

## PREGLEDNI RAD – REVIEW PAPER

DOI: 10.2298/VETGL1104235M

UDK 618.19-002.09:579.871.1

***Arcanobacterium pyogenes* – FAKTORI VIRULENCIJE, ZNAČAJ U ETIOLOGIJI MASTITISA I TERAPIJSKE (NE)MOGUĆNOSTI\******Arcanobacterium pyogenes* – VIRULENCE FACTORS, IMPORTANCE IN MASTITIS ETIOLOGY AND THERAPEUTIC (IM)POSSIBILITIES**

Dubravka Milanov, Jelena Petrović, M. Kapetanov, Ljiljana Suvajdžić\*\*

*Arcanobacterium pyogenes* je oportunistički patogen, uzročnik supurativnih infekcija različitih organa i tkiva kod ekonomski važnih vrsta domaćih životinja. Najčešće se ova bakterija izoluje iz zapaljenjskih lezija pluća svinja i goveda, uzoraka materične sluzi krava sa endometritisom i mleka krava sa kliničkim mastitisom. *A. pyogenes* poseduje brojne faktore virulencije: holesterol zavisni citolizin (piolizin), dve neuraminidaze, više proteaza, ekstracelularne matriks-vezujuće proteine, dezoksiribonukleaze, fimbrije. Faktori virulencije su dobro izučeni u laboratorijskim uslovima, ali njihova jasna uloga u patogenezi infekcija izazvanih ovom bakterijom i dalje nije u potpunosti rasvetljena. U novije vreme se sposobnost *A. pyogenes* da formira biofilm *in vivo*, takođe razmatra kao faktor virulencije i mogući razlog za terapijski neuspeh. Iako beta laktamski antibiotici i tetraciklini u niskim koncentracijama pokazuju dobar inhibitorni efekat na izolate *A. pyogenes* iz mleka krava sa mastitisom, klinička iskustva pokazuju da je terapija retko uspešna, prognoza loša i da infekcija uobičajeno rezultira gubitkom sekrecije obolele četvrti vimena.

*Ključne reči: Arcanobacterium pyogenes, faktori virulencije, mastitis, terapija*

**Uvod / Introduction**

*Arcanobacterium pyogenes* prvi je izolovao Glage 1903. godine i nazvao ga *Bacillus pyogenes*. Zbog sličnosti sa korineformnim mikroorganizmima,

\* Rad primljen za štampu 04. 03. 2011. godine

\*\* Dr sci. med. vet. Dubravka Milanov, dr sci. med. vet. Jelena Petrović, dr sci. med. vet. Miloš Kapetanov, Naučni institut za veterinarstvo „Novi Sad”, Novi Sad; dr sci med. vet. Ljiljana Suvajdžić, Medicinski fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad

isti autor je u saradnji sa Ebersonom 1918. predložio naziv *Corynebacterium pyogenes*, a promena u genus *Actinomyces* predložena je 1981. godine. Na osnovu analize sekvenci 16S rRNA, reklasifikovan je u genus *Arcanobacterium*, što je i trenutna taksonomska pozicija ove bakterijske vrste (Ramos i sar., 1997).

*Arcanobacterium pyogenes* je komensal sluzokože respiratornog i genitalnog trakta goveda, svinja, ovaca, ptica i drugih ekonomski važnih vrsta životinja. Može se izolovati iz tonzila, retrofaringealnih limfnih čvorova i vimena zdravih životinja (Jost i sar., 2002/a). Moguće prirodno stanište ove bakterije je i sluzokoža buraga goveda i želuca svinja (Narayanan i sar., 1998; Jost i sar., 2002/a). Ona nije deo normalne mikroflore sluzokoža čoveka (Jost i sar., 2005). Patogeni potencijal *A. pyogenes* godinama je bio predmet diskusije, ali danas je poznato da kao primarni uzročnik izaziva supurativne infekcije različitih vrsta tkiva i organa ili se nadovezuje na prethodne infekcije izazvane drugim patogenima. Lezije su apscesi, empijemi i piogranulomi, a infekcije mogu biti lokalne, regionalne i metastatske. Do kasnih 70-ih godina potcenjivana je njegova uloga u izazivanju bolesti kod ljudi. Predrasuda da je on patogen samo za životinje, navela je naučnike da kasnih 50-ih godina njemu srodnu vrstu *A. haemolyticum* proglase za *A. pyogenes* varijanta hominis (Suvajdžić, 2000).

I pored značaja koji ova bakterijska vrsta ima u veterinarskoj medicini, do danas nisu u potpunosti poznati mehanizmi patogeneze bolesti koje izaziva. U ovom radu prikazujemo nama poznate činjenice o faktorima virulencije *A. pyogenes*, značaju ove bakterije u etiologiji mastitisa krava i moguće razloge za neuspeh terapije uprkos dobroj osetljivosti izolata na antibiotike, *in vitro*.

