

## The study of serum cytokine profile in patients with chronic and acute brucellosis

Khadijeh Khosravi<sup>1</sup>, Nader Zarinfar<sup>2</sup>, Ehsanollah Ghaznavi Rad<sup>1</sup>, Ghasem Mosayebi<sup>1\*</sup>

1- Molecular and Medicine Research Center, Department of Microbiology and Immunology, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran.

2- Department of Infection Diseases, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran.

Received: 13 Jan 2015, Accepted: 25 Feb 2015

### Abstract

**Background:** *Brucellosis* is a highly *contagious* zoonotic disease between humans and animals known for high frequency of relapsing and *ability* to cause *chronic* infection. The function of immune system plays an important role in induction of chronic diseases. However, the role of immune system response is not completely studied. Therefore, this study designed to investigate the cytokine profile of the patients suffering from chronic and acute brucellosis.

**Materials and Methods:** This descriptive- analytical study was performed on 22 patients with acute brucellosis (mean age 38±17), 21 patients with chronic brucellosis (mean age 43±10) and 21 healthy people (mean age 26±4) with the same age and sex as patients. The serum IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-5 and TGF-  $\beta$  levels were measured using ELISA method.

**Results:** The mean IFN- $\gamma$  serum level in acute and chronic brucellosis patients group was significantly higher than control group ( $p=0.045$ ). The mean IL-17 serum level in acute brucellosis patients was significant decreased once compared with control group and in chronic patients was significantly decreased when compared with control group ( $p=0.024$ ). In addition, the mean IL-5 and TGF- $\beta$  serum levels of acute brucellosis patients group were significantly decreased as compared to chronic patients ( $p=0.001$ ).

**Conclusion:** The results of current study indicate that cytokine profile of chronic brucellosis patients is more related to Th2 immune response. Hence, Th2 immune response inhibition would be an appropriate way to treat and prevent disease to become chronic.

**Keywords:** Acute, Brucellosis, Chronic, Cytokines

\*Corresponding Author:

Address: Department of Microbiology and Immunology, Molecular and Medicine Research Center, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

Email: gmosayebi@yahoo.com

## بررسی پروفایل سیتوکاینی در سرم بیماران مبتلا به بروسلوز حاد و مزمن

خدیجه خسروی<sup>۱</sup>، نادر زرین فر<sup>۲</sup>، احسان اله غزنوی راد<sup>۳</sup>، قاسم مسیبی<sup>۴\*</sup>

۱- دانشجوی ارشد میکروب شناسی، گروه میکروب و ایمنی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

۲- دانشیار بیماریهای عفونی، گروه عفونی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

۳- دانشیار، میکروب شناسی، گروه میکروب و ایمنی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

۴- استاد ایمنی شناسی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، گروه میکروب و ایمنی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۰/۲۳ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۲/۶

### چکیده

**زمینه و هدف:** بیماری بروسلوز یک بیماری عفونی قابل انتقال بین انسان و دام می باشد که با عود فراوان و قابلیت مزمن شدن مشخص می شود. عملکرد سیستم ایمنی در مزمن شدن این بیماری نقش دارد. از آن جا که پاسخ های ایمنی در بروسلوز انسانی کمتر بررسی شده است، در این مطالعه پروفایل سیتوکاینی در افراد مبتلا به فرم حاد و مزمن این بیماری مورد ارزیابی قرار گرفت.

**مواد و روش ها:** این مطالعه توصیفی-تحلیلی، بر روی ۲۲ بیمار مبتلا به بروسلوز حاد (با میانگین سنی  $38 \pm 17$ )، ۲۱ بیمار مبتلا به بروسلوز مزمن (با میانگین سنی  $43 \pm 10$ ) و ۲۱ فرد سالم (با میانگین سنی  $26 \pm 4$ ) که از نظر سنی و جنسی با بیماران انطباق داشتند، انجام گرفت. مقادیر  $IFN-\gamma$ ،  $IL-17$ ،  $IL-5$  و  $TGF-\beta$  سرمی با استفاده از روش الایزا اندازه گیری شد.

