Archive of SID

# تعیین دوز عفونی‌کننده ۵۰ درصد باکتری *تروپرلا* (*آرکانوباکتریوم*) پیوژنز در مدل گوسفند

اصغر نقی‌ها[۱]، مسعود قربانپورنجف‌آبادی[۲]، مسعودرضا صیفی‌آبادشاپوری[۲]، بابک محمدیان[۳]، محمدرحیم حاجی‌حاجیکلائی[۴] و مصطفی محقق[۵]

تاریخ دریافت: ۹۰/۱۰/۲۱ تاریخ پذیرش: ۹۱/۱/۳۰

**خلاصه**

اطلاع از دوز عفونی کننده عوامل عفونی لازمه ارزیابی‌های تجربی واکسن‌های تولید شده بر ضد آن عامل می‌باشد. با وجود این که باکتری *تروپرلا پیوژنز* باعث بیماری‌های مختلفی در دام‌ها می‌شود، اطلاع کمی در مورد دوز عفونی کننده آن در دام‌های اهلی موجود است. این مطالعه به منظور تعیین دوز عفونی‌زای پنجاه درصد ($ID_{50}$) *تروپرلا پیوژنز* در گوسفند انجام شد. برای این منظور چهار گروه سه راسی (A تا D)، از بره‌های ۲ تا ۳ ماهه به صورت داخل وریدی و به ترتیب با $10^{7}$، $10^{8}$، $10^{9}$ و $10^{10}$ واحد تشکیل دهنده پرگنه (cfu) *تروپرلا پیوژنز*، آلوده شدند. به گروه پنجم بره‌ها (گروه E) به عنوان شاهد بافر فسفات استریل تزریق گردید. به صورت روزانه تا روز دهم، نمونه خون جهت کشت اخذ گردید. در طول مدت مطالعه علائم درمانگاهی ثبت گردید و روز دهم تمامی بره‌ها کشتار گردیده و پس از کالبد گشایی، نمونه‌برداری از اندام‌های مختلف (کبد، طحال، غدد لنفاوی مزانتر، قلب و ریه) جهت کشت و بررسی هیستوپاتولوژی صورت پذیرفت. نتایج نشان داد اگر چه عفونت داخل وریدی تجربی *تروپرلا پیوژنز* به طور ثابت منجر به سپتی سمی نمی‌گردد، اما می‌تواند به صورت پایداری، ۱۰ روز بعد از تلقیح باعث عفونت کبدی گردد. بررسی‌های کالبد گشایی نشان داد که در تمام بره‌های گروه D عفونت کبدی مشخصی ایجاد شده است. در سایر بره‌ها هیچ عفونت کبدی مشاهده نگردید. با توجه به نتایج به دست آمده، میانگین دوز عفونی کننده کبدی *تروپرلا پیوژنز* در بره‌ها، $3/162\times10^{9}$ cfu محاسبه شد. این یافته می‌تواند در ارزیابی‌های تجربی واکسن‌های تولید شده بر ضد این باکتری مورد استفاده قرار گیرد.

**کلمات کلیدی:** *تروپرلا* (*آرکانوباکتریوم*) پیوژنز، بره، $ID_{50}$.

**مقدمه**

*تروپرلا* (*آرکانوباکتریوم*) *پیوژنز*[۱] یکی از اجرام چرک‌زای بسیار مهم گاو، گوسفند و خوک می‌باشد (۲۲ و ۲۷). این جرم از گوزن، سگ، فیل، غزال، اسب و بوقلمون نیز جدا شده است (۱۱). به طور کلی عفونت‌های ناشی از *تروپرلا پیوژنز* در این گونه‌ها، شامل آبسه کلیه در گاو (۹)، التهاب پستان آبسه‌ای مزمن در گاو و بز (۱، ۱۵ و ۲۵)، آبسه‌های کبد (۱۸ و ۲۰) و اورکیت در گوسفند (۱۲)، پنومونی در خوک (۱۳) و استئومیلیت در بوقلمون (۴) می‌باشد. این باکتری به عنوان معمول‌ترین جرم فرصت‌طلب از ۱۰۰ درصد غشاهای مخاطی ناحیه دهانی حلقی، پستان، دستگاه ادراری تناسلی و شکمبه در گاو و گوسفند جدا شده است (۲۱). *تروپلا پیوژنز* دارای عوامل حدت مختلف مثل پیولیزین، چند نوع پروتئاز و نورآمینیداز است (۷، ۱۰ و ۲۴) که مهم‌ترین آنها پیولیزین می‌باشد (۶).