### **Patogeneza i patologija / *Patogenesis and pathology***

*A. pyogenes* još nedovoljno poznatim mehanizmima izaziva različite nespecifične purulentne infekcije: apscese jetre i bubrega goveda (Ertas i sar., 2005), endokarditis krava, akutni purulentni i hronični apscedirajući mastitis krava, ovaca i koza (Al-Graibawi i sar., 1986; Hillerton i Branley, 1989; Somer i sar., 1996), abortuse (Lewis, 1997), vezikulitis, puerperalni endometritis krava (Földi i sar., 2006), supurativne pneumonije goveda i svinja, septični poliartritis svinja (Hariharan i sar., 1992), umbilikalne infekcije, osteomijelitis ćuraka (Brinton i sar., 1993). U našim laboratorijama, ova bakterija se relativno često izoluje iz zapaljenjskih lezija pluća svinja i goveda, uzoraka materične sluzi krava sa endometritisom i mleka krava sa kliničkim mastitisom (Suvajdžić, 2000; Suvajdžić i sar., 2001). Ređe uzrokuje infekcije kod ljudi (Gahrn-Hansen i Frederiksen, 1992). Često infekcije kod ljudi nastaju kao posledica profesionalne izloženosti ovoj bakteriji. Brojni faktori virulencije ove bakterije mogu objasniti kako je *A. pyogenes* sposoban da kolonizira različita tkiva domaćina i izazove bolest. Ipak, većina aspekata patogeneze infekcija izazvanih ovim važnim oportunističkim patogenom i dalje je slabo poznata (Jost i Billington, 2005).

### **Faktori virulencije *A. pyogenes* / *A. pyogenes virulence factors***

*A. pyogenes* proizvodi više potencijalnih faktora virulencije, uključujući egzoenzime (neuraminidaze, dezoksiribonukleaze, više proteaza), hemolitički endotoksin pilozin, ekstracelularne matriks vezujuće proteine (kolagen-, fibrinogen- i fibronektin-vezujući proteini), fimbrije i dr. Ovi faktori su važni za kolonizaciju tkiva domaćina, odbranu od efektora imunskog sistema i izazivanje oštećenja inficiranog tkiva.

#### **Neuraminidaze i ekstracelularni matriks vezujući proteini / *Neuraminidase and extracellular matrix-binding proteins***

U adheziji *A. pyogenes* na tkiva domaćina, važna uloga pripada neuraminidazama (ili sialidazama – *sialidases*). Generalno, neuraminidaze olakšavaju adheziju bakterija na sluzokožu smanjujući viskoznost sluzi, ali one deluju i na lokalni imunski odgovor povećavajući osetljivost sekretornih IgA na bakterijske proteaze (Jost i Billington, 2005). Kod *A. pyogenes* su identifikovana dva proteina koja imaju aktivnost neuraminidaza – NanH i NanP, i oba se nalaze u sastavu ćelijskog zida. NanH je nađen kod svih izolata *A. pyogenes*, a NanP kod 77,4% izolata poreklom od goveda i 29,4% poreklom od svinja (Jost i sar., 2002/b). NanH mutant nije bitno oštećen u pogledu sposobnosti kolonizacije, zbog aktivnosti druge neuraminidaze NanP. Dupli mutanti bez NanP i NanH neuraminidaza imaju redukovanu, ali ne i izgubljenu sposobnost adhezije, što ukazuje na to da je aktivnost neuraminidaza neophodna za kompletnu adheziju, ali i da su druge komponente uključene u proces vezivanja za ćelije domaćina. To se odnosi na proteine ćelijskog zida *A. pyogenes* kao što su: kolagen-, fibronektin- i fibrin-vezujući proteini koji omogućavaju vezivanje za komponente ekstracelularnog matriksa tkiva domaćina. Ta klasa adhezina koja se vezuje za komponente ekstracelularnog matriksa (ECM) domaćina, pripada MSCRAMM familiji proteina (*microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*). Ovi proteini se vezuju za jednu ili više komponenti ekstracelularnog matriksa ćelija domaćina, kao što su kolagen, fibronektin, laminin i dr.

Kolagen-vezujući protein CpbA (*collagen-binding protein A*) je jedan 124.7 kDa protein ćelijskog zida *A. pyogenes*, koji se vezuje za kolagen tipa I, II i IV (Esmay i sar., 2003). Kolagen nije ekspresioniran u intaktnom tkivu, za razliku od receptora na epitelnim ćelijama za bakterijske neuraminidaze. Zato prethodna oštećenja tkiva, zapaljenski procesi i traume pogoduju nastanku infekcija sa *A. pyogenes*. Vezivanje za kolagen može biti signal koji povećava patogeni potencijal ove bakterije, što dovodi do invazije tkiva i posledičnog hematogenog širenja, te nastanka apscesa jetre, septičnih artritisa i osteomijelitisa (Jost i Billington, 2005). CpbA je ustanovljen kod 48% izolata *A. pyogenes* koji su izazvali infekcije mekih tkiva ili koji su bili deo normalne mikroflore sluzokože, ali je nađen kod svih sojeva izolovanih kod osteomijelitisa čuraka (Esmay i sar., 2003). Različita zastupljenost adhezivnih molekula, kao što je i CpbA, sugerira mogućnost da su ovi

adhezivni molekuli faktori virulencije specifični za bolest (Esmay i sar., 2003). Zato se ovaj adhezivni protein razmatra generalno kao faktor virulencije specifičan za nastanak infekcija koštanog tkiva. Kod *Staphylococcus aureus* je dokazano da mutanti bez ovog proteina imaju znatno redukovanu sposobnost izazivanja osteomijelitisa (hematogenog) na modelu infekcije miševa (Elasri i sar., 2002). Kolagen-vezujući proteini su veoma važni u adheziji za koštana i hrskavičava tkiva koja su bogata kolagenom.