**یافته ها:** میانگین سطح سرمی  $IFN-\gamma$  در مبتلایان به بروسلوز حاد و مزمن در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی داری را نشان داد ( $p=0/045$ ). میانگین  $IL-17$  در سرم مبتلایان به بروسلوز حاد در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی دار و در سرم مبتلایان به بروسلوز مزمن در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی داری را نشان داد ( $p=0/024$ ). هم چنین، میانگین سطح سرمی  $IL-5$  و  $TGF-\beta$  در مبتلایان به بروسلوز حاد در مقایسه با فرم مزمن به طور معنی داری کمتر بود ( $p=0/001$ ).

**نتیجه گیری:** این یافته ها نشان می دهد که الگوی سیتوکاینی در فرم مزمن بیماری بروسلوز بیشتر به  $Th2$  وابسته می باشد. از این رو، مهار پاسخ  $Th2$  می تواند راهکاری مناسب در درمان بیماری و جلوگیری از مزمن شدن آن باشد.

**واژگان کلیدی:** حاد، بروسلوز انسانی، مزمن، سیتوکاین

\*نویسنده مسئول: اراک، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، گروه میکروب و ایمنی

Email: gmosayebi@yahoo.com

## مقدمه

گونه‌های بروسلا باکتری‌های گرم منفی، بی‌هوازی اختیاری و درون سلولی هستند که عامل بیماری بروسلوز (تب مالت) در انسان و حیوان می‌باشند. بیماری بروسلوز در بسیاری از کشورهای در حال توسعه بومی است و خسارات زیادی به دام‌ها و محصولات آن‌ها وارد می‌سازد (۱). این بیماری شایع‌ترین عفونت باکتریایی مشترک بین دام و انسان است و سالانه بیش از نیم میلیون نفر را مبتلا می‌سازد. گونه‌های بروسلا اغلب به سلول‌های سیستم رتیکولاندوتلیال هجوم می‌برند و می‌توانند در ماکروفاژهای آلوده مستقر در نقاط مختلف بدن از جمله طحال، مغز، قلب، کبد و مغز استخوان باقی بمانند. اکثر بیماران بعد از ابتلا وارد فاز حاد بیماری همراه با تب مواج می‌شوند و کم‌کم به سمت بهبودی پیش می‌روند، اما متأسفانه در ۱۰ تا ۳۰ درصد موارد بیماری مزمن می‌شود (۱، ۲).

علائم بیماری در انسان شامل تب بالا، کاشکسی، رخوت و بی‌حالی، آرتریت و اسپلنومگالی می‌است. باکتری در دام‌ها به دلیل استفاده از اریتریتول موجود در تروفوبلاست‌های جفت به عنوان منبع کربوهیدرات سبب سقط جنین می‌گردد (۳).

تلاش‌های زیادی در زمینه تولید واکسن انسانی موثر برای این بیماری صورت گرفته است، اما متأسفانه موفقیت‌های محدود و ناچیزی در این زمینه حاصل شده است. پاسخ ایمنی به عفونت بروسلا بسته به میزبان، گونه و سویه بروسلا بسیار متفاوت است (۴).

علی‌رغم اهمیت بیماری بروسلوز، اطلاعات بسیار محدودی در زمینه کنترل ایمونولوژیک این بیماری در انسان وجود دارد. اغلب اطلاعات موجود در زمینه ایمنی در برابر بروسلوز از مطالعه بر روی مدل‌های حیوانی به دست آمده است و چنین بررسی‌هایی روی مبتلایان به بروسلوز بسیار محدود می‌باشد. مطالعات نشان می‌دهد اگرچه به هنگام ابتلا به بیماری بروسلوز برضد عامل این بیماری در بدن آنتی‌بادی تولید می‌شود، ولی ایمنی سلولی نقش اساسی را در دفاع و بهبودی از عفونت دارد (۵).

