



ARAŞTIRMA MAKALESİ

Farelerde inaktif *Arcanobacterium pyogenes* aşılarının etkinliği

Hasan Hüseyin Hadimli*, Zafer Sayın, Yasemin Pınarkara, Aslı Sakmanoğlu,

M. Seyyide Temimhan, Osman Erganiş

Özet

Hadimli HH, Sayın Z, Pınarkara Y, Sakmanoğlu A, Temimhan MS, Erganiş O. Farelerde inaktif *Arcanobacterium pyogenes* aşılarının etkinliği. *Eurasian J Vet Sci*, 2012, 28, 3, 133-137

Amaç: Bu çalışmada, mineral oil (MO) ve alüminyum hidroksit + ginseng [Al(OH₃) + G] ile adjuvantlanmış inaktif *Arcanobacterium pyogenes* aşılarının farelerde etkinliğinin belirlenmesi amaçlandı.

Gereç ve Yöntem: İnaktif *A. pyogenes* aşıları, farelere 3 hafta aralıkla 2 kez deri altı yolla uygulandı. Aşılı ve aşısız fareler 2. aşılama 15 gün sonra canlı patojenitesi LD₅₀ olan *A. pyogenes* suşu deri altı yolla verilerek çelinc yapıldı. Fareler 20 gün boyunca ölüm ve hastalık yönünden gözlemlendi. Ölen hayvanların nekropsisi yapıldı ve iç organlarının (dalak, karaciğer, akciğer, kalp, böbrek) mikrobiyolojik yoklamaları gerçekleştirildi. Aşılama öncesi ve sonrası 15. günde kan örnekleri alındı. Serum örneklerinde *A. pyogenes*'e karşı oluşan antikor titreleri modifiye Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) ile belirlendi.

Bulgular: Kontrollere göre aşılanmış fare serumlarındaki antikor titreleri belirgin olarak yüksek bulundu. Aşılı ve çelinc yapılmış farelerde ölüm ve morbidite gözlenmezken, kontrol grubu farelerde hastalık ve ölüm belirlendi.

Öneri: *A. pyogenes* izolatından hazırlanan *A. pyogenes* aşılarının farelerde *A. pyogenes* enfeksiyonlarından korunmada faydalı olduğu bulundu.

Abstract

Hadimli HH, Sayın Z, Pınarkara Y, Sakmanoğlu A, Temimhan MS, Erganiş O. The effectiveness of inactive *Arcanobacterium pyogenes* vaccines in mice. *Eurasian J Vet Sci*, 2012, 28, 3, 133-137

Aim: The aim of this study was to determine effectiveness of inactivated *Arcanobacterium pyogenes* vaccines adjuvanted with mineral oil (MO) and aluminum hydroxide + ginseng [Al(OH₃) + G] in mice.

Materials and Methods: Inactive *A. pyogenes* vaccines were subcutaneously administered to mice twice at 3 weeks intervals. Mice were subcutaneously challenged with live *A. pyogenes* according to LD₅₀ at 15th day after second vaccination. Mice were observed for mortality and morbidity during 20 days. Death animals were necropsied and microbiological examination were made from internal organs (liver, spleen, lungs, heart and kidney). Blood samples were collected before vaccination and at 15th day after vaccination. The titers of antibodies against *A. pyogenes* in serum samples were detected by using self-made modified Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA).

Results: Levels of antibodies in sera of vaccinated animals were significantly higher than the controls. While no mortality and morbidity were observed in vaccinated and challenged mice, both morbidity and mortality were determined in non-vaccinated mice.

Conclusion: Inactive *A. pyogenes* vaccines prepared from local *A. pyogenes* strain was found to be useful to protect mice from the infection of *A. pyogenes*.

Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 42075, Kampüs, Konya, Türkiye

Geliş: 29.05.2012, Kabul: 12.06.2012

*hhadimli@selcuk.edu.tr

Anahtar kelimeler: *Arcanobacterium pyogenes*, aşı, fare

Keywords: *Arcanobacterium pyogenes*, vaccine, mice

► Giriş

Arcanobacterium pyogenes, sığır, koyun ve keçi dahil evcil hayvanlarda mukozal yüzeylerin en önemli fırsatçı patojenlerden birisidir ve suppuratif bulaşıcı hastalıktan da sorumludur (Dias ve ark 1996, Nagaraja ve Chengappa 1998, Jost ve Billington 2005). Etken evcil hayvanlarda mastitis, atık, pyometra, arthrit, orşitise ve kanatlılarda ayak apselerine sebep olmaktadır. Hastalık vakalarından saf olarak ya da karışık kültürlerden izole edilebilmektedir (Semembo ve ark 1991, Madsen ve ark 1992, Simpson ve ark 1995, Nolte ve ark 2001, Quinn ve ark 2002, Ertaş ve ark 2005, Gouletsou ve ark 2006, Miller ve ark 2007).

A. pyogenes, etkenin patojenitesine katkıda olduğu bilinen çeşitli virülens faktörlerine sahiptir. Bunlar, immun sistemin hücreleri için sitotoksik aktiviteli pyolisin (PLO), epitel hücrelere adezyon için 2 nöroaminidaz (neurominidase nanH ve nanP), kollajenden zengin dokulara adezyon için gerekli olan bir kollajenbağlayan protein (cbpA; collagen-binding protein) ve konakçıya adezyon için fimbrial yapılar (*fimA*, *fimC*, *fimE* ve *fimG*)'dır (Billington ve ark 1997, Jost ve ark 1999, Jost ve ark 2002, Esmay ve ark 2003, Silva ve ark 2008, Hijazin ve ark 2011).

Birincil virülens faktör, çok etkili bir hücre dışı toksin olan pyolisin (PLO). PLO, farklı hayvan türlerine ait eritrositleri lize etme özelliğine sahip bir hemolizindir ve kanlı agarda beta-hemolizin şekillendirmektedir. Ayrıca, intravenöz veya intraperitoneal yolla verilen laboratuvar hayvanlarında dermatonekrotik ve letal etki göstermesinin yanı sıra, makrofajlar ve polimorf nükleer lökositler dahil bir çok hücre üzerinde sitolitik etkilidir. PLO bütün *A. pyogenes* türleri tarafından üretilmektedir ve kültür süpernatantlarında 55 kDa protein olarak bulunmaktadır (Billington ve ark 1997, Jost ve Billington 2005).

Bu çalışmada, farelerde mineral yağ adjuvantlı (MO) ve alüminyum hidroksit + ginseng ekstraktı [Al(OH₃) + G] inaktif *A. pyogenes* aşılılarının etkinliğinin belirlenmesi amaçlandı.

► Gereç ve Yöntem

• Hayvanlar

Bu çalışma, klinik olarak herhangi bir semptom göstermeyen sağlıklı Swiss albino fareler (6-8 haftalık, n=30) üzerinde gerçekleştirildi. Fareler, aşı (mineral yağlı (MO) ve [Al(OH₃)]+G) ve aşısız (kontrol) olarak 3 gruba ayrıldı. Hayvanlar standart şartlar altında barındırıldı, uygun yem ve su ile ad libitum olarak beslendi (Hadimli ve ark 2007, Hadimli ve ark 2011a). Araştırma prosedürü Etik Kurul tarafından onaylandı.

• *A. pyogenes* aşılılarının hazırlanması

Aşı geliştirme çalışmalarında aşı tohumu olarak (master seed) ölen bir buzağının suppuratif dokularından izole edilen *A. pyogenes* suşu kullanıldı. *A. pyogenes* izolatının morfolojik ve biyokimyasal özel-

likleri klasik prosedürlere göre belirlendi (Morrison ve Tillotson 1988). İlave olarak, *plo* geni için spesifik primerler kullanılarak PCR ile doğrulandı (Hadimli ve ark 2010) ve virülens faktörlerinin varlığı incelendi (Hadimli ve Kav 2011). Ayrıca, etkenin patojenitesi farelerde belirlendi (Hadimli ve ark 2011a). *A. pyogenes* izolatı, %5 koyun kanı içeren kanlı agara ekildi ve mikroaerofilik olarak 37 °C'de 48 saat inkübe edildi. Birkaç koloni alındı ve Brain-Hearth Infusion besiyerinde kültüre edildi. Daha sonra üreyen bakteriler 10000xg'de 20 dakika santrifüj edilerek toplandı. PBS ile 3 kez yıkadıktan sonra, bakteri konsantrasyonu LD₅₀'ye göre ayarlandı. Daha sonra, inaktivasyon için bakteri süspansiyonuna formaldehit (%0.5) eklendi. Aynı zamanda, süpernatanttaki protein değeri ölçüldü ve süpernatant 10 kDa filtre ile konsantre edildi. Sterilite kontrolünden sonra, *A. pyogenes* antijeni ve süpernatant [Al(OH₃)] jeli (%4) ve/veya mineral yağ (bir kısım antijen ve bir kısım adjuvant) ile karıştırıldı. Aynı zamanda, [Al(OH₃)] jelli aşıya ginseng ekstraktı (G) (4 mg/mL) ilave edildi (Hadimli ve ark 2007, Hadimli ve ark 2011a).