Fibronektin-vezujući protein značajno povećava fagocitozu *A. pyogenes* od strane govedih polimorfonukleara. Međutim, kako *A. pyogenes* preživljava unutar fagocita, ova povećana fagocitoza može doprineti hematogenoj diseminaciji uzročnika po organizmu.

### **Hemolitični egzotoksin – piolizin (PLO) / *Hemolytic exotoxin – pyolysin (PLO)***

Hemolitični egzotoksin *A. pyogenes* – piolizin (PLO), jeste ekstracelularni toksin koji izaziva lizu eritrocita više vrsta životinja. Odgovoran je za karakterističnu hemolizu koju ova bakterija izaziva dok raste na agaru sa dodatkom ovčije krvi. Specifična antitela dobijena na prečišćeni, rekombinantni PLO, kompletno neutrališu hemolitičku sposobnost *A. pyogenes*, što sugerise da je ovo jedini hemolizin ove bakterije (Billington i sar., 1997). PLO se smatra glavnim faktorom virulencije *A. pyogenes* i njega proizvode svi izolati ove bakterije. Smatra se da je ključan za *in vivo* preživljavanje i da štiti *A. pyogenes* tokom ranih faza infekcije (Jost i sar., 1999).

Piolizin pripada grupi TACYs (*thiol activated cytolysins*), familije holesterol-zavisnih toksina (*cholesterol-dependent cytolysin CDCs*) (Billington i sar., 2000). Ove toksine proizvode više od 20 vrsta gram pozitivnih bakterija. TACY toksini su hidrosolubilni, jednolančani polipeptidi molekulske mase od 47 do 60 kDa. PLO ima 30-40% sličnosti u aminokiselinskim sekvencama sa drugim CDCs (Billington i sar., 1997). CDCs su uključeni u mehanizam patogeneze infekcija izazvanih *Clostridium perfringens* (perfringolizin O – PFO), *Listeria monocytogenes* (listeriolizin O – LLO), *Streptococcus pneumoniae* (pneumolizin – PLY) i *Streptococcus pyogenes* (streptolizin O – SLO). Iako su TACY originalno opisani kao hemolizini, zato što pokazuju litičku aktivnost prema eritrocitima životinja, njihova osnovna meta u patogenezi infekcije su ćelije uključene u odbranu od infekcije (Billington i sar., 2000). PLO ima citolitički efekat na polimorfonukleare i makrofage goveda i ovaca, a direktna toksičnost na imune ćelije utiče i na ćelijsku signalizaciju, ekspresiju citokina i drugih medijatora zapaljenja (Billington i sar., 1997; Jost i sar., 1999). Tokom ranih faza infekcije, ovaj toksični uticaj na ćelije imunskog sistema onemogućava efikasno uklanjanje patogena i rezultira njegovom invazijom do ciljnog mesta u organizmu.

TACY toksini deluju litički na ćelije domaćina formirajući velike pore na eukariotskim ćelijskim membranama, dijametra preko 30 nm, koje omogućavaju prolaz jona i makromolekula. Holesterol je inicijalni i jedini receptor na eukariotskim ćelijskim membranama za TACY toksine (Billington, 2000). Citolitička aktiv-

nost TACY toksina inhibirana je malim količinama slobodnog holesterola. Naziv grupe potiče iz zapažanja da ovi enzimi reverzibilno gube aktivnost oksidacijom i da im dodatak redukujućih agenasa, kao što je tiol, vraća aktivnost. U prečišćenoj formi ovi toksini nisu osetljivi na oksidaciju i uprkos njihovom nazivu, danas je poznato da tiol aktivacija ovih enzima nije njihova najvažnija osobina. PLO se razlikuje od drugih toksina ove familije po tome što njegova hemolitička aktivnost nije tiol-aktivirana (Billington i sar., 1997). Još jedan član ove grupe toksina nije tiol aktiviran – ILY toksin *Staphylococcus intermedius*, citolizin specifičan za humane ćelije (Billington i sar., 2000). Zato se predlaže oznaka za ovu grupu toksina: holesterol vezujući pore-formirajući toksini CHOP (*cholesterol binding, pore-forming toxins*).

Piolizin deluje letalno i dermonekrotično na laboratorijske životinje, nakon intravenske i intraperitonealne aplikacije. Antitela na ovaj toksin nađena su u krvi i prirodno i veštački inficiranih životinja. Pasivno preneti antitela kompletno štite miševе od letalnog ćelindža sa *A. pyogenes*, sugerišući da je PLO, slično drugim TACYs, jedan važan faktor virulencije u patogenezi infekcije izazvane ovom bakterijom (Billington i sar., 1997). Na modelu infekcije miševa, dokazano je da *A. pyogenes* sa PLO mutacijom ima smanjenu virulenciju u odnosu na divlji soj (Jost i sar., 1999). Moguće je da PLO omogućava lizu polimorfonukleara ili makrofaga i izbegavanje fagocitoze (Billington i sar., 1997). I pored toga, jasna uloga ovog toksina u patogenezi infekcije i dalje je nepoznata.

