

Bakteriyolojide Hayvan Modelleri- Kısa Derleme

Ömer KÜÇÜKBASMACI(*)

(*)İstanbul Üniversitesi, Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Çapa, İstanbul

ÖZET

Hayvan modelleri günümüzde antimikrobiyal maddelerin denenmesi, bakteri virülansının belirlenmesi, patojenite çalışmaları gibi birçok konuda halen yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu kısa derlemede bakteriyolojide kullanılan hayvan modelleri incelenmiştir.

Anahtar kelimeler: Hayvan modelleri, deneysel infeksiyon, bakteriyoloji

SUMMARY

Animal Models in Bacteriology - Mini review

Today animal models have been used for many purposes including antimicrobial agents, bacterial virulence and pathogenicity studies. In this article we have reviewed the animal models in bacteriology.

Key words: Animal models, experimental infection, bacteriology

GİRİŞ

Hayvanlar 19. yüzyıl ortalarından itibaren hastalıkların bulaşma yollarının ve patogenezinin anlaşılması için kullanılmaktadır. Günümüzde ise hayvanlar antimikrobiyal maddelerinin denenmesi, bakteriyal etkinliklerinin, postantibiyotik etkilerinin (PAE) ölçülmesi, mikroorganizmaların virülans faktörlerinin konakta ve infeksiyondaki rolü gibi birçok farklı amaçla kullanılmaktadır.

Hayvan modellerini; tarama modelleri, bir veya birden fazla parametrelerin incelendiği modeller, ex vivo modeller ve ileri düzeyde tanımlayıcı modeller olarak sınıflandırmak mümkündür. 1) Tarama modelleri yeni bileşiklerin antibakteriyel etkilerini saptamak için kullanılan temel testlerdir. Ölüm/sağkalım gibi son noktalar belirlenerek PD₅₀ (koruyucu doz), ED₅₀ (etkili doz) gibi değerlerin kolay ve hızlı saptanabildiği modellerdir. 2) Bir veya birden fazla parametrelerin incelendiği modeller ise organlardaki bakteri sayıları veya immunolojik parametreler gibi bazı özelliklerin saptandığı basit yöntemlerdir. Bu modellerle herhangi bir etki ile son nokta arasında uyumu veya infeksiyon sürecinde birçok farklı parametreyi çalışmak mümkündür. 3) Ex vivo yön-

temler ise yabancı cisim infeksiyonları gibi insanlardaki özel problemleri taklit eden yöntemlerdir. 4) İleri düzeyde tanımlayıcı modeller insanlardaki infeksiyonu mümkün olduğu kadar iyi yansıtmaya çalışan modellerdir. Antibakteriyellerin testlerinde ve ayrıntılı bakteriyel patogeneze çalışmalarında kullanılır. Hayvanlar tüm deney süresince monitörize edilir (1).

Tarihçe

İn vitro kültür şartları geliştirilmeden önce deney hayvanları çeşitli infeksiyon ajanlarının saptanması ve kültürü için kullanılmıştır. 1870-1880 yılları arasında bozuk kalp kapakçıklarının endokardite neden olabileceği tavşanlarda gösterilmiştir. 20. yüzyılın erken döneminde ise patogenezi anlamak için kullanılan bazı boyaların antibakteriyel etkileri olabileceği gösterilmiştir. 1909 yılında Paul Ehrlich böyle bir arsenik bileşiği olan Salvarsanın tavşanlarda antibakteriyel etkisini göstermiştir. 1911 yılında bir kinin bileşiği olan optokinin antipnömokok etkisi farelerde yapılan deneylerle kanıtlanmıştır (1,2).