نقش سایتوکاین‌ها در برقراری مقاومت در این بیماری بیشتر در موش مطالعه شده است. بر این اساس ۱۲-IL از طریق تولید IFN- $\gamma$  نقش بسزایی در ایجاد پاسخ Th $\gamma$  و در نهایت پیدایش مقاومت در برابر عفونت‌های داخل سلولی دارد. IFN- $\gamma$  یکی از عوامل مهم کنترل عفونت با پاتوژن‌های میکروبی داخل سلولی است، تجویز IFN- $\gamma$  نوترکیب به موش موجب افزایش مقاومت در برابر آلودگی با بروسلا آبورتوس می‌شود، به طوری که یک هفته بعد از آلودگی تعداد باکتری‌های موجود در طحال موش ده برابر کاهش می‌یابد. IFN- $\gamma$  از طریق فعال کردن عملکرد ضد بروسلاهای ماکروفاژها به واسطه‌ی تشدید تولید واسطه‌های فعال اکسیژنی موجب افزایش مقاومت می‌شود (۳-۱، ۶، ۷).

با توجه به اهمیت لنفوسیت‌های T در القا پاسخ‌های ایمنی، اطلاعات محدودی در خصوص پروفایل سیتوکاینی و علت مزمن شدن این بیماری وجود دارد. از این رو، در این مطالعه به منظور ارزیابی سلول‌های Th $\gamma$  و Th $\gamma$  و T تنظیمی در بیماران مبتلا به بروسلوز حاد و مزمن و مقایسه آن با افراد سالم، مقادیر سرمی سیتوکاینی شاخص هر زیر دسته سلولی مورد سنجش قرار گرفت.

## مواد و روش‌ها

این تحقیق یک مطالعه توصیفی-تحلیلی است و بر روی ۲۲ بیمار مبتلا به بروسلوز حاد (۱۳ بیمار مذکر و ۹ بیمار مونث با میانگین سنی  $38 \pm 17$ ) و ۲۱ بیمار مبتلا به بروسلوز مزمن (۱۱ بیمار مذکر و ۱۰ بیمار مونث با میانگین سنی  $43 \pm 10$ )، که ابتلای آن‌ها به بروسلوز حاد یا مزمن از نظر آزمایشگاهی و بالینی زیر نظر متخصصین محرز گردید، انجام شد. ابتلا به بروسلوز بر اساس علائم و نشانه‌های بالینی و آزمایشات سرولوژی و باکتری شناسی تعیین گردید. تشخیص بروسلوز حاد بر اساس دوره بیماری (بیشتر از سک سال)، علائم و نشانه‌های بالینی و یافته‌های آزمایشگاهی (کشت خون مثبت و یا تیتراژ آنتی بادی برابر یا بیشتر از  $1/320$  در آزمایش رایت (STA) و یا افزایش دو برابر در تیتراژ STA یا ME-۲ به فاصله دو هفته) انجام شد (۸، ۹).

## تحلیل آماری

جهت تجزیه و تحلیل داده ها از روش غیر پارامتریک و آزمون من-ویتی به منظور مقایسه ی میانگین غلظت سیتوکاین ها استفاده شد. سطح معنی داری برابر با  $p < 0/05$  در نظر گرفته شد.

## یافته ها

نتایج نشان داد که اختلاف معنی داری در مشخصات دموگرافیک بین گروه های مورد مطالعه وجود ندارد.

با مقایسه سطح سیتوکاین ها در افراد مبتلا به بروسلوز (حاد و مزمن) با افراد سالم مشخص شد که میانگین سطح سرمی IFN- $\gamma$  و IL-5 در گروه بیماران بیشتر از افراد سالم می باشد. هم چنین غلظت سرمی IL-17 در گروه بیمار در مقایسه با افراد سالم به صورت معنی دار کمتر است ( $p = 0/024$ ) (نمودار ۱).