[۱] دانشجوی دوره دکتری تخصصی میکروب‌شناسی دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز
[۲] استاد گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز E-mail: m.ghorbanpoor@scu.ac.ir (نویسنده مسئول)
[۳] دانشیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز
[۴] استاد گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز
[۵] استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی دانشگاه یاسوج

1- *Trueperella pyogenes*


www.SID.ir

Archive of SID

باکتری *تروپرلا پیوژنز* نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها حساس است اما به دلیل ماهیت عفونت‌های ناشی از آن (آبسه‌ای، کپسول فیبروزی ضخیم) پاسخ به درمان ضد میکروبی آن ضعیف است (۲۶)، بنابراین باید به فکر جلوگیری از ایجاد عفونت بود. لازمه بررسی اثر بخشی واکسن‌ها اطلاع از دوز عفونی کننده عامل بیماری است. با وجود تنوع میزبانی *تروپرلا پیوژنز*، اطلاعی در مورد دوز عفونی کننده این باکتری در حیوانات اهلی وجود ندارد. مطالعه حاضر به منظور تعیین دوز عفونی کننده این باکتری جهت ایجاد عفونت در گوسفند انجام گرفت تا در مطالعات مربوط به اثر بخشی واکسن‌های تهیه شده جهت مقابله با عفونت‌های ناشی از آن مورد استفاده قرار گیرد.

## *روش کار*

### تکثیر و شمارش باکتری

از مرحله رشد لگاریتمی یک جدایه محلی *تروپرلا پیوژنز* که با روش‌های ریخت‌شناسی و بیوشیمیایی (۱۱) و PCR (۵) مورد تایید قرار گرفته بود، برای تهیه تعلیق باکتریایی استفاده گردید. برای این منظور کشت ۴۸ ساعته این باکتری در محیط مایع BHI به مدت ۵ دقیقه در دور ۳۰۰۰g و در دمای آزمایشگاه سانتریفوژ شد. رسوب با PBS استریل شستشو و از آن سوسپانسیونی با غلظت معادل لوله ۱۰ مک فارلند تهیه گردید. این سوسپانسیون به عنوان استوک اولیه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۱۷) و جذب نوری آن در طول موج ۵۶۰nm به وسیله دستگاه الایزا ریدر (Dynatech، هلند) بر روی ۱ تنظیم گردید که معادل $۸ \times ۱۰^{۱۰}$cfu/ml از *تروپرلا پیوژنز* بود (۲ و ۸).

### استخراج DNA و آزمایش PCR

جهت تایید تشخیص بیوشیمیایی *تروپرلا پیوژنز* آزمایش PCR صورت گرفت. برای این کار، استخراج DNA *تروپرلا پیوژنز* با استفاده از کیت استخراج DNA (اینترون، کره جنوبی) و بر اساس پروتوکل آن شرکت صورت پذیرفت. در مرحله بعد به کمک پرایمرهای طراحی شده توسط Billington و همکاران (۱۹۹۷)، ژن پیولیزین با استفاده از آنزیم پلیمراز Taq تکثیر داده شد. واکنش PCR، در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر متشکل از ۵ میکرولیتر بافر ۱۰X، ۱/۵ میکرولیتر از $MgCl_2$ (۵۰ میلی‌مولار)، ۱ میکرولیتر از مخلوط dNTPs، ۱ میکرولیتر از هر یک از پرایمرها (۵۰ پیکومول بر میکرولیتر)، ۰/۵ میکرولیتر (۲/۵ واحد) از آنزیم Taq، ۵ میکرولیتر DNA الگو و ۳۵ میکرولیتر آب مقطر انجام شد. برنامه حرارتی PCR شامل دناتوره کردن اولیه در دمای ۹۴°C به مدت ۳ دقیقه و ۳۵ چرخه شامل دناتوره کردن، اتصال پرایمرها و امتداد به ترتیب در دماهای ۹۴، ۵۵ و ۷۲ درجه سانتی‌گراد هر یک به مدت ۱ دقیقه و امتداد نهایی در دمای ۷۲°C به مدت ۵ بود (۵).