Antimikrobiyal kemoterapi tarihinde iki temel kilometre taşı direkt hayvanlarla yapılan çalışmalarla ilişkilidir. Birincisi farelerdeki pnömokok infeksiyo-

nunun, in vitro etkisiz bir sulfonamid bileşiği olan (Prontosil) ile tedavi edilmesidir (3). Bu buluş sistematik bakteriyel infeksiyonların çeşitli bileşiklerle tedavi edilebileceğini göstermesi ayrıca in vivo testlerin antimikrobiyal madde araştırmalarının ayrılmaz bir parçası olduğunu ortaya koyması bakımından çok önemlidir. İkinci kilometre taşı ise penisilindir. Fleming penisilini bulduktan sonra mikroorganizmaları tanımlamak, ayırmak bazen de lokal antiseptik olarak kullanmış, bu bileşiğin sistematik olarak da etkili olabileceğini düşünmemiştir. Florey ve Chain'in tavsiyesiyle penisilin önce saflaştırılmış ardından mükemmel tedavi etkinliği önce farelerde sonra insanlarda gösterilerek kullanılmıştır (4,5). Deney hayvanlarıyla yapılan bu çok değerli çalışmalar bize yepyeni bir çağ olan antibiyotik çağının kapılarını açmıştır.

Hayvan modelleri

1960'dan beri 1000'den fazla hayvan modeli deneysel infeksiyon çalışmaları için tanımlanmıştır. Her biri kendi içerisinde bir antibiyotik geliştirilmesi, tedavi stratejilerinin belirlenmesi, infeksiyon patogenezi aydınlatma gibi çeşitli amaçlar taşımaktadır.

Bakteriyel infeksiyonların yanısıra parazitik, mikotik ve viral infeksiyonlar da tarif edilmiştir (6,7). İdeal deneysel infeksiyonlar mikroorganizmanın insanda oluşturduğu infeksiyonu taklit etmelidir, ayrıca o infeksiyonun tedavisi için kullanımda olan veya yeni geliştirilen antibiyotiklerin tedavi etkinliklerini saptamak için de kullanılabilir. Örnek bir deneysel infeksiyon modeli, konak ve mikroorganizma ilişkisini araştırmak için uygun olmalıdır (Tablo 1).

Günümüze kadar geliştirilen bazı deneysel infeksiyon modelleri bu kriterlerin çoğuna sahiptir. Örneğin tavşan veya sıçanlarda endokardit, immunsuprese kobay veya köpeklerde pnömoni, tavşan veya sıçanlarda osteomyelit, sıçanlarda çeşitli üriner sistem in-

Tablo 1. İdeal bir deneysel infeksiyon modelinin sahip olması gereken özellikler (Kaynak 5'ten alınmıştır).

İnfeksiyon tekniği	Basit
Hastalığa neden olan mikroorganizma, giriş yolu, vücutta yayılımı	İnsanlardakiyle aynı ya da benzer
Doku tutulumu, hastalığın şiddeti, seyri ve süresi	Önceden tahmin edilebilir, tekrarlanabilir, kolayca analiz edilebilir
Tedaviye duyarlılık	Ölçülebilir, tekrarlanabilir

Tablo 2. Sık kullanılan hayvan modellerinden örnekler (Kaynak 1'den değiştirilerek alınmıştır).