Drugi faktori virulencije *A. pyogenes* uključuju ekstracelularne proteine (enzime) kao što su proteaze i DNase. Proteaze su važne u invaziji i destrukciji tkiva, izbegavanju odbrane organizma i modulaciji imunskog sistema tokom infekcije i inflamacije. DNase izazivaju depolimerizaciju DNA oslobođenih iz dez-integriranih ćelija domaćina u inflamatornim lezijama.

### **Fimbrije / *Fimbria***

Fimbrije su proteinske filamentozne strukture koje produkuje veliki broj gram-negativnih bakterija, ali su retko prisutne kod gram-pozitivnih bakterija (imaju ih *Actinomyces* spp., neke oralne streptokoke, više vrsta *Corynebacterium* i *Arcanobacterium pyogenes*). Poznata su dva gena koja kodiraju biosintezu fimbrija kod *A. pyogenes* (*fimA* i *fimB*), ali oni nisu zastupljeni kod svih izolata (Jost i Billington, 2005). Izolati imaju oba ili nijedan od ovih gena. Tačna uloga ovih proteinskih struktura u patogenezi infekcije nije poznata, ali je pretpostavka da učestvuju u procesima adhezije na tkivo domaćina, verovatno vezivanjem za fibronektin.

### **Intracelularno preživljavanje / *Intracellular survival***

Iako se *A. pyogenes* smatra ekstracelularnim patogenom, dokazano je da ima sposobnost invazije epitelnih ćelija. U epitelnim ćelijama preživljava 72h, ali se broj bakterija u tom periodu smanjuje, što ukazuje na to da se intracelularno

ne razmnožava. Takođe, *A. pyogenes* može preživeti unutar fagocita. Za razliku od *L. monocytogenes* koja koristi LLO za preživljavanje unutar makrofaga, *A. pyogenes* ne zahteva PLO za intracelularni opstanak i mutanti bez ovog gena imaju isti stepen preživljavanja kao i divlji sojevi (Jost i Billington, 2005).

Jedna od karakteristika virulencije *A. pyogenes* može biti i njegova sposobnost da formira biofilm in vivo, jer je formiranje biofilma regulisano zajedničkim regulatorom gena virulencije (Jost i Billington, 2005). Biofilmovi su posebne strukturne i funkcionalne zajednice koje bakterije formiraju nakon ireverzibilnog vezivanja za žive ili nežive površine (Milanov i sar., 2007; Milanov i sar., 2008). U biofilmu su kolonije bakterija prekrivene ekstracelularnom polimeričnom supstancijom koja je bakterijski produkt i koja ih štiti od antibiotika i efektoru imunog sistema organizma domaćina. Smatra se da formiranje biofilma ima važnu ulogu kod mastitisa krava izazvanih *A. pyogenes* i ova pretpostavka je potkrepljena činjenicom da su ovi mastitisi hroničnog toka i da je terapija uglavnom bez uspeha (Waage i sar., 2000; Gröhn i sar., 2004). Slično se i neuspeh u terapiji mastitisa izazvanih *Staphylococcus aureus* i *Pseudomonas aeruginosa*, pripisuju njihovoj sposobnosti da u tkivu vimena perzistiraju u formi biofilma (Milanov i sar., 2010/a; Milanov i sar., 2010/b). Rezistencija bakterija koje rastu u biofilmu u suštini predstavlja povećanu otpornost bakterija prema ubijanju ili povećanu sposobnost preživljavanja. Ona se objašnjava smanjenim prodorom antibiotika u biofilm, smanjenom brzinom (vrednostima) rasta bakterija u biofilmu, ekspresijom mogućih gena rezistencije i povećanom vrednošću genetskog transfera.

#### **A. pyogenes kao uzročnik mastitisa krava /**

##### *A. pyogenes as cause of mastitis in cows*

Prema rezultatima bakteriološkog pregleda mleka u našoj laboratoriji, *A. pyogenes* je uzročni agens 2-4% infekcija mlečne žlezde krava, što je slično podacima iz drugih zemalja. Zbog niske incidencije mastitisa izazvanih njome, bakterija *A. pyogenes* se ne svrstava u grupu glavnih patogena ("major pathogens") za mlečnu žlezdu, ali je od velikog značaja zbog težine kliničkih manifestacija infekcije i problema u terapiji. *A. pyogenes* može da se izoluje i kod rekurentnih ili hroničnih slučajeva blažih kliničkih mastitisa kod krava sa istorijom koliformnih mastitisa ili mastitisa izazvanih drugim vrstama bakterija (Divers and Peek, 2007). Oštećenje parenhima mlečne žlezde, što je česta posledica infekcija izazvanih koliformnim uzročnicima, stvara dispoziciju i za razvoj infekcije sa *A. pyogenes*. Kako je *A. pyogenes* komensal kože i sluzokože, infekcija mlečne žlezde ovom bakterijom najčešće nastaje kao posledica mehaničkih oštećenja epitela sisnog kanala, što otvara vrata za infekciju. *A. pyogenes* ima dobra invazivna svojstva i prodire duboko u žlezdani parenhim, slično kao *S. aureus* i *Streptococcus uberis* (Milanov i Stojanović, 2010/c). Prodor patogena u tkivo mlečne žlezde praćen je snažnom inflamatornom reakcijom, obilnom purulentnom eksudacijom,