• Sterilite ve zararsızlık testi

Her aşamada sterilite yönünden, *A. pyogenes* aşılılarının mikrobiyolojik yoklamaları (aerobik, mikroaerofilik, anaerobik, mycoplasma ve mikotik mikroorganizmalar için) yapıldı. Aynı zamanda, aşılama sonrası aşı hayvanlar yan etkiler ve lokal reaksiyonlar yönünden gözlemlendi (Hadimli ve ark 2007, Hadimli ve ark 2011a).

• Farelerin aşılınması ve çelinç denemeleri

Fareler, 15 gün aralıkla *A. pyogenes* aşılı (0.1 mL) ile 2 kez deri altı yolla aşılandı. Kontrol grubundaki farelere benzer şekilde steril fizyolojik tuzlu su enjekte edildi (Hadimli ve ark 2007, Hadimli ve ark 2011a). Aşılama sonrası 15. günde, aşı ve aşısız gruplardaki tüm farelere derialtı olarak patojenik *A. pyogenes* izolatının LD₅₀ dozu ile çelinç yapıldı. Bütün fareler 20 gün boyunca hastalık ve ölüm yönünden gözlemlendi. *A. pyogenes*'in tekrar izolasyonu için ölen veya uyutulan farelerin iç organları (kalp, dalak, akciğer, böbrek ve karaciğer) kültüre edildi (Hadimli ve ark 2007, Hadimli ve ark 2011a).

• Anti-*A. pyogenes* antikorlarının ölçümü

Ölü *A. pyogenes* antijenine karşı şekillenen antikorların seviyesi laboratuvarda hazırlanan modifiye ELISA kiti kullanılarak ölçüldü (Hadimli ve ark 2007). Kısa, karbonat-bikarbonat tamponunda (pH 9.6) bakteri konsantrasyonu 1.5x10⁹ hücre/mL'de ayarlandı ve 96 çukurlu immunopleyterler 100 µL/çukur *A. pyogenes* ile kaplandı. Pleyterler 37 °C'de 1 saat ve 4 °C'de bir gece inkübe edildi. Daha sonra, spesifik bovine serum albümininden (BSA, %1) tüm çukurlara 100 µL kondu ve 60 dakika oda ısısında inkübe edildi. Pleyterler 3 kez PBS-T (0.15 mol/L, %0.5 Tween 20, pH 7.2) ile yıkandı. Her bir serum örneği 1/250 olacak şekilde sulandırılarak çukurlara 100 µL kondu ve 37 °C'de 1 saat

inkübe edildi. Yıkama sonrası, tüm çukurlara 100 µL 1:6000 oranında sulandırılan konjugat (goat anti-mouse IgG horseradish peroxidase conjugate, 1:8000, whole molecule, Sigma A 4416, St. Louis, MO, USA) ilave edildi ve 37 °C'de 1 saat inkübe edildi. Yıkama sonrası, substrat olarak 0.4 mg/mL δ-phenylenediamine dihydrochloride (0.05 M phosphate-citrate buffer, δ-phenylenediamine tablets, Sigma P 8287, St. Louis, MO, USA)'den 100 µL ilave edildi ve 10 dakika oda ısısında tekrar inkübe edildi. Pleytler, vakit geçirmeksizin mikropleyt ELISA okuyucusunda (Anthos Labtec Instruments, A 5022, Salzburg) 450 nm'de okutuldu (Ding ve ark 1998, Hadimli ve ark 2007, Hadimli ve ark 2011a). 100 L

► Bulgular

Aşılama sonrasında aşılanan farelerin aşılama bölgesinde herhangi bir lokal reaksiyon ve hayvan davranışlarında anormallik gözlenmedi. Bütün aşıli farelerin serumlarında *A. pyogenes*'e karşı antikorların seviyesi kontrollere göre belirgin olarak daha yüksek bulundu ($P < 0.05$). Aşılı gruplar karşılaştırıldığında, Al(OH₃) + G grubunun antikor titrelerinin MO aşısı grubuna göre daha yüksek olduğu belirlendi (Tablo 1).