Model adı	İnfeksiyon tipi/bölgesi	Hayvan(lar)	Bakteri	Yorumlar (Kaynaklar)
Fare koruma/ Fare peritonit modeli	Sepsis/peritonit	Fare	Çok çeşitli	Kolay, çabuk uygulanabilir, inokulum önemli, tedavi ve profilaksi çalışmaları için uygundur (8,9).
Fare/sıçan peritonit modeli çekal ligasyonu ile	Sepsis/peritonit	Fare/sıçan	Fare bağırsak florası	Klinik peritoniti taklit eder, patofizyoloji ve antibiyotik çalışmaları için uygundur (10).
İntraabdominal abse	Abdominal abse	Fare/sıçan	Çeşitli Gram negatif-anaerob	Jelatin kapsül, fibrin pıhtıları veya fekal peletlerle abse oluşturulması (11).
Fare peritonit yabancı cisim modeli	Periton boşluğu yabancı cisim	Fare	Stafilokok	Uygulaması kolay, kısa anestezide ihtiyaç duyulmakta, tedavi ve profilaksi çalışmaları için uygundur (12).
Fare baldır infeksiyon modeli	Kas	Fare	Çok çeşitli	Kolay, nötropeniye ihtiyaç duyulabilir (13).
Fare baldır dikiş modeli	Cerrahi kas infeksiyonu	Fare	Çok çeşitli	Uygulaması kolay, dikişler kullanılmadan önce bakterilerle inoküle edilir. Patofizyoloji ve antibiyotik çalışmaları için uygundur (14).
Deneysel osteomyelit	Osteomyelit	Sıçan, tavşan, köpek vb.	Çok çeşitli	Deneyime ve cerrahi tecrübeye ihtiyaç duyulmakta, patofizyoloji ve antibiyotik çalışmaları için uygundur (15).
Deneysel artrit	Artrit	Fare, hamster, sıçan vb.	Streptokok, Borrelia burgdorferi, S. aureus vb.	İ.V. uygulamadan sonra akut veya kronik artrit, radyasyon gibi immunomodülasyonlara ihtiyaç duyulmaktadır (16).
Enterik patojenler için hayvan modeli	Gastrointestinal infeksiyon	Çok çeşitli	Shigella sonnei, S.flexneri, Enterotoksik E.coli, Campylobacter jejuni v.b.	Değişik hayvan türlerinde farklı bakterilerle özel patofizyoloji, immunité ve tedavi çalışmaları için uygundur (17).
Deneysel pnömoni modeli	Akut veya kronik pnömoni	Fare, sıçan, tavşan, kobay, köpek vb.	S.pneumoniae, Legionella spp., M.pneumoniae	İnhalasyon veya transtrakeal/intratrakeal inokülasyon, anestezide altında. Genellikle immunsupresyona (siklofosamid, etanol) ihtiyaç duyulmaktadır (18).
Deneysel endokardit modeli	Endokardit	Tavşan vb.	Streptokok, Enterokok, Stafilokok	Kalp kapağının bakteri inokülasyonundan önce hasarlanması gerekir, patofizyoloji ve antibiyotik çalışmaları için uygundur (19,20).
Deneysel üriner sistem infeksiyon Modeli	Üriner sistem	Fare, sıçan vb.	E.coli	Hematojen veya asendan yolla infeksiyon sağlanır, patofizyoloji, antibiyotik çalışmaları için uygundur (21).
Deneysel menenjit modeli	Menenjit	Sıçan, tavşan	S.pneumoniae, H.influenzae, N.meningitidis	Intrasisternal inokülasyon veya yeni doğmuş sıçanlarda intranasal, oral ve intraperitoneal sonrası bakteremiye bağlı olarak, patofizyoloji ve antibiyotik çalışmaları için uygundur (22-24).
Otitis media modeli	Otitis media	Çinçilya, gerbil	S.pneumoniae, Paeruginosa, M.catarrhalis	Direkt transkütanöz inokülasyon veya nazal inokülasyon (25).

feksiyonu ve tavşanlarda menenjit modelleri başarılı deneysel infeksiyon modelleri olarak sayılabilir. Tablo 2’de sıklıkla kullanılan yöntemler ve hangi hayvanlarda yapıldığı verilmiştir. Bunların yanısıra *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae*, *Burkholderia pseudomallei* (melidiyoz), *Chlamydia pneumoniae* (ateroskleroz) gibi bazı infeksiyonlar özel deney hayvanları ve çok özel laboratuvar şartları gerektirmektedir. Tüm modellerde outbred veya inbred hayvanlar kullanılabilirceği gibi hayvanlar immün baskılanmış, cerrahi olarak müdahale edilmiş ya da genetik manüple edilmiş olabilirler. Hayvan modellerinde bakteri virülansı ve/veya konak duyarlılığını değiştirmekte kullanılan belli başlı yöntemler tablo 3’de verilmiştir (1,5).

Tablo 3. Bakteri virülansı/konak duyarlılığını değiştiren maddeler veya tedavi protokolleri (Kaynak 1’den alınmıştır).

