

Bruselloz İçin Yeni Bir Deneysel Hayvan Modeli

Zeki YUMUK(*), Şeyda ÇALIŞKAN(*), Devrim ÖZTÜRK DÜNDAR(*), Volkan DÜNDAR(*)

(*) Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kocaeli

ÖZET

Bruselloz insanlara hayvanlardan geçen ve özellikle gelişmekte olan ülkelerde sık görülen bir enfeksiyondur. Hastalığın tedavisinde ikili antibiyotik kombinasyonu önerilmektedir. Hayvan deneyleri ile bazı antibiyotiklerin etkili olduğu gösterilmiş olmasına rağmen, bu sonuçlar klinikteki yüksek relaps oranlarıyla örtüşmemektedir. Bu nedenle uygulanmakta olan hayvan modelinin gözden geçirilmesi gerektiği düşünülerek, halen kullanılan intraperitoneal bulaşma yoluna alternatif, doğal bulaşma yolu denenmiştir. Bunun için Wistar sıçanlar kilolarına göre eşleştirilerek iki gruba ayrılmış, eşlerden biri vektör, diğeri hedef sıçan grubuna dahil edilmiştir. Her kafesteki vektör sıçana intraperitoneal yolla *B.melitensis* injekte edilmiş ve vektör sıçanın hedef sıçana enfeksiyonu bulaştırabilmesi için 7 gün eşler aynı kafeste tutulmuştur. Bu sürenin sonunda hedef gruptaki sıçanların hepsine bulaşma olduğu görülmüştür. Sonuç olarak deneysel bruselloz çalışmalarında kullanılan hayvan modelinde bulaşma yolu olarak doğal yol kullanılmasının, klinik sonuçlarla daha iyi örtüşecek veriler elde edilmesini sağlayacağı düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: Bruselloz, tedavi, hayvan deneyi, doğal bulaş

SUMMARY

A New Experimental Animal Model for Brucellosis

Brucellosis is a disease which infects human by infected animals and can be seen frequently in developing countries. Combination of two antibiotics is recommended in the therapy of this infection. Despite the efficacy of some antibiotics was demonstrated in animal models, the results are not well correlated with relapses seen in the clinical administrations. Therefore, existence animal model needs to be reevaluated by using natural route of exposure instead of intraperitoneal inoculation of the bacteria. Wistar rats were matched by weight and paired so that one rat of pair was assigned as vector while second rat was target. All vector rats in each cage were inoculated with *B.melitensis* intraperitoneally. The period for naturally transmission of the disease from vectors to targets was presumed to be seven days. At the end of 7 days period, all rats in the target group were infected. As a result, the rout of natural transmission in experimental animal model is more reliable than intraperitoneal inoculation in the field of antibiotic researches which might have well correlations with clinical outcomes.

Key words: Brucellosis, therapy, animal experiment, natural transmission

GİRİŞ

Bruselloz evcil ve vahşi hayvanlarda görülen ve insanlara hayvanlardan bulaşan bir zoonotik hastalıktır (1). İnsanlara infekte sığır, koyun, keçi ve diğer geviş getiren hayvanlardan temas veya infekte ürünlerin tüketilmesi ile bulaşmaktadır (2). Hastalık hayvanlarda

abortus meydana getirdiği için büyük ekonomik kayıplara neden olmaktadır (3). İnsan brusellozu tüm dünyada, özellikle gelişmekte olan ülkelerde yaygın olarak görülmektedir (4). Özellikle *B.melitensis* ile meydana gelen enfeksiyonlar daha ağır seyretmektedir. İnsan brusellozunda relaps ve tedavi başarısızlığına sık rastlanmaktadır (5). İnsanları brusellozdan koruyabilecek etkili bir aşı henüz geliştirilemediği için hastalık önemini korumaktadır (6).