### گروه‌بندی و چالش

تعداد ۱۵ راس بره نر با محدوده سنی ۲ تا ۳ ماه و محدوده وزنی ۱۸ تا ۲۰ کیلوگرم از یک گله خریداری گردید و سلامتی آنها مورد بررسی و تایید قرار گرفت. قبل از چالش، تمامی بره‌ها آلبندازول (۷/۵mg/kgBW) خوراکی، آیورمکتین (۰/۲mg/kgBW) به صورت زیر جلدی و AD3E (۱۰mg/kgBW) به صورت داخل عضلانی دریافت نمودند. تمام بره‌ها به مدت دو هفته قبل از چالش و به منظور عادت کردن به شرایط محیط جدید نگهداری شدند. بره‌ها قبل از چالش از نظر داشتن آنتی‌بادی ضد *تروپرلا پیوژنز* با روش آگلوتیناسیون صفحه‌ای (۱۷) و از جهت داشتن آنتی‌بادی ضد پیولیزین با روش ممانعت از همولیز (۵) مورد ارزیابی قرار گرفتند که دال بر عدم وجود آنتی‌بادی ضد *تروپرلا پیوژنز* و ضد پیولیزین در سرم بره‌ها بود.

بره‌ها به صورت تصادفی به ۵ گروه ۳ تایی (A تا E) تقسیم شدند. از استوک اولیه چهار غلظت از باکتری شامل غلظت‌های $۱۰^{۷}$، $۱۰^{۸}$، $۱۰^{۹}$ و $۱۰^{۱۰}$ واحد تشکیل دهنده پرگنه در میلی‌لیتر با PBS استریل تهیه شد و به ترتیب یک میلی‌لیتر از هر غلظت به بره‌های موجود در


www.SID.ir

Archive of SID

گروه‌های A تا D تزریق گردید (۱۹). بره‌های گروه E به عنوان گروه شاهد، یک میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل دریافت نمودند. روش تزریق، داخل وریدی و از طریق سیاهرگ وداج بود.

از تمامی بره‌ها قبل از تزریق تا پایان دوره آزمایش (روز دهم) به صورت روزانه نمونه خون جهت کشت باکتریایی گرفته شد. علاوه بر این به صورت روزانه دمای بدن بره‌ها اندازه‌گیری و علائم حیاتی آنها ثبت گردید.

ده روز پس از چالش، بره‌ها ذبح و مورد کالبدگشایی قرار گرفتند. از کبد، طحال، قلب، ریه، کلیه، غدد لنفاوی مدیاستن و مزانتر نمونه‌برداری شده و نمونه‌ها جهت کشت باکتریایی و تهیه مقاطع هیستوپاتولوژی به آزمایشگاه‌های میکروب‌شناسی و پاتولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز منتقل شدند. جهت کشت، در کنار شعله و به کمک اسپاتول داغ، سطح ارگان‌ها استریل گردید و به کمک قیچی استریل قطعاتی به اندازه یک سانتی‌متر مکعب جدا گردید. به کمک پنس استریل قطعات بافت جدا شده، در منطقه اول پلیت آگار خون‌دار کشت داده شد و در ادامه کشت چهار منطقه‌ای داده شد. تمامی محیط‌های آگار خون‌دار در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد $CO_2$ به مدت ۴۸ ساعت گرم‌خانه‌گذاری شدند. باکتری‌های جداشده با توجه به ویژگی‌های ریخت‌شناسی و بیوشیمیایی تعیین هویت گردیدند (۱۱). برای تأیید تشخیص بر روی برخی از این پرگنه‌ها آزمایش PCR (۵) نیز انجام شد.

نمونه‌هایی از بافت‌های به ظاهر غیر طبیعی و طبیعی برای بررسی ضایعات هیستوپاتولوژیک نیز گرفته شد. اندام‌های آلوده و شدت آلودگی در هر بره ثبت گردید و دوز عفونی کننده *تروپرلا پیوژنز* با روش Reed & Muench محاسبه گردید (جدول ۱) (۲۳).