formiranjem apscesa, nakupljanjem tkivnog detritusa, leukocita, fibrina i okluzijom mlečnih kanala sekretornog tkiva.

*A. pyogenes* ima posebnu ulogu u nastanku tzv. letnjeg mastitisa. Letnji mastitis je aerobno-anaerobna supurativna infekcija mlečne žlezde junica i krava u zasušenju, a naziv je dobio po tome što se tipično javlja tokom letnjih meseci (od juna do septembra). O pojavi ovog tipa mastitisa postoje brojni izveštaji iz zemalja severne Evrope, Grčke, Japana, USA, Australije, Brazila... Epidemiologija bolesti je u korelaciji sa geografskom distribucijom muva vrste *Hydrotaea irritans*, koja se generalno smatra vektorom. Prenošenje *A. pyogenes* muvama sa krave na kravu je mehaničko, a *H. irritans* ne spada u prave vektore, jer se ova bakterija u njoj ne umnožava i eliminiše se iz digestivnog sistema ovog insekta za 4 dana. Pojavljivanje infekcije dovodi se u vezu sa držanjem goveda na peščanim tereni-ma ili niskim šumovitim područjima sa slabom drenažom. Letnji mastitis je dijagnostikovao u 39-54% zapata mlečnih krava, a incidenca u proseku iznosi 2,1 do 4,1 slučaja po zapatu (Berry, 1998). Većina, ali ne i sve infekcije, javljaju se tokom prve dve nedelje zasušenja. Moguće su epidemije, kada više od 25% zasušenih krava može biti inficirano. Bakteriološki pregled sekreta vimena krava sa letnjim mastitisom pokazuje da je u infekciju uključeno više patogenih bakterija. Uobičajeno se izoluju *Arcanobacterium pyogenes*, *Streptococcus dysgalactiae*, Stjuart-Švanove mikroaerofilne koke i anaerobne nesorulirajuće bakterije: *Peptostreptococcus indolicus* i *Fusobacterium necrophorum* (Sommer i sar., 1996; Berry, 1998).

Faktori rizika za pojavu letnjeg mastitisa uključuju izostanak tretmana krava u zasušenju, izloženost muvama, teljenje u jesenjim mesecima i oštećenja sisnog kanala. Letnji mastitis je klinički manifestna infekcija. Akutno inficirana četvrt je otečena, tvrda i bolna. Mastitis može biti praćen sistemskim znacima kao što su febra i inapetencija. Sekretacija obolele četvrti je jako promenjena, vodenasta, sa krpicama i ugrušcima. Krave sa subakutnom ili hroničnom infekcijom nemaju sistemske znake bolesti, ali je mlečna žlezda veoma otečena, tvrda, a sekret po konzistenciji nalik pastu za zube, gnojan i neprijatnog mirisa. Tok bolesti je brz i progresivan sa formiranjem apscesa i destrukcijom tkiva obolele četvrti (Thomas i sar., 1987). Sekretorna funkcija inficirane četvrti uobičajeno je izgubljena. Bez adekvatnog tretmana, bolest rezultira febrim, septikemijom, edemom zadnjih nogu, abortusom ili perinatalnim mortalitetom (Berry, 1998). Infekcije se mogu javiti i kod junica. Prevencija podrazumeva higijenu smeštaja zasušenih krava u čistim i suvim štalama, redovan pregled vimena zasušenih krava, uništavanje muva i aseptičnu aplikaciju lekova u zasušenju.

Lečenje mastitisa izazvanog sa *A. pyogenes*, uglavnom ne daje zadovoljavajuće rezultate. Situacija je još teža u slučaju mešane infekcije sa anaerobnim bakterijama. Problemi terapije vezani su za farmakokinetiku određenih lekova, brz metabolizam lekova kod preživara, obilno nakupljanje gnoja, ćelijskog detritusa i inkapsulaciju inficiranog područja. Iako je prognoza loša, uspeh terapije moguće je očekivati kod blagovremenog prepoznavanja infekcija mlečne žlezde izazvanih *A. pyogenes*, a pre formiranja apscesa. Pre primene antibiotika, neop-

hodno je kompletno izmisti vime (što s obzirom na konzistenciju sekreta, može biti veliki problem).