Madde/mekanizma	Tahmini etki şekli/yol açtıkları tablo
Kemoterapötikler	İmmüsupresyon
Radyasyon	İmmüsupresyon
Alkol (akut/kronik)	İmmüsupresyon
Kobra venom faktör	Bozulmuş fagositoz
Karbon tetraklorid	Karaciğer sirozu
Steroidler	İmmüsupresyon
Streptozotosin	Diabetes mellitus
Yabancı cisimler	Biofilmler
Musin (mide enzimi)	Bozulmuş makrofaj aktivitesi
Serum (otolog)	İmmümodülasyon
Açlık + antibiyotikler	Bozulmuş bağırsak ekolojisi
Çeşitli cerrahiler	Bozulan sistemler, yapılar v.b.
Genetik manipülasyonlar	İmmün yetmezlik/çeşitli hastalıklar v.b.

Hayvan modellerinin rutin ve araştırma amaçlı kullanımları

Bakterilerin klonlanması ve çeşitli antijenik yapıların in vitro olarak elde edilebilmesi deney hayvanlarının rutin amaçla kullanımı çok azaltılmışsa da günümüzde *Treponema pallidum* gibi kültürü mümkün olmayan bakterilerin pasajları için hayvanlar laboratuvarında halen kullanılmaktadır. Çeşitli hayvanlar genellikle tavşanlar halen çeşitli bakterilere karşı antikor üretilmesinde rutin olarak kullanılmaktadır (*Salmonella*, pnömokok bağışık serumları)(1).

Hayvan modellerinin araştırma amaçlı kullanımı ge-

nellikle beş amaç taşımaktadır: 1) Bakteri ve hastalıklar arasındaki ilişkileri ortaya çıkarmak, 2) Hastalıkların patofizyolojisini ve immün cevabı daha iyi anlamak, 3) Değişik antimikrobiyal maddelerin etkinliklerini, güvenilirliklerini ve farklı tedavi yöntemlerini karşılaştırmak, 4) Profilaksi çalışmaları, 5) Aşı geliştirmek.

1) Bakterilerle hastalıklar arasındaki olası yeni ilişkileri ortaya koymak için kullanılan hayvan modellerine örnek olarak aterosklerozda önemli bir rolü olduğu düşünülen *C. pneumoniae* (26) ve kronik gastrit ve malignitelerle ilişkili *Helicobacter pylori*’yi örnek verebiliriz (27).

2) Çeşitli deneysel infeksiyon modelleriyle yapılan çalışmalar (23,28) menenjit gibi birçok hastalığın patogenezi anlaşılmaya yardımcı olmuşlardır. Ayrıca bakterilerin morfolojik yapıları, aderans özellikleri, sitokinler gibi bir çok konunun aydınlatılmasında önemli rol oynamışlardır. Çeşitli endokardit, pnömöni, abdominal infeksiyon modellerinde hastalığın patofizyolojisi dışında tedavi seçenekleri de çalışılmıştır (1,23,27,29).

3) Günümüzde bakterilerde görülen direnç yeni antibiyotiklerin geliştirilmesini zorunlu kılmaktadır. Hayvan modelleri antibiyotiklerin etkinliklerinin, toksisitelerinin araştırılmasında kullanılmalarının yanısıra o bileşiğin farmakokinetik çalışmalarında da kullanılmaktadır. Bir antibiyotığın optimal dozunun, doz aralıklarının ve tedavi kombinasyonlarının saptanmasında da hayvan modelleri önem taşımaktadır. Örneğin penisiline duyarlılığı azalmış pnömokoklarla oluşturulan pnömöni ve otitis media modellerinde böyle bir infeksiyonun yinede uzun $t_{>mik}$ sağlayan bir beta laktam antibiyotikle tedavi edilebildiği gösterilmiştir(30,31). Genellikle iyi planlanmış deneysel infeksiyon çalışmalarının ivmesiyle, bu tedavi protokolleri klinik çalışmalarda da kullanılmaya başlanmıştır ve başarılı sonuçlar alınmıştır. Bazen de bu modeller insanlarda görülen sonuçların açıklamasına, doğrulanmasına yardımcı olmuşlardır.