### محاسبه دوز عفونی کننده ۵۰ درصد

جهت محاسبه $ID_{50}$ با توجه به این‌که تلقیح داخل وریدی باکتری فوق منجر به عفونت کبدی پایدار گردید، مبنای محاسبه $ID_{50}$ عفونت کبدی در نظر گرفته شد. برای این منظور، تعداد کبدهای آلوده و غیرآلوده برای هر رقت بر اساس نتیجه کشت باکتریایی ثبت گردید و ستون‌های تجمعی کبدهای آلوده و غیرآلوده تشکیل داده شد. با توجه به تعداد تجمعی کبدهای آلوده و غیرآلوده در مقابل هر میزان باکتری، درصد آلودگی برای هر میزان از باکتری محاسبه گردید. مقدار اندیکس بر اساس فرمول زیر به دست آمد:

$$\text{ایندکس} = \frac{\text{درصد} - \text{اولین درصد آلودگی بالای ۵۰ درصد}}{\text{اولین درصد آلودگی کمتر از ۵۰ درصد} - \text{اولین درصد آلودگی بالای ۵۰ درصد}}$$

ایندکس فوق از توان اولین غلظت بالای ۵۰ درصد عفونی‌زایی کسر گردید تا $ID_{50}$ به دست آید (۲۳).

## *نتایج*

### نشانه‌های بالینی

پس از چالش تنها سه بره آلوده شده در گروه D تا سه روز علائمی مانند بی‌حالی، تب و بی اشتهایی را نشان دادند و یکی از آنها تا پایان دوره آزمایش (۱۰ روز پس از تزریق) تب مداوم را نشان داد. در بره‌های گروه‌های A، B و C از لحاظ سلامت عمومی و دمای بدن تغییر محسوسی مشاهده نگردید.

### هیستوپاتولوژی، باکتری‌شناسی و PCR

کشت خون یک بره از گروه B، دو بره از گروه C و دو بره از گروه D تا ۴ روز پس از چالش و یک بره از گروه D، به صورت مداوم و تا پایان دوره آزمایش مثبت و *تروپرلا پیوژنز* جدا گردید.

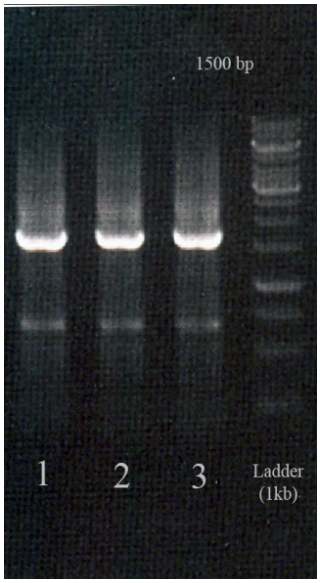
بره‌ها پس از کشتار، از نظر ضایعات پاتولوژیک و آبسه مورد بازرسی قرار گرفتند. آبسه، تنها در کبد هر سه راس از بره‌های گروه D مشاهده گردید. اندازه آبسه‌ها در حدود ۱۵-۲ میلی‌متر بود. آبسه‌ها به صورت پراکنده در قسمت‌های مختلف کبد قرار داشتند. علاوه بر این در ریه یکی از بره‌های گروه D نیز علائم پنومونی مشاهده گردید. در سایر اندام‌های بره‌های آلوده و بره‌های گروه



