minocyclin 與cefotaxime治療

Mo : 感染後施予moxifloxacin治療

Mi : 感染後施予minocyclin治療

Ce : 感染後施予cefotaxime治療

(統計資料 : 05-1,

1 : PC, 2 : M/C, 3 : Mo

4 : Mi, 5 : Ce)

EXP VI :

Date: 05-14-2002

Inoculation bacterium: Vv Yu Yu

Inoculation size: 1×10^6 CFU/100 μ l Objective : Vv 感染後與治療後之細胞激素

量變化

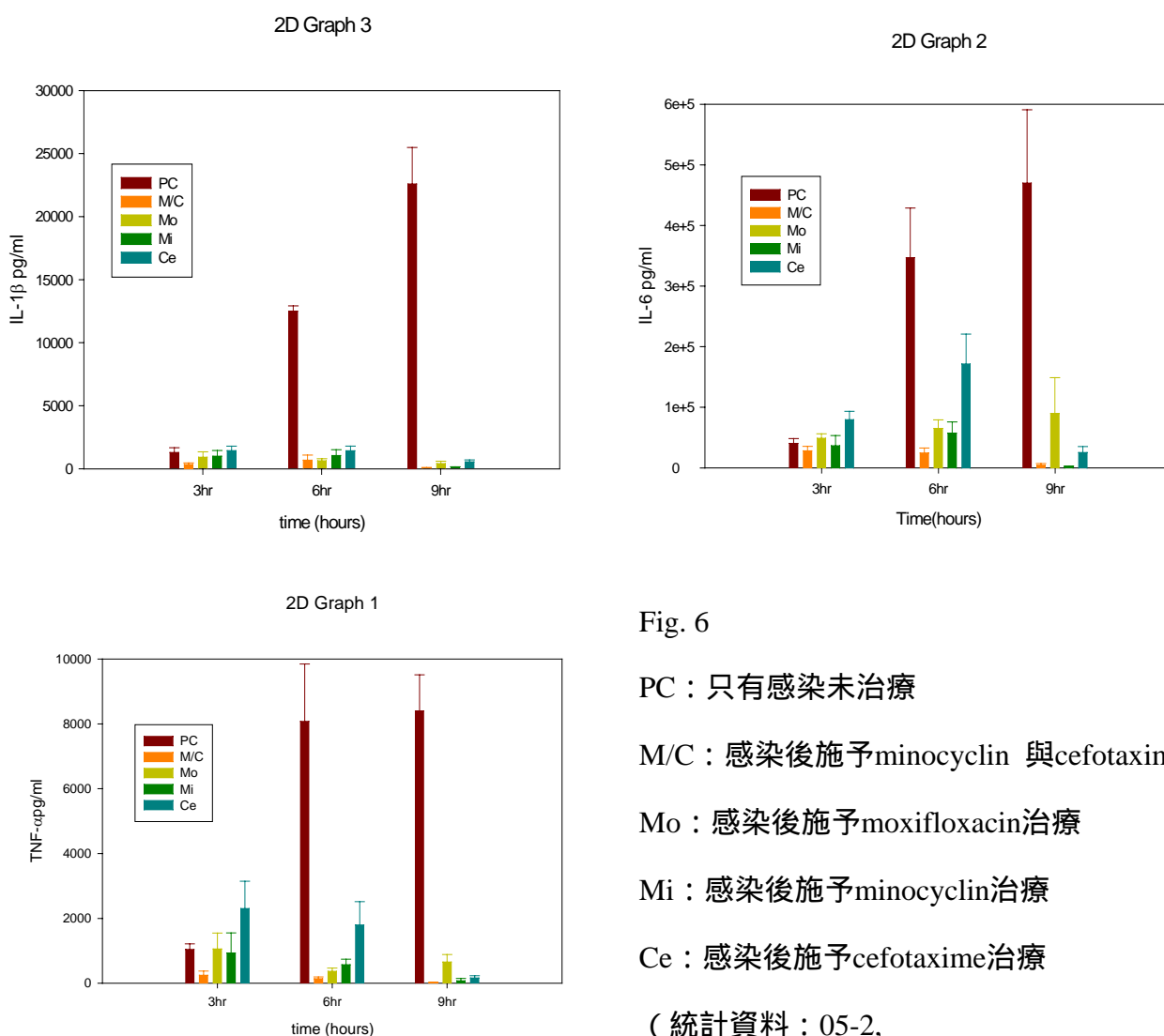


Fig. 6

PC : 只有感染未治療

M/C : 感染後施予minocyclin 與cefotaxime治療

Mo : 感染後施予moxifloxacin治療

Mi : 感染後施予minocyclin治療

Ce : 感染後施予cefotaxime治療

(統計資料 : 05-2,

1 : PC, 2 : M/C, 3 : Mo, 4 : Mi, 5 : Ce)

由前面的實驗結果 (Fig4) 我們看到 cefotaxime 治療會造成較高之細胞激素產生；但在圖五與圖六的結果我們卻發現無論是哪種藥物治療，細胞激素的增減並無太大差別（見統計資料分析：05-2）。在有感染但未接受治療的組別裡，不管是 IL-1 β 、IL-6 或 TNF- α 皆隨著時間點而濃度增加；但接受治療的老鼠細胞激素都沒有甚大的變化與顯著的差異。

EXP VII :