سطح سرمی سیتوکاین ها در بیماران مبتلا به بروسلوز حاد در مقایسه با بیماران مزمن نیز متفاوت بود. میانگین سطح سرمی IFN- $\gamma$  در مبتلایان به بروسلوز حاد ( $1224 \pm 481$  پیکوگرم در میلی لیتر) در مقایسه با مبتلایان به بروسلوز مزمن ( $1017 \pm 434$  پیکوگرم بر میلی لیتر) به طور معنی داری بیشتر است ( $p = 0/045$ ). در حالی که سطح سرمی IL-5، IL-17 و TGF- $\beta$  در فرم حاد بروسلوز کمتر از فرم مزمن بیماری است ( $p = 0/001$ ) (جدول ۱).

جدول ۱. مقایسه میانگین سرمی سیتوکاین ها در مبتلایان به

بروسلوز حاد و مزمن در مقایسه با گروه کنترل

گروه کنترل	بروسلوز مزمن	بروسلوز حاد	سایتوکاین/بر حسب پیکوگرم بر میلی لیتر
$745 \pm 266$	$1017 \pm 434$	$1224 \pm 481$	IFN- $\gamma$
$1909 \pm 130$	$1151 \pm 1018$	$864 \pm 977$	IL-17
$186 \pm 32$	$238 \pm 188$	$129 \pm 77$	TGF- $\beta$
$244 \pm 50$	$371 \pm 271$	$298 \pm 44$	IL-5

مرحله مزمن شدن بیماری به واسطه تب پایین، علایم موضعی بیماری و خستگی و ضعف مفرط و دوره بیماری (بیشتر از ۱۲ ماه) و عدم پاسخ مناسب به درمان های رایج و یافته های آزمایشگاهی مشخص گردید (۱). بیمارانی که قبل از مطالعه یا طی مطالعه به بیماری های عفونی دیگری غیر از بروسلوز یا بیماری های التهابی مبتلا بودند و هم چنین بیمارانی که قبل از ورود به مطالعه با داروهای ضد التهاب مثل کورتیکواستروئیدها یا سایر آنتی بیوتیک ها غیر از داروهای انتخابی تحت درمان تب مالت قرار داشتند از مطالعه خارج شدند. علاوه بر این، ۲۱ نفر از داوطلبان سالم (۱۳ نفر مرد و ۸ نفر زن با میانگین سنی  $26 \pm 4$ ) به عنوان شاهد در نظر گرفته شدند. بعد از اطلاع یافتن از ماهیت و اهداف طرح، از تمام افراد فرم رضایت نامه اخذ گردید.

## سنجش سیتوکاین: از هر بیمار، ۵ سی سی خون

جهت سنجش سیتوکاین ها گرفته شد و بلافاصله نمونه سرم جدا شد و تا زمان آزمایش تحت دمای  $-70^{\circ}\text{C}$  درجه سانتی گراد نگهداری گردید. غلظت سایتوکین های IFN- $\gamma$ ، IL-5، IL-17، TGF- $\beta$  با کیت های شرکت پیروتک و بر اساس دستورالعمل کیت اندازه گیری شد. آنتی بادی اختصاصی ضد سیتوکاین با غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر به پلیت الیزا ساخت کمپانی (Nunc Maxisorp، امریکا) اضافه گشت و به مدت یک شب در دمای یخچال نگهداری شد. سپس از آلبومین گاوی ۱ درصد با بافر فسفات جهت بلاک کردن استفاده گردید. نمونه های سرمی و استانداردها به حفره ها اضافه شدند و پس از دو ساعت انکوبه در دمای آزمایشگاه و شست و شو با بافر فسفات سالین حاوی ۰/۰۵ درصد Tween ۲۰، آنتی بادی لایه دوم اضافه شد. پس از دو ساعت انکوباسیون و شست و شوی پلیت، کونژوگه اختصاصی اضافه گردید. در نهایت، با اضافه نمودن سوبسترای آنزیمی، میزان جذب نوری در طول موج ۴۵۰ نانومتر با دستگاه الیزاریدر (مدل Stat-Fax2000، ساخت کشور امریکا) اندازه گیری شد و غلظت سیتوکاین ها از روی منحنی استاندارد تعیین گردید.