www.SID.ir

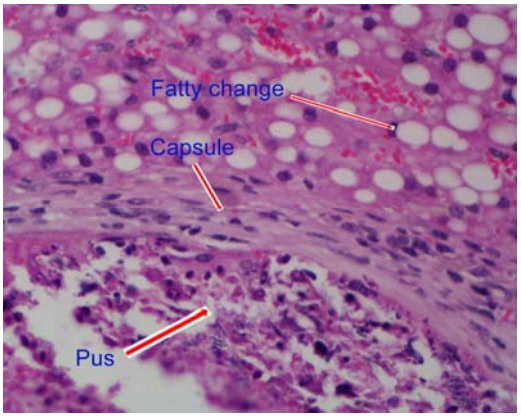
Archive of SID

شاهد هیچ گونه ضایعه‌ای مشاهده نگردید. *تروپرلا پیوژنز* به صورت خالص، از کبد سه بره آلوده شده گروه D جداسازی شد. علاوه بر این از طحال به ظاهر سالم یکی از بره‌های گروه C و ریه یکی از بره‌های گروه D که دارای ضایعه بود، نیز *تروپرلا پیوژنز* جدا شد. از هیچ یک از بره‌های دیگر (گروه‌های آلوده شده و گروه شاهد) باکتری *تروپرلا پیوژنز* جداسازی نشد. جهت تایید تشخیص، برخی از پرگنه‌ها انتخاب و برروی آنها آزمایش PCR صورت گرفت، که دال بر تولید محصولی با حدود ۱۵۰۰ جفت باز بود (تصویر ۱).

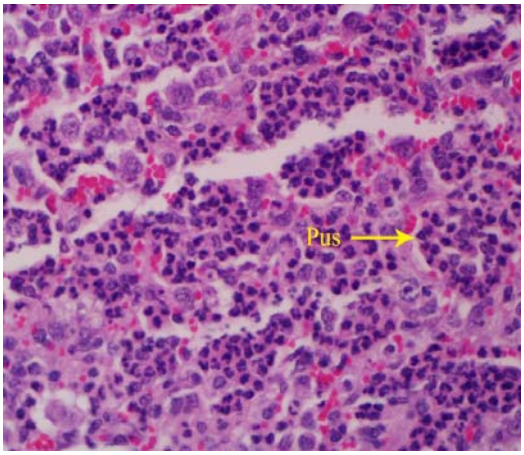



***تصویر ۱: نتایج الکتروفورز محصول PCR ژن پیولیزین***
***۱، ۲ و۳: ژن پیولیزین به ۱۵۰۶bp***

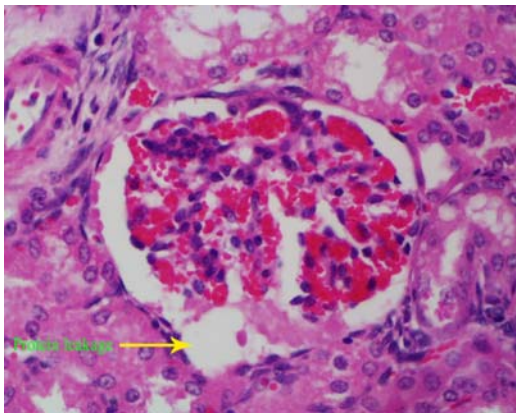
در مقاطع پاتولوژیک کبد هر سه بره گروه D، آبسه کبدی، تغییر چربی (Fatty change) (تصویر۲) در سلول-های هپاتوسیت مشاهده گردید. علاوه بر این در مقاطع تهیه شده یکی از بره‌هایی که دارای ضایعه ریوی بود (گروه D)، میکروآبسه وجود داشت (تصویر ۳). در مقاطع تهیه شده از بافت کلیوی بره‌های این گروه، پرخونی شدید، گلومرولونفریت و رسوبات هیالن دیده شد (تصویر ۴).




***تصویر ۲: کبد بره آلوده شده با $10^{7}$ cfu تروپرلا پیوژنز که نشان دهنده آبسه کپسول‌دار و تغییر چربی است (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین ، ۴۰۰×).***




***تصویر ۳: ریه بره آلوده شده با $10^{7}$ cfu تروپرلا پیوژنز که نشان دهنده برونکوپنومونی چرکی حاد، می‌باشد (رنگ-آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین، ۲۰۰×).***



***تصویر ۴: کلیه بره آلوده شده با $10^{7}$ cfu تروپرلا پیوژنز که نشان دهنده نشت پروتئین (با پیکان مشخص شده) است (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین، ۴۰۰×).***


www.SID.ir

Archive of SID

**دوز عفونی کننده ۵۰ درصد**

با توجه به نتایج، کبد به عنوان ارگان مناسب برای محاسبه میانگین دوز عفونی باکتری *تروپرلا پیوژنز* انتخاب گردید. $ID_{50}$ *تروپرلا پیوژنز* با روش Reed & Muench معادل $۱۰^{۹/۵}$ یا $۳/۱۶۲\times۱۰^{۹}$ واحد تشکیل دهنده پرگنه محاسبه گردید (جدول ۱).