*In vitro* ispitivanje osetljivosti bakterijskih vrsta izolovanih kod pojava letnjeg mastitisa – *A. pyogenes*, *S. dysgalactiae*, i anaeroba – *P. indolicus*, *F. necrophorum*, *Bacteroides* spp., potvrdilo je njihovu dobru osetljivost na penicilin, amoksicilin i amoksicilin-klavulonsku kiselinu. Penicilin i ampicilin su aktivni protiv izolata *A. pyogenes*, uprkos njihove upotrebe poslednjih 25 godina u veterinarskoj medicini (Yoshimura i sar. 2000). Međutim, u vodenim solucijama, beta-laktamski antibiotici se brzo eliminišu iz organizma. Penicilin se takođe sporo distribuira u mlečnoj žlezdi jer je slaba kiselina (Somer i sar., 1996). Penicilin treba aplikovati sistemski (22 000 U/kg, dva puta dnevno), minimalno tokom jedne nedelje, u inficiranu četvrt, jednom ili dva puta dnevno. Većina slučajeva zahteva 7-14 dana dug tretman antibioticima (Divers and Peek, 2007). Postepeno omekšavanje inficirane četvrti je povoljan prognostički znak, kao i smanjenje otoka i smanjenje viskoznosti sekreta.

Alternativa penicilinu su makrolidi, na koje izolati *A. pyogenes* poreklom od krava pokazuju dobru osetljivost (Yoshimura i sar., 2000). Većina makrolidnih antibiotika ima dobru farmakokinetiku kod krava u laktaciji zato što su rastvorljivi u lipidima i postižu dobru koncentraciju u mleku. Međutim, primena makrolida u terapiji letnjeg mastitisa nije uspešna, zato što su anaerobi iz roda *Fusobacterium* učestalo rezistentni na makrolide kao što je eritromicin (Somer i sar., 1996). Oksitetraciklin je najčešći lek koji se koristi u tretmanu mešoviti i anaerobnih infekcija krava. Osetljivost izolovanih sojeva *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Prevotella* i *Peptostreptococcus* na tetracikline je dobra, ali povremeno aerobni izolati pokazuju rezistenciju. Oksitetraciklin nije idealan zato što je teško održati dovoljnu koncentraciju i zato što kazein iz mleka interferira sa njegovom aktivnošću. Kod sojeva *A. pyogenes* izolovanih kod krava i svinja ustanovljen je visok stepen rezistencije na streptomycin i oksitetraciklin (Yoshimura i sar. 2000).

Iako izolati *A. pyogenes* iz mleka krava sa mastitisom pokazuju dobru osetljivost na većinu antibiotika koji se koriste u tretmanu mastitisa, posebno beta laktamske preparate, ova osetljivost nije u korelaciji sa kliničkim uspehom u terapiji. Terapija je retko uspešna, a infekcije često rezultiraju gubitkom funkcije inficirane četvrti. Jasno je da standardni difuzioni i dilucioni testovi nisu pouzdan kriterijum za odabir antibiotika, zbog sposobnosti *A. pyogenes* da u tkivu vimena perzistira u formi biofilma. Tako je primena CBD (*Calgari Biofilm Device*) pokazala da efikasno uništavanje izolata *A. pyogenes* koji rastu u biofilmu, zahteva mnogo više koncentracije antibiotika u odnosu na one koje su dovoljne za uništavanje istih izolata primenom standardnog dilucionog testa. Dok za penicilin G, kloksacilin, ceftiofur, ampicilin i tetraciklin, minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) iznosi manje od 2 µg/mL, minimalna biofilm eradikaciona koncentracija (MBEC) iznosi za ampicilin 500 µg/mL, a za ostale navedene antibiotike i više od 1024 µg/mL (Olson i sar., 2002). Za više bakterijskih infekcija u veterinarskoj medicini je potvrđeno da određivanje minimalne inhibitorne koncentracije za pojedine antibio-

tike nije u korelaciji sa uspehom kod njihove kliničke primene. To je potvrđeno i za *Staphylococcus aureus* izolate iz mleka krava sa mastitisom (Olson i sar., 2002). Određivanje MBEC i primena CBD u odnosu na standardne dilucione i difuzione testove, predstavlja adekvatniju metodologiju za efikasan odabir antibiotika u lečenju ovih infekcija, kao i za razvoj novih lekova efikasnih protiv bakterija koje rastu u biofilmu.