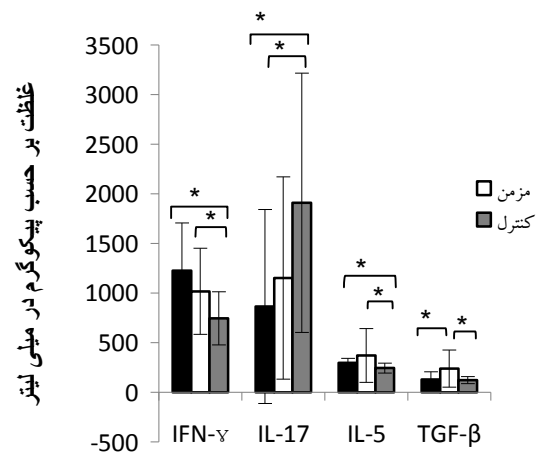
IL در بسیاری از بیماری‌های مزمن از قبیل لوپوس اریتماتوز سیستمیک، آرتریت روماتوئید و مولتیپل اسکلروزیس نیز گزارش شده است (۱۶-۱۴). به طور کلی شواهد حاکی از آن است که حفاظت کارآمد در دفاع علیه پاتوژن، نیازمند همکاری میان پاسخ‌های Th۱ و Th۱۷ می‌باشد (۱۷، ۱۸).

باجیبا و همکاران (۲۰۱۴) طی مطالعه‌ای روی الگوی سایتوکاینی در پاسخ به باکتری‌های پاتوژنیک آبسه مغزی به این نتیجه رسیدند که بیان بالای سطح سایتوکاین‌های التهابی از قبیل IL-۱۷ و IL-۲۳ و IFN- $\gamma$  در پاتوژن بیماری‌های باکتریایی و طولانی شدن دوره بیماری بسیار مؤثر می‌باشد (۱۹).

در این مطالعه، افزایش سطح سرمی IL-۵ در بیماران حاد و مزمن نسبت به گروه کنترل با نتایج مطالعه کیویی و همکاران (۲۰۱۴) هم راستا است. این محققان طی نتایج تکمیلی خود از این مطالعه دریافتند که سطح IgE، IFN- $\gamma$  و IL در کودکان مبتلا به ذات الریه ناشی از مایکو پلاسما پنومونیه بالاتر بوده است و این افزایش ممکن است با عدم تعادل پاسخ Th۱ و Th۲ مرتبط باشد (۲۰). TGF- $\beta$  یکی دیگر از سایتوکاین‌های مورد بررسی در این مطالعه بود. در این تحقیق شاهد افزایش معنی‌دار TGF- $\beta$  در بیماران مزمن در مقایسه با بیماران حاد و گروه کنترل بودیم. نتایج مطالعات انجام گرفته در این زمینه همگی مؤید آن است که TGF- $\beta$  با عملکرد مهاری خود، زمینه ساز کاهش تکثیر و عملکرد سلول‌های T، ایجاد حالت آنرژیک در آن‌ها و در نتیجه مزمن شدن و طولانی شدن بیماری می‌شود (۵، ۷). البته هیچ یک از این مطالعات مکانیسم دقیق سرکوب ایمنی در مبتلایان به بروسلوز مزمن را نشان نمی‌دهند. TGF- $\beta$  یکی از سایتوکاین‌های عامل سرکوب ایمنی در مبتلایان به بروسلوز مزمن است. مطالعات اخیر نشان می‌دهند که پلی مورفیسم ژن TGF- $\beta$ ۱، ممکن است با گسترش بیماری بروسلوز در ایرانیان مرتبط باشد (۲۱).

### نتیجه گیری

نتایج این مطالعه بیانگر عدم تعادل پاسخ‌های



نمودار ۱. مقایسه سطح سیتوکاین‌ها در بیماران مبتلا به بروسلوز (حاد و مزمن) و افراد سالم