Date: 04-30-2002

Inoculation bacterium: Vv Yu Yu and Ah 2743

Inoculation size: 2.2×10^6 CFU/100 μ l for Vv, 1.8×10^6 CFU/100 μ l for Ah

Objective: 比較不同菌感染後鼠血清中之細胞激素變化

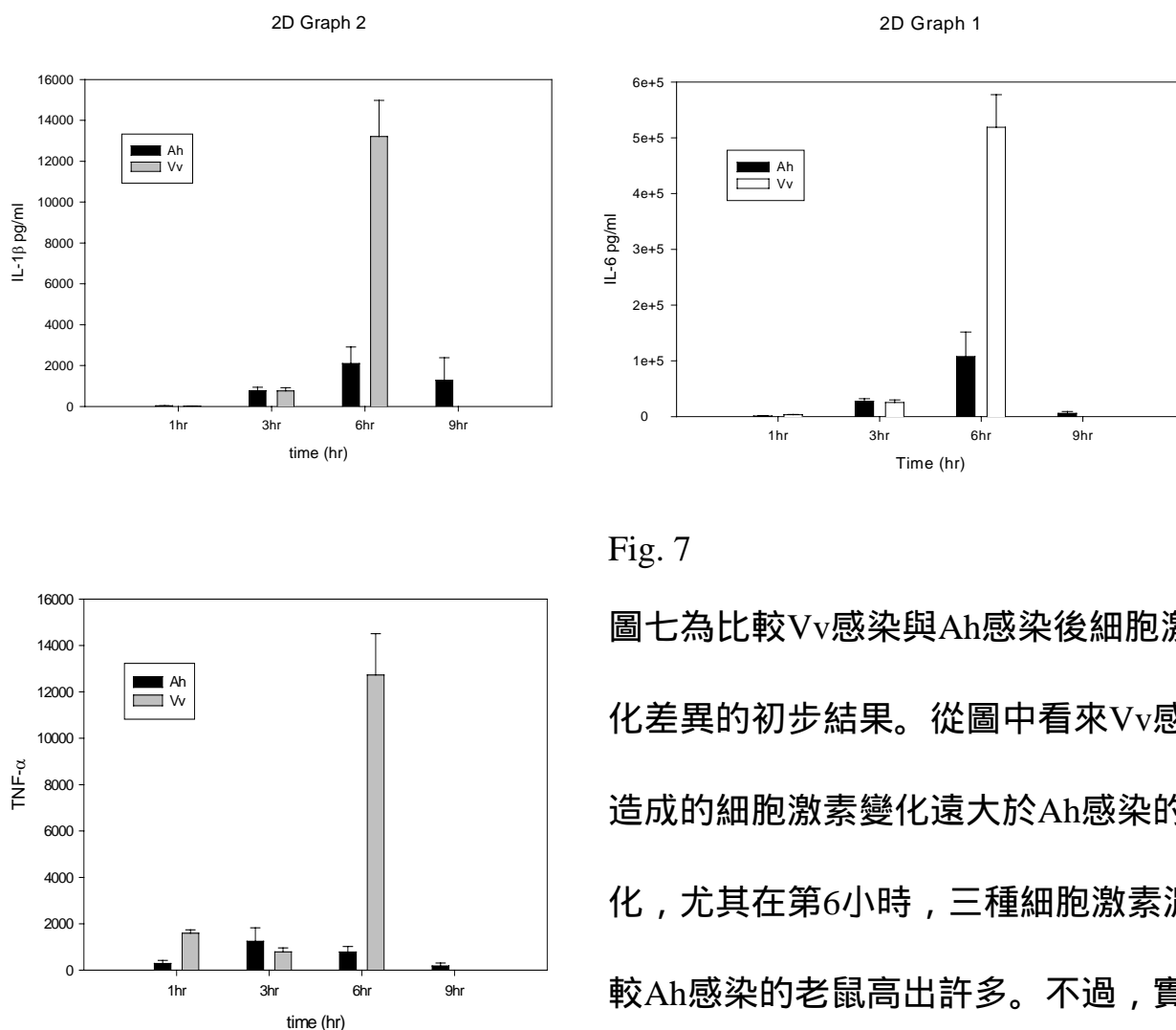


Fig. 7

圖七為比較Vv感染與Ah感染後細胞激素變化差異的初步結果。從圖中看來Vv感染所造成的細胞激素變化遠大於Ah感染的變化，尤其在第6小時，三種細胞激素濃度都較Ah感染的老鼠高出許多。不過，實驗過程中我們發現Ah感染的老鼠大量死亡時間(3-6 hours)略早於Vv感染的死亡時間(6-9 hours)。