#### Literatura / References

1. Al-Graibawi MA, Sharma VK, Al-Shammari AJ. Microbial pathogens from goat mastitis and phage-typing of *Staphylococcus aureus* isolates. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 1986; 9(1): 23-8.
2. Berry E. Update on summer mastitis, Proceedings of the British Mastitis Conference, Axient/Institute for Animal Health, Milk Development Council/Novartis Animal Health, 1998; 46-53.
3. Billington SJ, Jost BH, Cuevas WA, Bright KR, Songer JG. The *Arcanobacterium* (*Actinomyces*) *pyogenes* Hemolysin, Pyolisin, Is a Novel Member of the Thiol-Activated Cytolysin Family. *J Bacteriol* 1997; 179: 6100-6.
4. Billington SJ, Jost BH, Songer JG. Thiol-activated cytolysins: structure, function and role in pathogenesis. *FEMS Microbiology Letters* 2000; 182: 197-205.
5. Brinton MK, Schelberg LC, Johnson JB, Frank RK, Halworson DA, Newman JA. Description of osteomyelitis lesions associated with *Actinomyces pyogenes* infection in the proximal tibia adult male turkeys. *Avian Dis* 1993; 37: 259-62.
6. Divers TJ, Peek SF. Diseases of Body Systems In: Mastitis in Diseases of dairy cattle, 2007; 366-7. ([http://books.google.com/books?Arcanobacterium+pyogenes+milk+mastitis & source](http://books.google.com/books?Arcanobacterium+pyogenes+milk+mastitis&source))
7. Elasar MO, Thomas JR, Skinner RA, Blevins JS, Beenken KE, Nelson CL, Smelter MS. *Staphylococcus aureus* collagen adhesin contributes to the pathogenesis of osteomyelitis. *Bone* 2002; 30: 275-80.
8. Ertas HB, Kilic A, Özbey G, Muz A. Isolation of *Arcanobacterium* (*Actinomyces*) *pyogenes* from abscessed cattle kidney and identification by PCR. *Turk J Vet Anim Sd* 2005; 29: 455-9.
9. Esmay PA, Billington SJ, Link MA, Songer JG, Jost BH. The *Arcanobacterium pyogenes* Collagen-Binding Protein, CbpA, Promotes Adhesion to Host Cells. *Infection and Immunity* 2003; 71: 4368-74.
10. Földi J, Kulcsar M, Petesi A, Hayghe B, de Sa C, Lohuis JACM, Cox P, Huszenicza G. Bacterial complications of postpartum uterine involution in cattle. *Anim Reprod Sci* 2006; 96: 265-81.
11. Gahrn-Hansen B, Frederiksen W. Human infections with *Actinomyces pyogenes* (*Corynebacterium pyogenes*). *Diagn Microbiol Infect Dis* 1992; 15: 349-54.
12. GröhnYT, Wilson DJ, Gonzalez RN, Hertl JA, Schulte H, Bennett G, Schukken YH. Effect of pathogen-specific clinical mastitis on milk yield in dairy cows. *J Dairy Sci* 2004; 87: 3358-74.
13. Hariharan H, MacDonald J, Carnat B, Bryenton J, Heaney S. An investigation of bacterial causes of arthritis in slaughter hogs. *J Vete Diag Invest* 1992; 4: 28-30.

14. Hillerton JE, Bramley AJ. Infection following challenge of the lactating and dry udder of dairy cows with *Actinomyces pyogenes* and *Peptostreptococcus indolicus*. *British Vet J* 1989; 145: 148-59.
15. Jost BH, Songer JG, Billington SJ. An *Arcanobacterium (Actinomyces) pyogenes* mutant deficient in production of the pore-forming cytolysin pyolysin has reduced virulence. *Infect Immun* 1999; 67(4): 1723-8.
16. Jost BH, Post KW, Songer JG, Billington SJ. Isolation of *Arcanobacterium pyogenes* from the porcine gastric mucosa. *Vet Res Communicat* 2002/a; 26: 419-25.
17. Jost BH, Songer JG, Billington SJ. Identification of a second *Arcanobacterium pyogenes* neuraminidase and involvement of neuraminidase activity in host cell adhesion. *Infect Immun* 2002/b; 70(3): 1106-12.
18. Jost BH, Billington SJ. *Arcanobacterium pyogenes*: molecular pathogenesis of an animal opportunist. *Antonie van Leeuwenhoek* 2005; 88(2): 87-102.
19. Lewis GS. Uterine health and disorders. *J Dairy Sci* 1997; 80, 984-94.
20. Milanov D, Ašanin R, Mišić M, Vidić B, Ratajac R. Investigation of biofilm formation in vitro ability of *Listeria monocytogenes* strains isolated from animals. *Acta Veterinaria* 2007; 57(5-6): 429-40.
21. Milanov D, Ašanin R, Vidić B, Petrović J, Krnjajić D. Biofilm-organizacija života bakterija u prirodnim ekosistemima. *Arhiv veterinarske medicine* 2008; 1(2): 3-13.
22. Milanov D, Lazić S, Vidić B, Petrović J, Bugarski D, Šeguljev Z. Slime production and biofilm forming ability by *Staphylococcus aureus* bovine mastitis isolates. *Acta Veterinaria* 2010/a; 60(2-3): 217-26.
23. Milanov D, Petrović J, Suvajdžić L, Čubrak N. Produkcija biofilma kod bakterijskih vrsta *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* i *Pseudomonas aeruginosa* izolovanih iz mleka krava sa mastitisom. Zbornik kratkih sadržaja simpozijuma "Stočarstvo, veterinarska medicina i ekonomika u ruralnom razvoju i proizvodnji zdravstveno bezbedne hrane", Divčibare, 2010/b: 28.
24. Milanov D, Stojanović D. O uzročnicima mastitisa krava (uz neke nedoumice iz prakse). Zbornik radova naučnog simpozijuma "Oboljenja mlečne žlezde", Divčibare, Beograd, Naučna KMD, 2010/c: 93-101.
25. Narayanan S, Nagaraja TG, Wallace N, Staats J, Chengappa MM, Oberst RD. Biochemical and ribotypic comparison of *Actinomyces pyogenes* and *Actinomyces pyogenes*-like organisms from liver abscesses, ruminal wall and ruminal contents of cattle. *Am J Vet Res* 1998; 59: 271-6.
26. Olson ME, Ceri H, Morck DW, Buret AG, Read RR. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Can J Vet Res* 2002; 66: 86-92.
27. Ramos CP, Foster G, Collins MD. 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* comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 1997; 47(1): 46-53.
28. Somer JH, Pyörälä S, Kanervo A. Susceptibilities of bovine summer mastitis bacteria to antimicrobial agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1996; 40(1): 157-60.
29. Suvajdžić Lj. Izučavanje karakteristika *Actinomyces pyogenes* i sličnih mikroorganizama izolovanih iz pluća teladi i prasadi sa pneumonijom. Doktorska disertacija; Fakultet veterinarske medicine, Beograd, 2000.