Brusellozdan korunmada etkili olabilecek aşı çalış-

İletişim : Zeki Yumuk
e-posta: zyumuk@isbank.net.tr

maları hızla devam etmektedir. Aşı oluşturulabilecek bir Brucella suşu oluşturma konusunda önemli mesafe kaydedilmiştir. Aşı yapımında kullanılacak suşun i) hücrel immüniteyi uyarması için canlı olması gerektiği ii) aşılı ve infekte hayvanların ayırd edilebilmesi için hücre duvarında oligopolisakkarit (OPS) bulunmaması gerektiği önerilmektedir (6). Bu tarz bir aşı suşunun geliştirilebilmesi için Brucella türlerine ait genomik çalışmalara büyük umut bağlanmıştır (7). Bruselloz tedavisinde ise yeni antibiyotikler tekrar denenmektedir. Monoterapinin mevcut antibiyotiklerle relapsı önleyebilmesinin mümkün olmayacağı sonucuna varıldığı için kombine antibiyotik tedavileri üzerinde daha çok durulmaktadır (8). Dünya Sağlık Örgütü'nün 1986 yılında önerdiği doksisisiklin ve rifampisin kombinasyonu beklenen başarıyı sağlamamıştır (9). Klinik gözlemler sonucunda tetrakisiklin ve streptomisin kombinasyonunun doksisisiklin ve rifampisin kombinasyonundan daha etkili olabileceği kanısına varılmıştır, ancak bu kombinasyonda da relaps ve tedavi başarısızlığı %7-12 oranında görülebilmektedir (10).

Klinik çalışmaların yanında deneysel hayvan modelleri de aşı ve tedavi çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (11). Yarım asır önce geliştirilen deneysel bruselloz hayvan modeli tedavide etkili olabilecek, relaps ve tedavi başarısızlığının daha az görülebileceği bir tedavi şekli geliştirebilmek amacıyla günümüzde de kullanılmaktadır (12). Bu modelde fare veya sıçan diğer deney hayvanlarına kıyasla daha fazla tercih edilmektedir. Fare ve sıçanların insan brusellozunu daha iyi yansıttığı yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur (13). Kısaca model şu şekilde uygulanmaktadır; hayvana B.melitensis intraperitoneal yoldan 2×10^5 cfu, 0.5 ml serum fizyolojik içerisinde verilmektedir. İnsandakine benzer brusella infeksiyonunun gelişebilmesi için yaklaşık bir hafta beklenmektedir (14,15). Bakterinin verilmesinden bir hafta sonra tedavi oral veya intraperitoneal yoldan uygulanmaktadır. Tedavinin etkinliği hayvanın dalak ve karaciğerinden bakterinin tamamen temizlenmesi veya sayısının azalması kriterine göre değerlendirilmektedir. Bu metot kullanılarak denenen antibiyotik veya antibiyotik kombinasyonlarının tamamen kür sağladığı veya relapsı azalttığı yapılan yayınlarda

gösterilmiş olmasına rağmen, bunun insandaki tedavi başarısını ve relapsı yansıtmada yetersiz kaldığı görülmektedir (13). Antibiyotiklerin bruselloz hastalığındaki etkisinin araştırılmasına olanak sağlayan ve uzun yıllardan beridir kullanılan mevcut modelin, tedavi başarısını ve relapsları göstermede klinik verilere yakın sonuçlar verebilecek şekilde tekrar değerlendirilmesi gerekmektedir. Metot tekrar gözden geçirildiğinde deney hayvanına B.melitensis bakterisinin bulaştırılma şeklinde bir değişiklik önerilebileceği düşünülmüştür. Bakteri mevcut modelde intraperitoneal yolla bulaştırılmaktadır. Doğal bulaşma şeklinin genellikle kontamine bir hayvansal ürünün sindirim yoluyla alınması veya infekte hayvanla direkt temas yoluyla olduğu bilinmektedir. Cinsel temasta hastalığın bulaştığı gösterilmiş olmasına rağmen, bunun insandan insana bulaşmada çok önemli bir bulaşma yolu olmadığı düşünülmektedir (3).

Bu çalışmanın amacı mevcut modeli gerçeğe daha fazla yakınlaştırmaktır. Bu nedenle bakterinin bulaştırılma şekli intraperitoneal yerine hayvanların birbirlerine temaslarına olanak veren doğal yol olarak değiştirilmiştir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Deney hayvanları ve çalışma şekli

Çalışmada kullanılan ve ağırlıkları 150-180 gr arasında değişen 18 adet (17 erkek, 1 dişi) Wistar sıçan Kocaeli Üniversitesi Deneysel Hayvan Araştırması Bölümünden (DETAB) sağlanmıştır. Bu ratlar kilolarına göre eşleştirilerek iki gruba ayrılmıştır. Eşlerden biri vektör (n:9) diğeri ise hedef sıçan grubuna (n:9) dahil edilmiştir. Eşleştirilen sıçanlar aynı kafese konulmuştur. Sıçanların ait olduğu grupların karıştırılmaması için hedef grubundaki sıçanlar tırnak boyası ile işaretlenmiştir. Her kafeste bulunan eş sıçanlardan vektör grubuna ait olanlara B.melitensis intraperitoneal yoldan injekte edilmiştir. Sıçanların çalışma boyunca su ve katı besine kesintisiz olarak ulaşabilmeleri sağlanmıştır.