EXP VIII

Date: 06-27-2002

Inoculation bacterium: Vv Yu Yu

Inoculation dosage: unavailable, only know the O.D. value of 0.233

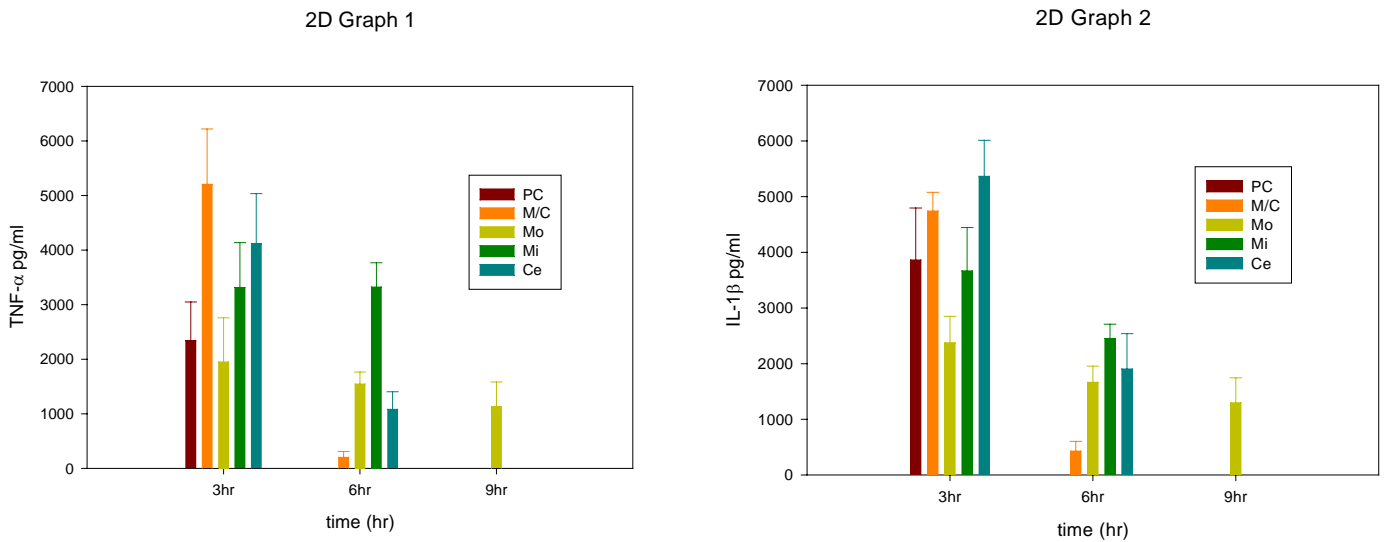


Fig. 8

PC : 只有感染未治療

M/C : 感染後施予minocyclin 與cefotaxime合併治療

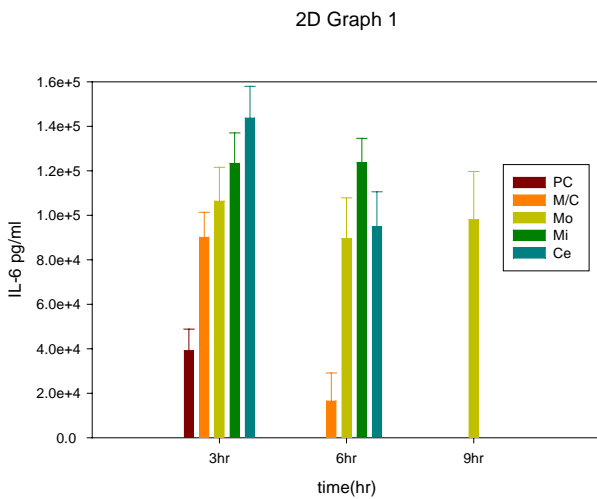
Mo : 感染後施予moxifloxacin治療

Mi : 感染後施予minocyclin治療

Ce : 感染後施予cefotaxime治療

(統計資料 : 062702,

1 : PC, 2 : M/C, 3 : Mo, 4 : Mi, 5 : Ce)



本次實驗原先預定以 1×10^8 CFU/ml 之劑量感染老鼠，但可能因為培養基放置過久導致我們無法取得正確的 CFU，僅得到 OD 值 0.233。

而由測得的細胞激素結果看來，不同抗生素治療對於細胞激素影響之間比較起來似乎並無顯著的差距；亦即所有此實驗中所使用的抗生素治療後都可降低細胞激素的分泌，而降低的程度並無顯著差異（圖五、圖六）。