30. Suvajdžić Lj, Milanov D, Lalić M, Bugarski D, Pušić I, Suvajdžić Z. *Arcanobacterium* (actinomyces) *pyogenes* izolovan iz mleka krave sa mastitisom. Veterinarski žurnal Republike Srpske 2001; 1: 115-8.
31. Thomas G, Oliver HJ, Vecht U, Nansen P. Summer mastitis. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, Netherlands 1987; 90-7.
32. Waage S, Skei HR, Rise J, Rogdo T, Sviland S, Ødegaard SA. Outcome of Clinical Mastitis in Dairy Heifers Assessed by Reexamination of Cases One Month After Treatment. J Dairy Sci 2000; 83(1): 70-6.
33. Yoshimura H, Kojima A, Ishimari M. Antimicrobial susceptibility of *Arcanobacterium pyogenes* isolated from cattle and pigs. J Vet Med 2000; 47: 139-43.

## ENGLISH

### ***Arcanobacterium pyogenes* – VIRULENCE FACTORS, IMPORTANCE IN MASTITIS ETIOLOGY AND THERAPEUTIC (IM)POSSIBILITIES**

**Dubravka Milanov, Jelena Petrović, M. Kapetanov, Ljiljana Suvajdžić**

*Arcanobacterium pyogenes* is an opportunistic pathogen, a causative agent of suppurative infections of organs and tissues in economically important livestock species. Most frequently this bacteria is isolated from inflamed lung lesions in pigs and cattle, in samples of uterine mucus of cows with endometritis and milk from cows with clinical mastitis. *A. pyogenes* possesses a number of virulence factors: cholesterol-dependent cytolysin (pyolysin), two neuraminidases, several proteases, extracellular matrix-binding proteins, DNases, fimbriae. The virulence factors are well studied in laboratory conditions, but the role of these factors in the pathogenesis of *A. pyogenes* infections remains to be elucidated. Lately, the ability of *A. pyogenes* to form biofilm *in vivo* has also been implicated as a virulence factor and a possible cause of therapeutic failure. Despite the fact that *A. pyogenes* milk isolates in cows with mastitis *in vitro* are very sensitive to  $\beta$ -lactam drugs and tetracycline, experience has shown that therapy is usually ineffective, prognosis is poor and the affected quarter is lost for milk production.

Key words: *Arcanobacterium pyogenes*, virulence factors, mastitis, antimicrobial therapy

## РУССКИЙ

### ***Arcanobacterium pyogenes* – ФАКТОРЫ ВИРУЛЕНТНОСТИ, ЗНАЧЕНИЕ В ЭТИОЛОГИИ МАСТИТА И ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ (НЕ)ВОЗМОЖНОСТИ**

**Дубравка Миланов, Елена Петрович, М. Капетанов, Лиляна Сувайджич**

*Arcanobacterium pyogenes* оппортунистический патоген, возбудитель гнойных инфекций различных органов и тканей у экономически важных домашних животных. Наиболее учащённо эта бактерия изолируется из воспалительных поражений лёгких свиней и крупного рогатого скота, образчиков маточной слизи коров с эндометритом и молока коров с клиническим маститом. *A. pyogenes* имеет в

собственности численные факторы вирулентности: холестрин зависимый цитолизин (пиолизин), две нейраминидазы, больше протеаз экстрацеллюлярные матрикс-связывающие протеины, дезоксирибонуклеазы, фимбрии. Факторы вирулентности хорошо изучены в лабораторных условиях, но их ясная роль в патогенезе инфекций, вызванных этой бактерией и дальше не полностью освещена. В более новое время способность *A. pyogenes* формировать биофильм *in vivo*, также рассматривает как фактор вирулентности и возможная причина для терапевтического неуспеха. Хотя бета лактамные антибиотики и тетрациклины в низких концентрациях показывают хороший ингибиторный эффект на изоляте *A. pyogenes* из молока коров с маститом, клинические опыты показывают, что терапия редко успешна, прогноз плохой и что инфекция рпывично проистекает убытком секреции заболевшей четверти вымени.

Ключевые слова: *Arcanobacterium pyogenes*, факторы вирулентности, мастит, терапия