Bakteri ve kültür koşulları

Çalışmamızda Pendik Veterinerlik Enstitüsü'nden temin edilen B.melitensis 16M standart suşu kullanılmıştır. Sağlanan suştan kültür Brucella agar besiyerinde (Difco, Detroit, MN, USA) bakteriler loga-

ritmik faza girinceye kadar 37 °C'de yapılmıştır. Kültürde üreyen bakteriler kullanılıncaya kadar 4°C'de saklanmıştır. Deney hayvanlarından izole edilen *B. melitensis* tanısı bakterinin koloni şekline, yapısına, üreme tipine ve Gram boyalı preparattaki görüntülerine göre yapılmıştır.

Deneyel *B.melitensis* infeksiyon modeli

Logaritmik fazdaki *B.melitensis* 16M suşlarından sereum fizyolojik içinde 2×10^5 - 4×10^5 canlı hücre (cfu) içeren bir karışım hazırlanmıştır. Bu karışımdan her bir kafesteki vektör sıçanlara 0,5 ml intraperitoneal yoldan uygulanmıştır. Vektör sıçanların hedef sıçanlara infeksiyonu bulaştırabilmesi için 7 gün farklı gruptaki iki eş sıçanın aynı kafeste yaşamasına izin verilmiştir.

İnokülasyon yapıldıktan 7 gün sonra tüm sıçanların vücut ağırlıkları tartılmış ve kaydedilmiştir. Aseptik koşullarda sıçanların dalak ve karaciğerleri çıkartılıp tartılmış ve kaydedilmiştir. Sıçanların dalak ve karaciğerlerindeki *B.melitensis* sayısının belirlenmesi için küçük bir doku parçası 1 ml steril serum fizyolojik içerisinde homojenize edilmiştir. Homojenize edilen solüsyondan 0,1 ml, serum fizyolojik ile 10 kat dilüe edildikten sonra *Brucella* agara ekilmiştir. Ekimler 37°C'de 72-96 saat inkübe edildikten sonra koloni sayımı yapılmıştır. Her ekim 3 defa tekrar edilmiştir. Elde edilen değerlerin ortalaması alınarak kaydedilmiştir. İnkübasyonun dördüncü gününde

kültürlerde üreme görülmemiş ise kültürler steril kabul edilmeden önce 3 gün daha inkübe edilmiştir.

İstatistiksel analiz

Vektör ve hedef grubundaki sıçanların karaciğer ve dalaklarından izole edilen canlı bakteri sayısı (cfu), vücut, dalak ve karaciğer ağırlıkları ve organ/vücut oranları Mann-Whitney U testi kullanılarak karşılaştırılmıştır. $P < 0.05$ olması durumunda aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

BULGULAR

Vektör ve hedef grubundaki sıçanların ağırlıkları günlük olarak kayıt edilmiştir. Her gün yapılan fizik muayenede çalışma boyunca sıçanlarda infeksiyona ait bulguya ve sıçanların vücutlarında infeksiyonun bulaşmasına neden olabilecek hiç bir lezyona rastlanmamıştır. Hedef gruptaki sıçanların hepsinde *Brucella* bakterisi saptanmıştır. Bu da infeksiyonun doğal yoldan bulaştığını göstermektedir. Vektör grubundaki sıçanların dalaklarından izole edilen bakteri sayısı hedef grubundaki sıçanların dalaklarından izole edilen bakteri sayısından istatistiksel olarak anlamlı derecede fazla bulunmuştur ($p < 0.05$) (Tablo 1). Vektör grubundaki sıçanların karaciğerlerinden izole edilen bakteri sayısı hedef grubundaki sıçanların karaciğerlerinden izole edilen bakteri sayısından istatistiksel olarak anlamlı derecede fazla bulunmuştur ($p < 0.05$) (Tablo 2).