### بحث

در این مطالعه، افزایش سطح IFN- $\gamma$  در سرم مبتلایان به بروسلوز حاد و مزمن نشان می‌دهد که IFN- $\gamma$  در بیماری تب مالت از اهمیت فوق العاده‌ای برخوردار است. IFN- $\gamma$  به وسیله سلول‌های Th۱ تولید می‌شود و با مهار پاسخ Th۲ سبب مهار تولید IL-۴ و IL-۱۰ می‌گردد. از طرف دیگر IFN- $\gamma$  با القای فعالیت ضد میکروبی ماکروفاژها سبب کاهش تعداد باکتری در موش می‌شود (۶). در مطالعه‌ای که توسط مورفی و همکاران (۲۰۰۱) انجام گرفت، مشخص شد که تزریق IFN- $\gamma$  نوترکیب به موش‌های آلوده با بروسلا ابورتوس، سبب افزایش مقاومت موش در برابر باکتری طی هفته اول بیماری می‌شود. استفاده از Anti-IFN- $\gamma$  مونوکلونال در این موش‌ها نیز با افزایش تعداد باکتری‌ها طی هفته اول آلودگی همراه بود (۳). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که میانگین IL-۱۷ در گروه بیماران مزمن در مقایسه با فرم حاد بیماری بیشتر است. IL-۱۷ پل بین ایمنی ذاتی و اکتسابی است و در اوایل عفونت باعث فراخوانی کموکاین‌ها و افزایش فعالیت نوتروفیل‌ها می‌شود (۱۰-۱۲).

اکثر مطالعات انجام گرفته در این زمینه حاکی از ارتباط سینرژیک میان پاسخ‌های Th۱ و Th۱۷ در مبتلایان به بروسلوز حاد و مزمن می‌باشند (۷، ۱۳). افزایش تولید IL-۱۷

5. Elfaki MG, Al-Hokail AA. Transforming growth factor  $\beta$  production correlates with depressed lymphocytes function in humans with chronic brucellosis. *Microbes and infection*. 2009; 11(14):1089-96.
6. Ahmed K, Al-Matrouk KA, Martinez G, Oishi K, Rotimi VO, Nagatake T. Increased serum levels of interferon-gamma and interleukin-12 during human brucellosis. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1999; 61(3):425-7.
7. Karaoglan I, Pehlivan S, Namiduru M, Pehlivan M, Kilinçarslan C, Balkan Y, et al. TNF-alpha, TGF-beta, IL-10, IL-6 and IFN-gamma gene polymorphisms as risk factors for brucellosis. *New Microbiol*. 2009; 32(2):173-8.
8. Moreno-Lafont MC, Lopez-Merino A, Lopez-Santiago R. Cell response to a salt-extractable and sonicated *Brucella melitensis* 16M antigen in human brucellosis. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. 1995; 2(3): 377-80.
9. Salmeron I, Rodriguez-Zapata M, Salmeron O, Manzano L, Vaquer S, Alvarez-Mon M. Impaired activity of natural killer cells in patients with acute brucellosis. *Clinical infectious diseases*. 1992; 15(5):764-70.
10. Aggarwal S, Ghilardi N, Xie M-H, de Sauvage FJ, Gurney AL. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *Journal of Biological Chemistry*. 2003; 278(3): 1910-4.
11. Chen Z, Laurence A, Kanno Y, Pacher-Zavisin M, Zhu B-M, Tato C, et al. Selective regulatory function of Socs3 in the formation of IL-17-secreting T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006; 103(21): 8137-42.
12. Shlyankevich J, Mehta NN, Krueger JG, Strober B, Gudjonsson JE, Qureshi AA, et al. Accumulating Evidence for the Association and Shared Pathogenic Mechanisms Between Psoriasis and Cardiovascular-related Comorbidities. *The American journal of medicine*. 2014; 127(12):1148-53.
13. Pasquevich KA, Ibañez AE, Coria LM, Samartino CG, Estein SM, Zwerdling A, et al. An oral vaccine based on U-Omp19 induces protection against *B. abortus* mucosal challenge

Th $\gamma$  و Th $\delta$  در مبتلایان به بروسلوز حاد و مزمن است. به طور کلی عوامل مختلفی از قبیل ژنتیک میزبان و فاکتورهای ایمنی ذاتی و اکتسابی، در پاسخ میزبان به بروسلا نقش دارند (۲۲). ولی در این میان نقش سایتوکاین‌های تولید شونده به وسیله سلول‌های Th $\delta$  بسیار کلیدی است و در جلوگیری از پیشرفت بیماری و مزمن شدن آن بسیار مؤثر می‌باشند. این پژوهش به شماره ۱۶-۱۵۲-۹۲ توسط کمیته‌ی اخلاق دانشگاه علوم پزشکی اراک تأیید گردید.