Tablo 1. Aşılı ve aşısız farelerin serumlarında *A. pyogenes*'e karşı antikor titreleri.

Gün	MO ^a	Al(OH ₃)+G ^b	Kontrol
0	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
15	1.767±0.43	2.7695±0.18	0.00±0.00

^aMO: Mineral yağ, ^bAl(OH₃)+G: Aliminyum hidroksit + Ginseng

A. pyogenes aşılı ile aşılanan farelerin iç organlarından etkenin tekrar izolasyon sayısı kontrollere göre belirgin olarak düşük belirlendi (Tablo 2). Aşılı gruplar karşılaştırıldığında, MO aşısı ile aşılanan farelerde tekrar izolasyon oranının Al(OH₃) + G aşısı ile aşılanan farelere göre daha düşük olduğu tespit edildi (Tablo 2).

Tablo 2. Aşılı ve çelinç yapılan farelerin iç organlarından *A. pyogenes*'in tekrar izolasyonu.

İç organlar	MO	Al(OH ₃)+G	Kontrol
Karaciğer	3/8	5/8	7/8
Dalak	3/8	5/8	8/8
Kalp	4/8	2/8	7/8
Böbrek	1/8	5/8	8/8
Akciğer	3/8	2/8	7/8
Toplam	14/40	19/40	37/40

Patojenik *A. pyogenes* suşunun verilmesi sonrası 20 gün boyunca takip edilen aşıli ve çelinç yapılan farelerde morbidite ve mortalite gözlenmedi. Bununla birlikte, aşısız farelerin tümünde hastalık ve ölüm gözlemlendi (Tablo 3).

Tablo 3. Aşılı ve çelinç yapılan farelerde morbidite ve mortalite oranları.

	MO	Al(OH ₃)+G	Kontrol
Mortalite	0/8	0/8	8/8
Morbidite	0/8	0/8	8/8

► Tartışma

Kommensal bir etken olarak dikkate alınan *A. pyogenes*, hastalık vakalarının çoğunluğunda patojen bir etken olarak izole edilebilmektedir (Jost ve Billington 2005). Etken, evcil hayvanların deri, eklemler ve iç organlarında suppuratif enfeksiyonlara sebep olabilen en yaygın fırsatçı patojenlerden birisidir (Semembo ve ark 1991, Madsen ve ark 1992, Simpson ve ark 1995, Dias ve ark 1996, Nolte ve ark 2001, Ertaş ve ark 2005, Gouletsou ve ark 2006, Miller ve ark 2007). Çoğunlukla, müköz membranların fiziksel ya da mikrobiyal travması sonrasında, primer bir patojen olarak enfeksiyon oluşturacak şekilde dokulara yayılmaktadır (Nagaraja ve Chengappa 1998).

Etkene karşı aşı çalışmalarında, formalin inaktif, purifiye, rekombinant PLO ile aşılama, periton içi canlı *A. pyogenes* çelinçine karşı fareleri koruyabilmiştir. Genetik olarak inaktif PLO ile aşılama deneyleri *A. pyogenes* enfeksiyonlarına karşı farelerin korunmasında başarılı olduğu belirtilmiştir (Jost ve ark 2003). PLO'nun genetik toksoidleri, aşı olarak kullanılmalarından önce inaktivasyona gerek olmaması, doğal veya rekombinant olmalarından dolayı önemli avantaja sahiptir. Jost ve ark (2003) genetik toksoidlerin etkili veteriner aşılı olabileceğini göstermişlerdir. PLO'nin ümit veren subunit bir aşı olabileceği fareler üzerinde gösterilmiş olsa da, büyük hayvanlarda koruma verip vermeyeceği net değildir (Jost ve ark 2003).