Tablo 1. Dalaktan izole edilen *B.melitensis* sayısı

ÇİFTLER	HEDEF GRUBU				VEKTÖR GRUBU			
	Dalak ağırlığı (g)		CFU/dalak ağırlığı*		Dalak ağırlığı (g)		CFU/dalak ağırlığı*	
	Tümü	Parça**	Ortalama	SD	Tümü	Parça**	Ortalama	SD
1	0.83	0.24	2.3316	0.0327	0.99	0.25	3.0080	0.1139
2	0.97	0.20	2.2250	0.1916	0.83	0.20	3.0155	0.1582
3	0.83	0.13	1.8494	0.2645	0.82	0.21	2.9509	0.1021
4	0.85	0.19	1.7480	0.2565	0.93	0.22	3.0315	0.1356
5	0.76	0.21	2.0000	0.2295	0.88	0.19	3.0943	0.2465
6	0.91	0.22	2.3525	0.2909	1.02	0.23	3.0447	0.1572
7	1.13	0.25	1.7787	0.3181	1.21	0.26	2.9301	0.1536
8	0.74	0.31	2.0871	0.1203	0.81	0.18	2.9917	0.0950
9	0.86	0.20	2.3418	0.1928	0.79	0.22	2.9334	0.0861
Grup Ortalaması SEM			2.08±0.08				3.00±0.18	

* Organdan izole edilen bakteri sayısı gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı derecede farklı bulunmuştur $p < 0.01$

** 1 ml steril serum fizyolojik içinde homojenize edilen doku parçası

Her iki gruptaki sıçanların vücut, dalak, karaciğer ve organ/vücut ağırlığı oranları karşılaştırılmıştır. Her iki gruptaki sıçanların benzer değerlere sahip olduğu ve gruplar arasında istatistiksel anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür ($p>0.05$).

TARTIŞMA

Bruselloz hastalığında uygulanan antibiyotik tedavisi semptomların geçmesine, hastalığın süresinin kı-

selozu ağır seyredebilmektedir ve etkili bir tedavi uygulanmadığında hastalık ölümle sonuçlanabilmektedir (1). İn vitro duyarlılık testleri *Brucella* cinsi bakteriler intrasellüler yerleşim gösterdiği için doğru sonuç vermemektedir. Bruselloz tedavisinde deneysel hayvan çalışmaları bu nedenlerle büyük önem kazanmıştır (13). Bu çalışmada, mevcut deneysel bruselloz hayvan modeli yeniden değerlendirilmeye alınmıştır.

Tablo 2. Karaciğerden izole edilen *B.melitensis* sayısı

ÇİFTLER	HEDEF GRUBU				VEKTÖR GRUBU			
	Karaciğer ağırlığı (g)		CFU/karaciğer ağırlığı*		Karaciğer ağırlığı (g)		CFU/dalak ağırlığı*	
	Tümü	Parça**	Ortalama	SD	Tümü	Parça** (g)	Ortalama	SD
1	9,17	0,1503	1,435	0,524	8,23	0,1503	1,812913	0,7242759
2	7,24	0,4465	1,041	0,578	8,22	0,4465	2,041393	0,69897
3	7,05	1,0057	1,644	0,734	9,25	1,0057	1,61595	0,544068
4	9,51	0,1248	2,138	0,391	8,56	0,1248	1,238046	0,4913617
5	7,87	0,3681	0,984	0,542	8,81	0,3681		
6	9,39	0,4568	0,855	0,957	9,59	0,4568	1,96708	0,8573325
7	9,57	0,1898	1,752	0,768	8,16	0,1898	1,696356	0,968483
8	9,18	0,4789	1,445	0,223	9,18	0,4789	1,758155	0,3222193
9	7,25	0,2458	1,100	0,475	9,25	0,2458	2,147058	0,1760913
Grup ortalaması			1.377±0.5769				1.785±0.597	

* Organdan izole edilen bakteri sayısı gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı derecede farklı bulunmuştur $p<0.01$