### تشکر و قدردانی

نتایج این تحقیق حاصل پایان‌نامه دانشجوی ارشد میکروب شناسی است که در مرکز تحقیقات پزشکی و مولکولی انجام شد.

نویسندگان از همکاری شورای پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک، و هم‌چنین بیماران و افراد شرکت‌کننده در این مطالعه نهایت سپاس را به عمل می‌آورند.

این پژوهش به شماره ۱۶-۱۵۲-۹۲ توسط کمیته‌ی اخلاق دانشگاه علوم پزشکی اراک تأیید گردید.

### منابع

1. Giambartolomei GH, Delpino MV, Cahanovich ME, Wallach JC, Baldi PC, Velikovskiy CA, et al. Diminished production of T helper 1 cytokines correlates with T cell unresponsiveness to *Brucella* cytoplasmic proteins in chronic human brucellosis. *Journal of infectious diseases*. 2002; 186(2):252-9.
2. Skendros P, Pappas G, Boura P. Cell-mediated immunity in human brucellosis. *Microbes and infection*. 2011; 13(2):134-42.
3. Murphy EA, Sathiyaseelan J, Parent MA, Zou B, Baldwin CL. Interferon- $\gamma$  is crucial for surviving a *Brucella abortus* infection in both resistant C57BL/6 and susceptible BALB/c mice. *Immunology*. 2001; 103(4):511-8.
4. Durward M, Radhakrishnan G, Harms J, Bareiss C, Magnani D, Splitter GA. Active evasion of CTL mediated killing and low quality responding CD8+ T cells contribute to persistence of brucellosis. *PloS one*. 2012; 7(4): e34925-6.

- by inducing an adaptive IL-17 immune response in mice. *PloS one*. 2011; 6(1):e16203-4.
14. Firestein GS. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature*. 2003; 423(6937): 356-61.
  15. Nelson EJ, Harris JB, Morris JG, Calderwood SB, Camilli A. Cholera transmission: the host, pathogen and bacteriophage dynamic. *Nature Reviews Microbiology*. 2009; 7(10):693-702.
  16. Crispin JC, Tsokos GC. IL-17 in systemic lupus erythematosus. *BioMed Research International*. 2010; 2010.
  17. Happel KI, Dubin PJ, Zheng M, Ghilardi N, Lockhart C, Quinton LJ, et al. Divergent roles of IL-23 and IL-12 in host defense against *Klebsiella pneumoniae*. *The Journal of experimental medicine*. 2005; 202(6):761-9.
  18. Andreasen C, Powell DA, Carbonetti NH. Pertussis toxin stimulates IL-17 production in response to *Bordetella pertussis* infection in mice. *PloS one*. 2009; 4(9):e7079-80.
  19. Bajpai A, Prasad KN, Mishra P, Singh AK, Gupta RK, Ojha BK. Distinct cytokine pattern in response to different bacterial pathogens in human brain abscess. *Journal of neuroimmunology*. 2014; 273(1):96-102.
  20. Ye Q, Xu X-J, Shao W-X, Pan Y-X, Chen X-J. *Mycoplasma pneumoniae* infection in children is a risk factor for developing allergic diseases. *The Scientific World Journal*. 2014; 2014.
  21. Rafiei A, Hajilooi M, Shakib R, Alavi S. Transforming growth factor- $\beta$ 1 polymorphisms in patients with brucellosis: an association between codon 10 and 25 polymorphisms and brucellosis. *Clinical microbiology and infection*. 2007; 13(1):97-100.
  22. Adams L, Schutta CJ. Natural resistance against brucellosis: a review. *Open Veterinary Science Journal*. 2010; 4(1):61-71.