***جدول ۱: نحوه محاسبه $ID_{50}$ با روش Reed & Muench***

| دوز چالش (cfu) | تعداد نمونه کبد آلوده، ۱۰ روز پس از چالش | تعداد نمونه کبد غیرآلوده، ۱۰ روز پس از چالش | جمع تجمعی تعداد آلوده A | جمع تجمعی تعداد غیر آلوده B | جمع تجمعی کل (A+B) | درصد آلودگی ۱۰۰×A/(A+B) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| $۱۰^{۱۰}$ | ۳ | ۰ | ۳ | ۰ | ۳ | ۱۰۰ |
| $۱۰^{۹}$ | ۰ | ۳ | ۰ | ۱۲ | ۱۲ | ۰ |
| $۱۰^{۸}$ | ۰ | ۳ | ۰ | ۹ | ۹ | ۰ |
| $۱۰^{۷}$ | ۰ | ۳ | ۰ | ۶ | ۶ | ۰ |

**بحث**

اطلاع از دوز عفونی کننده یک عامل، جهت ارزیابی واکسن‌های تهیه شده جهت مبارزه با آن ضروری است. علی رغم وجود اطلاعات در مورد دوز عفونی کننده *تروپرلا پیوژنز* در مدل موشی (۵، ۱۶ و ۱۷)، در منابع اطلاعاتی در خصوص دوز عفونی کننده این باکتری در حیوانات اهلی وجود نداشت، بنابراین در مطالعه حاضر به محاسبه دوز عفونی کننده این باکتری در گوسفند پرداخته شد.

نتایج هیستوپاتولوژی و باکتری شناسی نشان داد که عفونت تجربی و داخل وریدی گوسفند با *تروپرلا پیوژنز*، ده روز پس از تزریق، منجر به یک الگوی پایدار عفونت کبد می‌شود و $ID_{50}$ *تروپرلا پیوژنز* در گوسفند $۳/۱۶۲\times۱۰^{۹}$ cfu است. Jost و همکاران (۱۶) $ID_{50}$ این باکتری برای موش را $۹/۹\times۱۰^{۷}$ cfu گزارش کردند. آنها همچنین نشان داده‌اند که در موش‌های ۶ تا ۸ هفته، ۷ روز پس از چالش داخل صفاقی با *تروپرلا پیوژنز*، پس از آسان کشی، تعداد زیادی باکتری در کبد و مایعات صفاقی وجود دارد. ایشان نیز به این نتیجه رسیده‌اند که در موش سپتی‌سمی به عنوان معیار مناسب در عفونت با *تروپرلا پیوژنز* نیست که از این نظر با تحقیق حاضر هم‌خوانی دارد، اما به هر حال $ID_{50}$ باکتری فوق برای بره به مراتب (حدود ۳۰ برابر) بیشتر از $ID_{50}$ آن برای موش است که این تفاوت را می‌توان به تفاوت در گونه، راه تجویز و سویه باکتری مورد استفاده نسبت داد. بررسی‌های صورت گرفته توسط Jost و همکاران (۱۶) همچنین نشان داده است که آسیب کبدی ناشی از *تروپرلا پیوژنز* در موش به شدت وابسته به دوز تزریق است که در مطالعه حاضر نیز مشاهده شد که در گوسفند تزریق $۱۰^{۱۰}$cfu نسبت به $۱۰^{۹}$cfu از باکتری ضایعات کبدی شدیدتری را باعث می‌شود.

Hunter و همکاران (۱۹۹۰) در تلاش برای ارزیابی واکسن باکترین- توکسوئید *تروپرلا پیوژنز* در شش راس میش یک ساله، گزارش کرده‌اند که تزریق وریدی $۵\times۱۰^{۸}$cfu از *تروپرلا پیوژنز*، ۳۰ روز پس از چالش، باعث



www.SID.ir

Archive of SID

آندوکاردیت چرکی دریچه قلب و آبسه‌های ریوی در ۱ میش از ۳ راس میش گروه شاهد شده است که خود دال بر این است که $ID_{50}$ این باکتری برای گوسفند باید بیش از $۵\times۱۰^{۸}$cfu باشد. تفاوت در جدایه *تروپرلا پیوژنز*، سن حیوان‌ها و زمان بین چالش و کشتن ممکن است باعث تفاوت در یافته‌های بالینی و هیستوپاتولوژی مطالعه حاضر با مطالعه Hunter و همکاران (۱۴) باشد.