** 1 ml steril serum fizyolojik içinde homojenize edilen doku parçası

salmasına neden olmaktadır (4). Tedavi uygulanan hastalarda hastalığa bağlı hayatı tehdit edici komplikasyon sıklığı azalmaktadır. Tek bir antibiyotik ile hastalığın tedavisi nüks nedeniyle tercih edilmemektedir. Bu nedenle ikili, hatta komplikasyonların tedavisinde bazen üçlü antibiyotik kombinasyonları önerilmektedir (8). Dünya Sağlık Örgütü yetişkin bruselloz tedavisinde doksisisiklin (200 mg/gün) ve rifampisin (600 – 900 mg/gün) kombinasyonunu en az 6 hafta süreyle kullanılacak şekilde önermektedir. Bazı araştırmacılar streptomisin ve tetrasiklin kombinasyonunu bruselloz tedavisinde doksisisiklin ve rifampisin kombinasyonu tedavisine göre daha başarılı bulduklarını yayınlamıştır (9). Bir çok antibakteriyel ajan bulunmasına rağmen bruselloz tedavisine henüz istenen başarı, nükslerin önlenmesi açısından sağlanamamıştır. Hastalığa bağlı komplikasyon geliştiğinde (örneğin endokardit, menenjit) uygulanan tedavi bazen yetersiz kalabilmektedir (8). İnsan bru-

Bu çalışmada, bir kısım sıçana (hedef) doğal yolla brusellozu bulaştırmak üzere aracı sıçanlar (vektör) kullanılmıştır. Vektör grubundaki sıçanlara infeksiyon, mevcut modelde anlatıldığı gibi intraperitoneal enjeksiyon şeklinde bulaştırılmıştır. Hedef grubundaki ratlar ise hastalığı doğal yollarla (örneğin salya, solunum gibi) vektör grubundaki sıçanlardan almıştır. Bir tanesi haricinde sıçanların hepsi erkek olduğundan, bulaşmada cinsel ilişkinin rolü incelenmemiştir. Deney sonunda her iki gruptaki sıçanların dalak ve karaciğerlerinde bakteri izole edilmiştir. Bu bulgu hastalığın deneysel ortamda doğal yollardan bulaşabileceğini göstermektedir. Vektör grubundaki sıçanların dalak ve karaciğerlerinden hedef grubundaki sıçanların dalak ve karaciğerlerinden izole edilen bakteriden daha fazla sayıda bakteri izole edilmiştir. Gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

Brusellozun tedavisinde hücrel immün yanıt

önemli rol oynamaktadır. Ancak çoğu zaman hücrel immün yanıt hastalığın iyileşmesinde yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle tedavide antimikrobiyal ajanlara ihtiyaç duyulmaktadır. Yapılan klinik çalışmalarda hastalığın erken döneminde antibiyotik tedavisine başlamanın hastalığın daha geç döneminde antibiyotik tedavisine başlanmasına göre tedavide daha fazla başarısızlığa ve nükslere neden olduğu gösterilmiştir. Bu fenomen deneysel hayvan çalışmalarında da gösterilmiştir. Bunun nedeni olarak immün sistemin antibiyotikler nedeniyle bakteriyle yeterli temasta bulunamaması sonucunda yeterli yanıt oluşturamaması gösterilmektedir. Gerçekte antibiyotiklerin immün yanıtın oluşması üzerine etkisi olup olmadığı çalışmalarda tam olarak gösterilememiştir (3). Bu nedenlerle tedavide bakteri sayısı ve immün sistemin oluşturduğu yanıt büyük önem kazanmaktadır. Mevcut modelde *B.melitensis* intraperitoneal yolla sıçanlara inoküle edildiğinden injekte edilen bakteri sayısı doğal sonucu yansıtamamaktadır. Ayrıca bilindiği gibi sindirim sistemi aracılığıyla alınan bakteriler barsak mukozasından geçtikten sonra immün sisteme ait profesyonel veya profesyonel olmayan fagositer hücrelerle karşılaşmakta ve bu hücreler immün yanıtın oluşmasında önemli rol oynamaktadır (16). Mevcut modelde intraperitoneal yolla bakterinin inokülasyonu bu tarz etkileşime izin vermediği için doğal durumu yansıtamamaktadır.

Bu çalışmaya benzer şekilde domuzlara intrakonjunktival, intravenöz ve subkutanöz yollarla bakterinin verilmesi bir başka çalışmanın konusunu oluşturmuştur (17). Bahsedilen çalışmada, intrakonjunktival yolun denenen diğer yollardan daha doğal bir model oluşmasına yardımcı olduğu yayınlanmıştır. Aynı şekilde bir başka çalışmada aşı geliştirilmesine katkısı olabileceği düşünülerek sıçanlara *B.melitensis* bakterisi intrakonjunktival yolla inoküle edilmiş, elde edilen sonuç başarılı olarak değerlendirilmiştir (18). Yayınlanmış hiç bir çalışmada konu bizim bu çalışmamızdaki şekliyle ele alınmamıştır. Bruselloz tedavisinde kullanılan antimikrobiyal ajanların klinik kullanıma girmesinde büyük öneme sahip olan mevcut deneysel bruselloz hayvan modelinin geliştirilmesi gerekmektedir. Hastalığın tedavisinde yaşanan sorunların çözüm yolunun deneysel hayvan

modelleri olduğu düşünülmektedir.