Laboratuar farelerinin aksine, evcil hayvanlarda *A. pyogenes* doğal olarak bulunduğu için etkene ve PLO'ya karşı antikor mevcuttur (Ding ve ark 1998). Besi hayvanları ve süt ineklerinde, aşılama ile PLO nötralize antikor titresini belirgin olarak artırılabilirdiği gösterilmiştir (Cho ve ark 2008). Bununla birlikte, bu hayvanlarda nötralize antikorların varlığının *A. pyogenes*'e karşı koruma yapıp yapmayacağı belirgin değildir (Hunter ve ark 1990). *A. pyogenes* aşısı deneylerinden çıkan sonuçlara göre çiftlikteki hayvanların korunması daha kompleks olabilmektedir ve hücre bağışıklıkta da büyük bir rol oynayabilmektedir (Wulster-Radcliffe ve ark 2005). PLO'ya ilaveten, diğer *A. pyogenes* antijenleri; nöraminidaz, CbpA ve/veya fibronektin veya fibrinojen bağlayan protein antijenleri de değerlendirilmedi.

Ding ve ark (1998) *A. pyogenes* ve *Peptococcus indolicus* kültür supernatantları ile aşılama süt inekleri, yaz mastitisi geçiren süt inekleri ve normalde sağlıklı görülen bir kısım aşısız süt ineklerinin serumlarında bir antikor artışı tespit ettiklerini bildirmişlerdir.

Ancak, kültür supernatantı ile aşılamanın süt ineklerinde titrenin aşılama sonrası 8-9 ayda azaldığını ve *A. pyogenes* spesifik antikorların enfeksiyonun kontrolü için kullanılmasının sınırlı olduğunu ifade etmişlerdir.

Oto aşılar, bireysel, kronik yada tekrarlayan enfeksiyonlarda sürünün tedavisi için hastalığa sebep olan mikroorganizma(lar)dan hazırlanan aşılardır. Oto aşılar veteriner hekimlikte yaygın kullanılmasına rağmen, verilmelerinden sonra aktive olan immünolojik etki mekanizması gibi aksiyon mekanizmaları yeterince incelenmemiştir. Süt ineklerinde metritis ile mücadele tedavisi için yapılan oto aşılama sonrası, hayvanların T hücre reseptörü ve T hücre ekspresyonunda bir artış ile CD4 hücrelerinde bir azalma gözlenmiştir. Lenfosit proliferasyon testlerinde, oto aşılama tedavisi sonrası bir azalma ile takip ederken antijen-spesifik cevapta başlangıçta bir artma görülmüştür. Oto aşının kullanılması hastalanan hayvanların iyileşmesine katkıda bulunan immünolojik efektör mekanizmaların aktivasyonuna yol açtığı kanaatine varılmıştır (Nolte ve ark 2001)

Hadimli ve ark (2011a) içerisinde *A. pyogenes* ihtiva eden kombine mastitis aşısı ile süt ineklerini aşıladıklarını ve aşılama sonrası alınan süt örneklerinin mikrobiyolojik yoklamalarında *A. pyogenes* izole etmediklerini belirtmişlerdir. Ayrıca, kombine aşı ile aşılanan farelerde, çelinc denemeleri sonrasında hastalık ve ölüm belirlemediklerini bildirmişlerdir (Hadimli ve ark 2011b). Hunter ve ark (1990) *A. pyogenes* bakterin-toksoit ile aşılanan koyunlarda pyojenik şartlara karşı koruma sağlamadığını belirtmişlerdir. Aşılama ile etkenlere karşı yüksek titrede antikor oluşmasına rağmen, antikorlar ile *A. pyogenes* enfeksiyonuna karşı koruma arasında bir ilişki olmadığını ifade etmişlerdir.