Yeni bir antimikrobiyal maddenin geliştirilmesinin, en azından erken bir safhasında deney hayvanları kullanılmaktadır. Bu tip çalışmalar özellikle yeni bileşiğin toksik etkilerini, antimikrobiyal etkinli-

ğini ölçmek amacıyla yapılmaktadır. Çoğu zaman in vivo deneyler klinik çalışmalar ve in vitro antibiyotik duyarlılık sonuçları arasında bağlantıyı sağlayan temel bağ olmaktadır. Geliştirilmekte olan bir antimikrobiyal madde için çalışmaların devam edebilmesinin temel koşullarından biri de o maddenin in vivo koşullardaki etkinliğidir. Deneysel infeksiyon-larla yeni bir antimikrobiyal maddenin etkinliğinin yanısıra farklı antibiyotiklerle kombinasyonların denenmesi, antibiyotığın farmakodinamik özelliklerinin incelenmesi mümkündür (7,32). Erken dönemde antibiyotiklerin değerlendirilmesinde en sık kullanılan temel yöntem in vivo hayvan modelleri olmuştur. Bu yöntemlerin en başlıcası da farelerle yapılan akut sepsis modelidir. Yöntemin kolay uygulanabilir ve ucuz olması, kabaca antibiyotığın in vivo etkili olup olmadığını saptaması avantajlarını teşkil etmektedir. Zamanla insanlardan farklı olarak, bu deneysel infeksiyon modelinin çok hızlı ölümcül olabilmesi, inokulumun sonuçlarda çok etkili olması ve tedavi rejimlerinin genelde profilaktik uygulanabilmesi gibi özellikleri yaygın kullanımını kısıtlamıştır (33,34). Bu modeller yardımıyla spesifik antibiyotiklerin klinik uygulama şekilleri düzenlenmiştir.

4) Sütür gibi cerrahi yöntemlerde, çeşitli yabancı cisimlerin vücuda implantasyonunda ve değişik türden bakterilere karşı antibiyotiklerle yapılan profilaksi çalışmalarında birçok değişik hayvan modeli kullanılmıştır (14). Deney hayvanlarıyla yapılan çalışmalar bize etkin bir profilaksinin hangi doz ve aralıklarla yapılması gerektiğini ve çeşitli infeksiyon bölgelerinde o antibiyotığın ulaştığı doku konsantrasyonu hakkında değerli bilgiler sağlamıştır (1).

5) Genellikle tüm aşuların geliştirilmesinin bir aşamasında deney hayvanları kullanılmıştır. Bu çalışmalar özellikle koruyucu nötralizan antikor üretimini veya spesifik sitotoksik etkiyi arttırmayı hedefleyen çalışmalar olmuştur (1).

SONUÇ

Deneysel infeksiyon modelleri günümüzde yeni bulunan bir antibiyotığın (antiviral, antiparazitik veya antifungal madde de olabilir) etkinliğini ve

tolere edilebilirliğinin insanlarda denenmesinden hemen önceki basamaktır. Ayrıca deneysel infeksiyon modellerinde istatistiksel olarak anlamlı sayıda hayvanla çalışmak mümkündür, çoğu zaman sonuçlar tekrarlanabilir ve değişik bireysel etkiler gözlemlenerek, farklı parametrelerle çalışmak mümkündür. Öte yandan en iyi deneysel infeksiyon modelinin bile bir takım kısıtlamalar içerdiği unutulmamalıdır (5).