SONUÇ

İntraperitoneal bulaştırma şeklinin kullanıldığı hayvan modeli sonuçları klinik uygulama sonuçlarıyla tam örtüşmemektedir. Burada sorunun intraperitoneal veriliş yolu olabileceği düşünülmüştür. Bu çalışmayla deney hayvanlarına infeksiyonun doğal yolla %100 bulaştırılabildiği gösterilmiştir. Bundan sonra yapılacak deneysel hayvan modelleriyle bruselloz tedavi çalışmalarında doğal bulaşma yolu kullanılırsa klinik uygulamayla daha uyumlu sonuçlar alınabileceği kanısına varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Corbel M J and MacMillan A P : Brucellosis. " L. Collier A, Balows and M. Sussman (eds.): Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections", p. 819, Georgina Bentliff, U.K. (1998).
2. Corbel M J, Brucella. Collier L, Balows A, Sussman M (eds.): Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infection, p. 829, Georgina Bentliff, UK (1998).
3. Corbel M J : Brucellosis: an overview. *Emerg Infect Dis* 3:213 (1997).
4. Young E J : An overview of human brucellosis. *Clin Infect Dis* 21:283 (1995).
5. Koneman E W, Allen S D, Janda W M, Schreckenberger P C and Winn W C (eds.): *Diagnostic Microbiology*, p.395 J. B. Lippincott, Philadelphia (1997).
6. Ko J and Splitter G A : Molecular host-pathogen interaction in brucellosis: current understanding and future approaches to vaccine development for mice and humans. *Clin Microbiol Rev* 16:65 (2003).
7. Boschirolu M L, Foulongne V and O'Callaghan D : Brucellosis: a worldwide zoonosis. *Curr Opin Microbiol* 4:58. (2001)
8. Madkour M M : Brucellosis: Overview. " M. M. Madkour M M (ed.): *Madkour's Brucellosis.*" p.1 Springer,Verlag, Germany (2001)
9. Young E J : Brucella species. " Mandell G L , Bennett J E, and Dolin R (eds.), *Principles and Practice of Infectious Disease.*" p. 2386 Churchill Livingstone, New York, NY 10011 (2002).
10. Solera J: Treatment of human brucellosis. *J Med Liban* 48:255 (2000).
11. Lang R, Shasha B, Ifrach N, Tinman S and Rubins-

tein E : Therapeutic effects of roxithromycin and azithromycin in experimental murine brucellosis. *Chemotherapy* 40:252 (1994).

12. Shasha B, Lang R and Rubinstein E : Therapy of experimental murine brucellosis with streptomycin, co-trimoxazole, ciprofloxacin, ofloxacin, pefloxacin, doxycycline, and rifampin. *Antimicrob Agents Chemother* 36:973 (1992).

13. Shasha B, R Lang and Rubinstein E: Efficacy of combinations of doxycycline and rifampicin in the therapy of experimental mouse brucellosis. *J Antimicrob Chemother* 33:545 (1994).

14. Yumuk Z, Küçükbaşmacı O, Büyükbaba Boral O, Küçükkerem Ang M and Dündar V: The effects of streptomycin-induced diabetes on brucellosis of rats. *FEMS Immunol Med Mic* 39:275 (2003).

15. Yumuk Z, Özdemirci S, Erden B F and Dündar V: The effect of long-term ethanol feeding on *Brucella melitensis* infection of rats. *Alcohol Alcohol* 36:314 (2001).

16. Dornand J, Gross A, Lafont V, Liautard J, Olliaro J and Liautard J P: The innate immune response against *Brucella* in humans. *Vet Microbiol* 90:383 (2002).

17. Stuart F A, Corbel M J and Brewer R A: Experimental *Brucella abortus* infection in pigs. *Vet Microbiol* 14:365 (1987).

18. Mense M G, Van De Verg L L, Bhattacharjee A K, Garrett J L, Hart J A, Lindler L E, Hadfield T L and Hoover D L : Bacteriologic and histologic features in mice after intranasal inoculation of *Brucella melitensis*. *Am J Vet Res* 62:398 (2001).