Bu çalışmada, kontrol grubu hayvanlara göre aşı gruplarında yüksek seviyede antikor tespit edilmiştir. Ayrıca, kontrol grubundaki hayvanlarda morbidite ve mortalite oranları yüksek çıkarken, aşı gruplarındaki farelerde hastalık ve ölüm olmaması aşılamanın etkinliğine bağlanmıştır. MO adjuvantlı aşıya göre $Al(OH)_3$ 'li ve ginseng katkılı aşı ile aşılanan farelerin antikor titrlerinin daha yüksek çıkması ise ginseng ekstraktının humoral bağışıklığa olumlu olarak etki ettiğini göstermektedir. Bununla birlikte, aşı farelerinden sadece 15. günde alınan kan örneklerinde antikor titresinin ölçülmesi, etkinliğinin zaman ile ilişkilendirilmesini mümkün kılmamıştır. Bununla birlikte, ginseng ile yapılan diğer çalışmalarda da (Hadimli ve ark 2007, Hadimli ve ark 2011b) benzer sonuçların alınması, aşılarla özellikle $Al(OH)_3$ 'li aşılarla ginseng ekstraktının katılmasının bağışıklığı artırması açısından avantajlı olacağını düşündürmektedir.

► Öneri

İnaktif *A. pyogenes* aşılı ile aşılanan farelerde patojenik *A. pyogenes* suşu ile yapılan çelinc denemelerinde aşının etkili olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte,

sığır ve koyun gibi evcil hayvanlar üzerinde *A. pyogenes* aşılamanın etkinliğinin belirlenmesi için çalışmalarının devam ettirilmesi gerekmektedir.

► Kaynaklar

- Billington SJ, Jost BH, Cuevas WA, Bright KR, Songer JG, 1997. The Arcanobacterium (Actinomyces) pyogenes hemolysin, pyolysin, is a novel member of the thiol-activated cytolysin family. J Bacteriol, 179, 6100-6106.
- Cho YS, Lee HS, Lim SK, Joo YS, Kim JM, Kim JH, 2008. Safety and efficacy testing of a novel multivalent bovine bacterial respiratory vaccine composed of five bacterins and two immunogens. J Vet Med Sci, 70, 959-964.
- Dias CAG, Cauduro PF, Mezzari A, Cantarelli V, 1996. Actinomyces pyogenes isolated from a subcutaneous abscess in a dairy farmer. Clin Microbiol Lett, 18, 38-40.
- Ding H, Lammler C, Vecht U, 1998. Measurement of Actinomyces pyogenes specific antibodies in bovine blood samples by an enzyme-linked immunosorbent assay. Zentralbl Veterinarmed B, 45, 297-303.
- Ertas HB, Kılıç, A, Özbey G, Muz A, 2005. Isolation of Arcanobacterium (Actinomyces) pyogenes from abscessed kidney and identification by PCR. Turk J Vet Anim Sci, 29, 455-459.
- Esmay PA, Billington SJ, Link MA, Songer JG, Jost BH, 2003. The Arcanobacterium pyogenes collagen-binding protein, Cbp A, promotes adhesion to host cells. Infect Immun, 71, 4368-4374.
- Gouletsou PG, Ethenakis GC, Tzora A, Cripps PJ, Saratsis P, 2006. Isolation of Arcanobacterium pyogenes from the scrotal skin and the prepuce of healthy rams or from rams with testicular abnormalities. Small Rumin Res, 63, 177-182.
- Hadimli HH, Erganiş O, Kav K, Sayın Z, 2010. Koyun ve sığır örneklerinden Arcanobacterium pyogenes izolasyonu ve polimeraz zincir reaksiyonu ile identifikasyonu. Kafkas Univ Vet Fak Derg, 16, 611-616.
- Hadimli HH, Kav K, 2011. The molecular characterization of Arcanobacterium pyogenes strains isolated from samples of sheep and cattle. Kafkas Univ Vet Fak Derg, 17, 893-899.
- Hadimli HH, Erganiş O, Sayın Z, Yıldırım B, 2007. Fare ve Koyunlarda ginseng katılmış inaktif *Salmonella typhimurium* aşılamanın etkinliği. Eurasian J Vet Sci, 23, 17-24.
- Hadimli HH, Sayın Z, Kav K, Erganiş O, Türütöğlü H, Dinç DA, 2011a. The Determination of effectiveness combined mastitis prepared vaccines for dairy cows in mice. 3th East Mediterranean ICLAS Symposium & XV. ICLAS General Assembly. June 13-15, pp: 52, Istanbul, Turkey.
- Hadimli HH, Sayın Z, Kav K, Erganiş O, Türütöğlü H, Dinç DA, 2011b. The Development of Combined Mastitis Vaccines for Different Bacterial Agents (Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Streptococcus agalactiae, Corynebacterium bovis and Arcanobacterium pyogenes) in Dairy Cows. 19. International Congress of Mediterranean Federation of Health and Production of Ruminants, pp: 461, May 25-28, Belgrade, Serbia.
- Hijazin M, Ülbegi-Mohyla H, Alber J, Lammler C, Hassan AA, Abdulmawjood A, Prenger-Berninghoff E, Weib R, Zschöck M, 2011. Molecular identification and further characterization of Arcanobacterium pyogenes isolated from bovine mastitis and from various other origins. J Dairy Sci, 94, 1813-1819.
- Hunter P, van der Lugt JJ, Gouws JJ, 1990. Failure of an Ac-