Kuşkusuz insanları etkileyen tüm infeksiyon hastalıkları için hayvan modeli bulunmamaktadır. İdeale yakın kimi modelde bile hastalığın seyri ve semptomları çok farklı olabilmektedir. Deneysel infeksiyon ile uğraşan kişiler günümüzde mikroorganizmaların virülans faktörleri gibi birçok farklı özelliklerinin yanısıra konağın indüklenen immünitesi, immünolojik reaksiyonlar, hastalığa eşlik eden patolojik değişiklikler, antimikrobiyal maddelerin doku, serum düzeyleri ve tedavi etkinlikleri gibi birçok alanda çalışmaktadırlar. Tüm bu çalışmalarda, deneysel infeksiyon gitgide daha iyi tanımlanmış mikroorganizma ve daha iyi tanımlanmış konak (deney hayvanı) arasında gerçekleşmektedir. İnfeksiyon hastalığı ile o hastalığın hayvan modeli arasındaki benzer ve benzemeyen yönler bize türler arasındaki çeşitlilik ve belki de infeksiyon hastalıkları tarihiyle ilgili ipuçları vermektedir (35).

İnsan hakları kadar hayvan haklarının da güncel olduğu bu günlerde deneysel infeksiyon modelleri tıba dolayısıyla dünyaya ne kadar büyük katkılar da bulunmuş olursa olsun, yapılacak tüm çalışmalar bilimsel bir amaca hizmet etmeli ve Russell-Burch tarafından "3R" (replacement, reduction, refinement) olarak özetlenen ve hayvanla yapılan çalışmaların yerine geçebilecek yeni yöntemlerin geliştirilmesi, deney hayvanının mümkün olan en az sayıda kullanılması ve deney hayvanları için koşulların iyileştirilmesi, rahat ettirilmesi olarak açıklayabileceğimiz kurallar doğrultusunda planlanmalı ve yapılmalıdır.

KAYNAKLAR

1. Knudsen JD, Frimødt-Møller N: Animal Models in Bacteriology."Schmidt A, Weber OF (eds): Animal models in Infectiology", p1, Contrib Microbiol, Basel, Karger (2001).
2. Morganroth J, Levy R: Chemotherapie der Pneumo-