به تازگی Barbour و همکاران (۳) نیز با موفقیت *تروپرلا پیوژنز* را از ریه‌های ۳ همسترچالش شده با $۱/۸\times۱۰^{۶}$cfu باکتری به روش تزریق داخل قفسه صدری جداسازی نموده‌اند، اما فقط از کبد یکی از آنها موفق به جداسازی باکتری فوق شده‌اند، که شاید عدم جداسازی از کبد به دلیل نوع روش تجویز باشد.

اطلاعات ارائه شده در تحقیق حاضر اولین گزارش علمی $ID_{50}$ باکتری *تروپرلا پیوژنز* در گوسفند است و می‌تواند پایه‌ای برای مطالعات تجربی مربوط به مطالعه ایمنی‌زایی و محافظت کنندگی واکسن‌های تهیه شده جهت مقابله با عفونت‌های ناشی از *تروپرلا پیوژنز* باشد.

## تقدیر و تشکر

این پژوهش با پژوهانه دانشگاه شهید چمران اهواز صورت گرفته و به این وسیله از حمایت مالی آن دانشگاه قدردانی می‌شود.

## منابع

1- Al-Graibawi M.A.A., Sharma V.K. and Al-Shammari A.J. (1986). Microbial pathogens from goat mastitis and phage-typing of *Staphylococcus aureus* isolates. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Disease, 9: 23-28.

2- Baty S., Flandrois J., Delignette P.M. and Muller L. (2002). Modeling the lag time of *Listeria monocytogenes* from viable count enumeration and optical density data. Applied and Environmental Microbiology, PP: 5816-25.

3- Barbour E.K., Itani H.H., Shaib H.A., Saade M.F., Sleiman F.T., Nour A.A. and Harakeh S. (2010). Koch's postulate of *Arcanobacterium pyogenes* and its immunogenicity in local and imported Saanen goats. Veterinaria Italiana, 46: 319-27.

4- Barbour E.K., Brinton M.K., Caputa A., Johnson J.B. and Poss P.E. (1991). Characteristics of *Actinomyces pyogenes* involved in lameness of male turkeys in north-central United States. Avian Disease, 35: 192-196.

5- Billington S.J., Jost B.H., Cuevas W.A., Bright K.R. and Songer J.G. (1997). The *Arcanobacterium* (*Actinomyces*) *pyogenes* hemolysin, pyolysin, is a novel member of the thiol-activated cytolysin family. Journal of Bacteriology, 179: 6100-06.

6- Billington S.J., Songer J.G. and Jost B.H. (2002). The variant undecapeptide sequence of the *Arcanobacterium pyogenes* hemolysin, pyolysin is required for full cytolytic activity. Microbiology, 148: 3947-54.

7- Ding H. and Lämmler C. (1996). Purification and further characterization of a haemolysin of *Actinomyces pyogenes*. Journal of Veterinary Medical Science, 43: 179-188.

8- Elisabeth G., Biesta P., Martine W.R., Joosten H., Gorris L.G.M. and Zwietering M.H. (2010). Comparison of two optical density based methods and a plate count method for estimation of growth parameters of *bacillus cereus*. Applied and Environmental Microbiology, pp: 1399-1405.

9- Ertas B.H., Kilic A. and Ozeby A. (2003). Isolation of *Arcanobacterium pyogenes* from abscessed cattle kidney and identification by PCR. Turkish Journal of Veterinary Animal Science, 29: 455-459.

10- Esmay P.A., Billington S.J., Link M.A., Songer J.G. and Jost B.H. (2003). The *Arcanobacterium pyogenes* collagen binding protein, CbpA, promotes adhesion to host cells. Infection and Immunity, 71: 4368-74.

11- Funke G. and Bernard K.A. (1999). Coryneform gram-positive rods. Manual of Clinical Microbiology, 11: 319-345.