此外，若單純就數據看來，將此次細胞激素的結果與之前施打 10^7 CFU/ml 之結果相比，可發現此次實驗的細胞激素濃度較高一點，但以統計方式來看，則無顯著差距（少數幾點除外，請參考附件之統計資料：062702）；若比較 10^6 CFU/ml 與 10^7 CFU/ml 之實驗，則可看出在細胞激素量上有明顯差異（圖三、五、六、八）。此外，由圖中我們也可以看到 minocyclin 與 cefotaxime 合併治療的組別其細胞激素量在 3 小時出現一高峰，但於第 6 小時則大量下降，與其他抗生素治療後之細胞激素濃度變化有明顯不同。O.D 值 0.233 的感染劑量雖然無培養基的 CFU 數量佐證，但可看到老鼠健康狀況較之前所有實驗惡化，死亡情形較嚴重，包況接受治療的組別在內，亦有大量老鼠死亡。死亡時間則主要集中於第 5、6 小時。

五、結論與建議：

1. 以 V_v 感染與未感染隻控制組相比較，則受感染之個體其細胞激素量有明顯之上升，尤以第 6 及 9 小時可看見明顯之變化。
2. V_v 感染後未治療之組別與接受治療之組別細胞激素有顯著不同表現量。
3. 所有本實驗中所使用的抗生素皆可使 V_v 感染後之細胞激素量下降，但不同抗生素治療之間下降的程度並無明顯的差異。
4. 不同菌感染 (V_v vs. Ah) 所造成之細胞激素表現量有明顯差別。
5. 感染之菌量會影響細胞激素的表現量，但其表現量有 limitation。

eg.,細胞激素在不同之感染劑量下之表現如後， $10^5 < 10^6 < 10^7$ ；且感染 10^5 CFU 之老鼠幾乎不會死亡，健康狀態良好，只有輕微之不適狀，亦可存活至 30 小時。