- kokkeninfektionen. *Berl Klin Wochenschr* 48: 1560 (1911).
3. Domagk G. Ein Beitrag zur Chemotherapie der bakteriellen Infektionen. *Deutsch Med Wschr* 61:250 (1935).
 4. Abraham EP. Fleming's discovery. *Rev Infect Dis* 2:140 (1980).
 5. Zak O, Sande M, O'Reilly T. Introduction: The role of animal models in the evaluation of new antibiotics. "Zak O, Sande MA (eds): Handbook of Animal Models of Infection" p.XXI Academic Press, New York (1999).
 6. Zak O. Scope and limitations of experimental chemotherapy. *Experientia* 36:479 (1980).
 7. Beam TR, Gilbert DN, Kunin CM. General guidelines for the clinical evaluation of anti-infective drug products. *Clin Infect Dis* 15 : S5 (1992).
 8. Frimodt-Moller N, Knudsen JD, Espersen F. The mouse peritonitis/sepsis model. "Zak O, Sande MA (eds): Handbook of Animal Models of Infection" p.127 Academic Press, New York (1999).
 9. Eagle H. The effect of the size rate of the inoculum and the age of the infection of the curative dose of the penicillin in experimental infections with streptococci, pneumococci, and *Treponema pallidum* *J Exp Med* 9:280 (1949).
 10. Mercer-Jones MA, Hadjiminas DJ, Heinzelmann M, Peyton JC, Cook M: Continuous antibiotic treatment for experimental abdominal sepsis: Effect on organ inflammatory cytokine expression and neutrophil sequestration. *Br J Surg* 85: 385 (1998).
 11. Brook I: The role of encapsulated anaerobic bacteria in synergistic infections. *FEMS Microbiol Rev* 13: 65 (1994).
 12. Espersen F, Frimodt-Moller N, Corneliussen L, Rosdahl VT, Skinhoj P: Experimental foreign body infection in mice. *J Antimicrob Chemother* 31: 103 (1993).
 13. Gudmunsson S, Einarsson S, Erlendsdottir H, Mofat J, Bayer W. The postantibiotic effect of antimicrobial combinations in a neutropenic murine thigh infection model. *J Antimicrob Chemother* 31: 177 (1993).
 14. Rouben DP, Fagelman DK, Mc Coy MT, Polk HC. Enhancement of nonspecific host defense against local bacterial challenge. *Surg Forum* 28: 44 (1977).
 15. Cremieux AC, Carbon C. Experimental models of bone and prosthetic joint infection. *Clin Infect Dis* 25: 1295 (1989).
 16. Bremell T, Lange S, Yacoub A, Ryden C, Tarkowski A. Experimental *Staphylococcus aureus* arthritis in mice. *Infect Immun* 59: 2615 (1991).
 17. Etheridge M, Houqe AT, Sack DA: Pathologic study of a rabbit model of shigellosis. *Lab Animal Sci* 46: 61 (1996).
 18. Azoulay-Dupuis E, Vallee E, Bodos JP, Muffat-Joly M, Pocardola JJ. Prophylactic and therapeutic effect of azithromycin in the mouse model of pneumococcal pneumonia. *Antimicrob Agents Chemother* 35: 1024 (1991).
 19. Contrepolis A. Notes on the early history of infective endocarditis and the development of an experimental model. *Clin Infect Dis* 20: 461 (1995).
 20. Carbon C. Experimental endocarditis: A review of its relevance to human endocarditis. *J Antimicrob Chemother* 31: 71 (1993).
 21. Kaijser B, Larsson P. Experimental acute pyelonephritis caused by enterobacteria in animals: A review. *J Urol* 127: 786 (1982).
 22. Dacey R, Sande MA. Effect of probenecid on cerebrospinal fluid concentrations of penicillin and cephalosporin derivatives. *Antimicrob Agents Chemother* 6: 437 (1974).
 23. Scheld WM. Pathophysiological correlates in bacterial meningitis. *J Infect* 3:15 (1981).
 24. Tauber M, Zwahlen A. Animal model for meningitis. *Methods Enzymol* 235: 93 (1994).
 25. Giebink GS, Payne EE, Mills EL, John SK, Quie PG. Experimental otitis media due to *Streptococcus pneumoniae*: Immunopathogenic response in the chinchilla. *J Infect Dis* 134: 595 (1976).
 26. Fong IW. Value of animal models for *Chlamydia pneumoniae*-related atherosclerosis. *Am Heart J* 138: S512 (1999).
 27. Marchetti M, Arico B, Burroni D, Figura N, Rappouli R, Ghiara P. Development of a mouse model of *Helicobacter pylori* that mimics human disease. *Science* 267: 1655 (1995).
 28. Scheld WM. Experimental animal models of bacterial meningitis. "Zak O, Sande MA (eds): Experimental Models in Antibacterial Chemotherapy" Vol 1, p118, Academic Press, London (1986).
 29. Baker CC, Chaudry IJ, Gaines HO, Baue AE. Evaluations of factors effecting mortality rate after sepsis in a murine cecal ligation and puncture model. *Surgery* 94: 331 (1983).
 30. Klugman KP: Pneumococcal resistance to antibiotics. *Clin Microbiol Rev* 3: 171 (1990).
 31. Craig WA, Andes D. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of antibiotics in otitis media. *Pediatr Infect Dis J* 15: 255 (1996).
 32. Beam TR, Gilbert DN, Kunin CM, "The European WorkingParty (eds). European Guidelines for the Clinical Evaluation of Anti-Infective Drug Products" European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (1993).
 33. Miller AK. In vivo evaluation of antibacterial chemotherapeutic substances. *Adv Appl Microbiol* 14: 151 (1971).
 34. Bergeron MG. A review of models for the therapy of experimental infections. *Scand J Infect Dis* 14 :189 (1978).
 35. Contrepolis A, Moulin AM. Early history of animal models of infection. "Zak O, Sande MA (eds): Handbook of Animal Models of Infection" p.3 Academic Press, New York (1999).