- tinomyces pyogenes vaccine to protect sheep against an intravenous challenge. *Onderstepoort J Vet Res*, 57, 239-41.
- Jost BH, Billington SJ, 2005. *Arcanobacterium pyogenes*: Molecular pathogenesis of an animal opportunist. *Antonie van Leeuwenhoek*, 88, 87-102.
- Jost BH, Songer JG, Billington SJ, 1999. An *Arcanobacterium* (*Actinomyces*) *pyogenes* mutant deficient in production of the pore-forming cytolysin pyolysin has reduced virulence. *Infect Immun*, 67, 1723-1728.
- Jost BH, Songer JG, Billington SJ, 2002. Identification of a Second *Arcanobacterium pyogenes* neuraminidase and Involvement of neuraminidase activity in host cell adhesion. *Infect Immun*, 70, 1106-1112.
- Jost BH, Trinh HT, Songer JH, Billington SJ, 2003. Immunization with genetic toxoids of the *Arcanobacterium pyogenes* cholesterol-dependent cytolysin, pyolysin, protects mice against infection. *Infect Immun*, 71, 2966-2969.
- Madsen M, Sorensen GH, Aalbaek B, Hansen JW, Bjorn H, 1992. Summer mastitis in heifers: Studies on the seasonal occurrence of *Actinomyces pyogenes*, *Peptostreptococcus indolicus* and *bacteroidaceae* in clinically healthy cattle in Denmark. *Vet Microbiol*, 30, 243-255.
- Miller ANA, Williams EJ, Sibley K, Herath S, Lane EA, Fishwick J, Nash DM, Rycroft AN, Dobson H, Bryant CE, Sheldon IM, 2007. The effects of *Arcanobacterium pyogenes* on endometrial function in vitro, and on uterine and ovarian function in vivo. *Theriogenol*, 68, 972-980.
- Morrison JRA, Tillotson, GS, 1988. Identification of *Actinomyces* (*Corynebacterium*) *pyogenes* with the API 20 Strep system. *J Clin Microbiol*, 26, 1865-1866.
- Nagaraja TG, Chengappa MM, 1998. Liver abscesses in feedlot cattle: A review. *J Anim Sci*, 76, 287-298.
- Nolte O, Morscher J, Weiss HE, Sonntag HG, 2001. Autovaccination of dairy cows to treat post partum metritis caused by *Actinomyces pyogenes*. *Vaccine*, 19, 3146-3153.
- Quinn AK, Vermont JJ, Twiss DP, 2002. *Arcanobacterium pyogenes* mastitis in a 18-month-old heifer. *New Zealand Vet J*, 50, 167-168.
- Semembo DKN, TR, Ayliffe J, Boyd S, Taylor DJ, 1991. Early abortion in cattle induced by experimental intrauterine infection with pure cultures of *Actinomyces pyogenes*. *Vet Rec*, 129, 12-16.
- Silva E, Gaiva M, Leita S, Jost BH, Carneiro C, Vilela CL, Lopes da Costa L, Mateus L, 2008. Genomic characterization of *Arcanobacterium pyogenes* isolates recovered from the uterus of dairy cows with normal puerperium or clinical metritis. *Vet Microbiol*, 25, 111-118.
- Simpson RB, Wesen DP, Anderson KL, Armstrong JD, Harvey RW, 1995. Subclinical mastitis and milk production in primiparous Simmental cows. *J Anim Sci*, 73, 1552-1558.
- Wulster-Radcliffe MC, Seals RC, Lewis GS 2005. Uterine response to multiple inoculations with *Arcanobacterium pyogenes* and *Escherichia coli* in Nulliparous Ewes. *Am J Reprod Immun*, 54, 249-261.