六、參考文獻：

1. A. Dalhoff, U. Petersen, R. Endermann. 1996. In vitro Activity of BAY 12-8039, A New 8-Methoxyquinolone. *Chemotherapy*. **42**: 410-425.
2. Alkharfy K. M., J. A. Kellum, R. F. Frye, G. R. Matzke. 2000. Effect of Ceftazidime on Systemic Cytokine Concentrations in Rats. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **44**: 3217-3219.
3. Abraham E., R. Wunderink, H. Silverman, *et al.* 1995. Efficacy and safety of monoclonal antibody to human tumor necrosis factor α in patients with sepsis syndrome: A randomized, controlled double-blind, multicenter clinical trial: TNF- α Mab Sepsis study group. *JAMA* **273**: 934-941.
4. Bone, R. C. 1991. The pathogenesis of sepsis. *Ann. Intern. Med.* **115**: 457-469.
5. Chuang, Y. C., Young, C., and Chen, C. W. (1989) *Vibrio vulnificus* infection. *Scand. J. Infect. Dis.* **21**: 721-726.
6. Chuang, Y. C., Yuan, C. Y., Liu, C. Y., Lan, C. K., and Huang, A. H. (1992) *Vibrio vulnificus* infection in Taiwan : report of 28 cases and review of clinical manifestations and treatment. *Clini. Infect. Dis.* **15**: 271-276.
7. Chuang, Y. C., C. Y. Yuan, C. Y. Liu, C. K. Lan, and A. H. M. Huang. 1992. *Vibrio vulnificus* infection in Taiwan : report of 28 cases and review of clinical manifestations and treatment. *Clin. Infect. Dis.* **15**: 271-276.
8. Chuang, Y. C. 1992. *Clin. Infect. Dis.* **15**: 1072. (Letter)
9. Chuang, Y. C., J. W. Liu, W. C. Ko, K. Y. Lin, J. J. Wu, and K. Y. Huang. 1997. In vitro synergism between cefotaxime and minocycline against *Vibrio vulnificus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**: 2214-2217.
10. Chuang, Y. C., W. C. Ko, S. T. Wang, J. W. Liu, C. F. Kuo, J. J. Wu, K. Y. Huang. 1998.

- Minocycline and Cefotaxime in the Treatment of Experimental Murine *Vibrio vulnificus* Infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**: 1319-1322.
11. Damas, P., J. L. Canivet, D. de Groote, Y. Vrindts, A. Albert, P. Franchimont, and M. Lamy. 1997. Sepsis and serum cytokine concentrations. *Crit.Care Med.* **25**: 405-412.
 12. Damas, P., J-L Canivet, D. De Groote, Y. Vrindts, A. Albert, P. Franchimont, M. Lamy. 1997. Sepsis and serum cytokine concentrations. *Cri. Care. Med.* **25 (3)**: 405-412.
 13. Eng, R. H., S. M. Smith, P. Fan-Havard, and T. Ogbara. 1993. Effect of antibiotics on endotoxin release from gram-negative bacteria. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **16**: 185-189.
 14. Fass R. J. 1997. In Vitro Activity of BAY 12-8039, a new 8-Methoxyquinolone. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* **41**: 1818-1824.
 15. Fisher, C. J., J. F. Dhainaut, S. M. Opa, *et al.* 1994. Recombinant human interleukin 1 receptor antagonist in the treatment of patients with sepsis syndrome: Results from a randomized, double-blind, placebo-controlled trial; Phase II rhIL-1ra Sepsis Syndrome Study Group. *JAMA* **271**: 1836-1843.
 16. Gelfand, J. A., R. J. Elin, F. W. Berry, Jr., and M. M. Frank. 1976. Endotoxemia associated with the Jarisch-Herxheimer reaction. *N. Engl. J. Med.* **295**: 211-213.
 17. Greenberger MJ, Strieter RM, Kunkel SL, Danforth JM, Goodman RE, Standiford TJ. 1995. Neutralization of IL-10 increases survival in a murine model of *Klebsiella pneumoniae*. *J Immunol.* **155**: 722-729.
 18. Hlady, W. G., and Klontz, K. C.,(1996)The epidemiology of *Vibrio vulnificus* infection in Florida. (1981-1993) *.Journal of Infections Disease.* **173 (5)**: 1176-1183.
 19. Hopkin, D. A. 1978. Frapper fort ou frapper doucement: a gram-negative dilemma. *Lancet* **ii**: 1193-1194.
 20. Holzheimer, R. G. 1998. The significance of endotoxin release in experimental and