12- Gouletsou P.G., Fthenakis G.C., Cripps P.J., Papaioannouu N., Lainas T., Psalla D. and Amiridis G.S. (2004). Experimentally induced orchitis associated with *Aracnobacterium pyogenes*:


www.SID.ir

Archive of SID



clinical, ultrasonographic, seminological and pathological feature. Theriogenology, 62 (7): 1307-1328.

13- Høie S., Falk K. and Lium B.M. (1991). An abattoir survey of pneumonia and pleuritis in slaughter weight swine from 9 selected herds. IV. Bacteriological findings in chronic pneumonic lesions. *Acta* Veterinaria Scandinavica, 32: 395-402.

14- Hunter P., Lugt V.J.J. and Gouws J.J. (1990). Failure of an *Actinomyces pyogenes* vaccine to protect sheep against an intravenous challenge. Onderstepoor Journal of Veterinary Research, 57: 239-241.

15- Jonsson P., Olsson S.E., Olofson A.S., Falth C.O. and Holmberg H. (1991). Bacteriological investigations of clinical mastitis in heifers in Sweden. Journal of Dairy Research, 58: 179-85.

16- Jost B.H., Songer J.G. and Billington S.J. (1999). An *Arcanobacterium* (*Actinomyces*) *pyogenes* mutant deficient in production of the pore-forming cytolysin pyolysin has reduced virulence. Infection and Immunity, 67: 1723-1728.

17- Jost B.H., Trinh H.T., Songer J.G. and Billington S.J. (2003). Immunization with genetic toxoids of the *Arcanobacterium pyogenes* cholesterol-dependent cytolysin, pyolysin, protects mice against infection, Infection and Immunity, 71: 2966-69.

18- Lechtenberg K.F., Nagaraja T.G., Leipold H.W. and Chengappa M.M. (1988). Bacteriologic and histologic studies of hepatic abscesses in cattle. American Journal of Veterinary Research, 49: 58-62.

19- Michael C.F., Baird G., Kathleen M.C., Karen U., Sales J. and William D. (2006). Vaccination confers significant protection of sheep against infection with a virulent United Kingdom strain of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Vaccine, 24: 5986-96.

20- Nagaraja T.G., Laudert S.B. and Parrott J.C. (1996). Liver abscesses in feedlot cattle. Part I. Causes, pathogenesis, pathology, and diagnosis. Compendiun on Continuing Education for the Practicing Veterinarian, 18: 230-241.

21- Narayanan S., Nagaraja T.G., Wallace N., Staats J., Chengappa M.M. and Oberst R.D. (1998). Biochemical and ribotypic comparison of *Actinomyces pyogenes* and *A. pyogenes*-like organisms from liver abscesses, ruminal wall, and ruminal contents of cattle. American Journal of Veterinary Research, 59: 271-276.

22- Ramos C.P., Foster G. and Collins M.D. (1997). Phylogenetic analysis of the genus *Actinomyces* based on 16S rRNA gene sequences: description of *Arcanobacterium phocae* sp. nov., *Arcanobacterium bernardiae* comb. nov., and *Arcanobacterium pyogenes*, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 47: 46-53.

23- Reed L. and Muench H. (1938). A simple method of estimating fifty percent endpoints. American Journal of Hygiene, 27: 493-497.

24- Schaufuss P. and Lämmler C. (1989). Characterization of the extracellular neuraminidase produced by *Actinomyces pyogenes*. Zentbl Bakteriologie, 27: 28-35.

25- Takeuchi S., Kaidoh T. and Azuma R. (1995). Assay of proteases from *Actinomyces pyogenes* isolated from pigs and cows by zymography. Journal of Veterinary Medicine Science, 57: 977-979.

26- Timoney J.F., Gillespie J.H., Scott F. and Barlough J.E. (1988). Hagan and Bruner's microbiology and infectious diseases of domestic animals. 8th Edition, Corner University Press, pp: 124-129.

27- Yassin A.F., Hupfer H., Siering C. and Schumann P. (2011). Comparative chemotaxonomic and phylogenetic studies on the genus *Arcanobacterium Collins* et al. 1982 emend. Lehnen et al. 2006: proposal for *Trueperella* gen. nov. and emended description of the genus *Arcanobacterium*. International Journal of Systemic Evolution Microbiology, 61:1265-74.



www.SID.ir