- clinical sepsis in surgical patients - evidence for antibiotic-induced endotoxin release ?
Infection **26**: 77-84.
21. Hua, C. C., L. C. Chang, Y. C. Chen, S.C. Chang. 1999. Proinflammatory cytokines and fibrinolytic enzymes in tuberculous and malignant pleural effusions. *Chest*. **116**: 1292-1296.
 22. Kanako yoshida, Tetsuya matsumoto, Kazuhiro tateda, Kou uchida, Shiro tsujimoto, Keizo yamaguchi. 2001. Induction of interleukin-10 and down-regulation of cytokine production by *Klebsiella pneumoniae* capsule in mice with pulmonary infection. *J. Med. Microbiol.* **50**: 456-461.
 23. Kumamoto, K. S., and Vukich, D. J. (1998) Clinical infections of *Vibrio vulnificus*: A case report and review of the literature. *J. Emer. Med.* **16**: 61-66.
 24. Mock, C. N., G. J. Jurkovich, D. J. Dries, and R. V. Maier. 1995. Clinical significance of antibiotic endotoxin-releasing properties in trauma patients. *Arch. Surg.* **130**: 1234-1240.
 25. Remick, D. G., D. R. Call, S. J. Ebong, D. E. Newcomd, P. Nybom, J. A. Nemzek, and G. E. Bolgos. 2001. Combination immunotherapy with soluble tumor necrosis factor receptors plus interleukin 1 receptor antagonist decrease sepsis mortality. *Cri. Care. Med.* **29** (3): 473-481.
 26. Sawdey, M., T. J. Podor, D. J. Loskutoff, 1989. Regulation if type 1 plasminogen activator inhibitor gene expression in cultured bovine aortic endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **264**:10396-10401.
 27. Schleef, R. R., M. P. Bevilacqua, M. Saudey, M. A. Gimbane, D. J. Loskutoff. 1988. Cytokine activation of vascular endothelium. *J. Biol. Chem.* **263**: 5797-5803.
 28. Van Vlem, B., R. Vanholder, P. De Paepe, D. Vogelaers, and S. Ringoir. 1996. Immunomodulating effects of antibiotics: literature review. *Infection* **24**: 275-291.
 29. Van Hinsberg V. W. M., T. Kooistra, E. A. Van den Berg, H. M. G. Princen, W. Fiers, J. J.

- Emeiss. 1988. Tumor necrosis factor increase the production of plasminogen activator inhibitor in human endothelial cells *in vitro* and in rats *in vivo*. *Blood*. **72**: 1467-1473.
30. Warnock, E. W., and T. L. MacMath. (1993) Primary *Vibrio vulnificus* septicemia. *J. Emer. Med.* **11**: 153-156.
31. Woodcock J. M., J. M. Andrews, F. J. Boswell, N. P. Brenwald, R. Wise. 1997. In Vitro Activity of BAY 12-8039, a New Fluoroquinolone. *Antimicrob Agents and Chemotherapy*. **41**: 101-106.
32. Whawell SA, Thompson JN. Cytokine-induced release of plasminogen activator inhibitor-1 by human mesothelial cells. *Eur. J. Surg.* 1995; **161**: 315-317.