

Charakterystyka fenotypowa i czynniki zjadliwości *Trueperella pyogenes*

ŁUKASZ JAROSZ, ZBIGNIEW GRĄDZKI, MARCIN KALINOWSKI

Katedra Epizootologii i Klinika Chorób Zakaźnych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej,
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, ul. Głęboka 30, 20-612 Lublin

Jarosz Ł., Grądzi Z., Kalinowski M.

Phenotypic properties and virulence factors of *Trueperella pyogenes*

Summary

T. pyogenes belongs to Gram-positive, facultative anaerobic, pleomorphic, non-spore forming microorganisms, currently classified as a representative of the genus *Trueperella*. Species from this genus have been separated from *Arcanobacterium* to constitute a new taxonomic unit. The primary basis for the reclassification of these microorganisms was provided by the results of investigations concerning the presence and types of isoprenoid quinones in the bacterial cell wall. Biochemical studies were subsequently extended to include the analyses of the 16S rRNA gene sequence, the peptidoglycan structure, the G+C content in the DNA strand, the profile of lipid acids, the cell wall sugar composition, the type of muramyl acyl groups, the polar lipid profile, and the menaquinone composition. Owing to a variety of virulence factors, *T. pyogenes* is able to colonise many tissues, causing clinical symptoms in various organs and systems. The main virulence factor in *T. pyogenes* is pyolysin (PLO), an intracellular toxin with cytolytic activity against various types of cells, particularly neutrophils and macrophages. The microorganism also exhibits the ability to adhere to host cells, which ensures its persistence and survival on the mucous membrane surface. The main role in the adhesion process of *T. pyogenes* is played by the neuraminidases NanH and NanP. Additionally, with their ability to attach to the components of the extracellular matrix (ECM) of the host cell, surface proteins also serve as an adhesion factor. Fimbriae are an important virulence factor of *T. pyogenes*. The function of the hitherto recognized fimbrial proteins FimB, FimA, and StrA consists in facilitating bacterial penetration through the cell membrane. During infections caused by *T. pyogenes* a characteristic bacterial growth is observed, known as biofilm formation, which results in resistance to antibacterial agents and mechanisms of anti-infective host immune response, including phagocytosis. Virulence factors of *T. pyogenes* also include specific calcium-dependent proteins exhibiting proteolytic activity, which play a significant role in the infectious process and tissue damage, microbial escape from the host's immune defence, and the modulation of the immune system during infectious and inflammatory processes. The identification of the types and mechanisms of action of individual virulence factors of *T. pyogenes* at the molecular level will provide a basis for the development of a rational veterinary medical strategy for the treatment of animals infected with these microorganisms.

Keywords: *Trueperella pyogenes*, taxonomy, phenotypic properties, virulence markers

Intensyfikacja produkcji trzody chlewnej obok wielu aspektów pozytywnych stwarza także zagrożenie pojawiania się różnych niepożądanych czynników wpływających na kondycję i stan zdrowia zwierząt (2, 12, 39). Konsekwencją ich oddziaływania może być obniżenie odporności wrodzonej i nabytej oraz związane z tym pojawianie się chorób wcześniej nie notowanych. Przykładem tego typu zaburzeń jest coraz częstsze ostatnio pojawianie się w fermach trzody chlewnej, a także w hodowlach innych gatunków zwierząt zakażeń wywoływanych przez bakterie z gatunku *Trueperella pyogenes* (10, 15, 16, 20, 34). W krajowym piśmiennictwie niewiele jest danych dotyczących charakterystyki tych drobnoustrojów w aspekcie ich potencjału chorobotwórczego. W ostatnich latach

w kraju przeprowadzano jedynie badania monitorin-gowe oparte na ocenie konfiskat poubojowych u świń i bydła wynikających z obecności zmian ropnych w tuszach, wskazujących na zakażenie *T. pyogenes* (2, 9, 12). Wyniki tych badań wskazują na rozprzestrzenianie się zakażeń tymi bakteriami w hodowlach krajowych, co każe przypuszczać, że w niedługim czasie będą one stanowiły istotny problem kliniczny i ekonomiczny.

W pracy przedstawiono charakterystykę fenotypową *Trueperella pyogenes* ze zwróceniem szczególnej uwagi na czynniki chorobotwórczości.

Taksonomia *Trueperella pyogenes*

Trueperella pyogenes należy do Gram-dodatnich, względnie beztlenowych, pleomorficznych, nie wy-

tworzących przetrwalników drobnoustrojów, które w oparciu o wyniki porównawczych badań materiału genetycznego, analizy chemiotaksonomicznej i filogenetycznej zaliczone zostały do wspólnego rodzaju *Trueperella*, obejmującego także gatunki *T. bernardiae*, *T. bonasi*, *T. bialowiezense* i *T. abortisuis* (21, 22, 24, 28, 46). Poszczególne gatunki tworzące ten rodzaj zostały w 2011 r. wyodrębnione, jako nowa jednostka taksonomiczna, z pierwotnego rodzaju *Arcanobacterium*, obejmującego wyjściowo 9 gatunków, w którym po reklasyfikacji pozostawiono przynależne rodzajowi gatunki *A. haemolyticum*, *A. hippocoleae*, *A. phocae* i *A. pluranimalium* (28). Pierwotną podstawę reklasyfikacji drobnoustrojów należących aktualnie do odrębnych rodzajów *Trueperella* i *Arcanobacterium* stanowiły wyniki badania obecności i rodzajów izoprenowych chinonów w ścianie komórki bakteryjnej (13, 19).

W 1982 r. Collins i Jones wykazali, że głównym izoprenowym chinonem występującym u *Actinomyces pyogenes* jest menachinon MK-10(H₄) (12). Wyniki tych badań potwierdził w 2006 r. Lehnen, który stwierdził obecność tego chinonu także u innych drobnoustrojów należących do rodzaju *Arcanobacterium*, m.in. u *A. bialowiezense* i *A. bonasi* (35). Wzorzec chinonowy okazał się natomiast odmienny w przypadku *A. haemolyticum*, u którego wykazano obecność menachinonu MK-9(H₄) (13, 53). Dane te dowiodły, że włączone pierwotnie do rodzaju *Arcanobacterium* gatunki drobnoustrojów nie stanowią jednolitej grupy pod względem biochemicznym, co wskazywało na konieczność dokonania w tej grupie dalszych podziałów. W późniejszych latach badania biochemiczne uzupełniono o charakterystykę genotypową zarazka, obejmującą analizę sekwencji genu kodującego podjednostkę 16S rRNA, struktury peptydoglikanów, zawartości zasad G+C w nici DNA, profilu kwasów tłuszczowych, składu cukrowego ściany komórkowej, typu grup acylowych muramyłu oraz profilu polarnych lipidów i składu menachinonów (38, 43).

W oparciu o analizę sekwencji 16S rRNA gatunki drobnoustrojów w obrębie rodzaju *Arcanobacterium* zostały zaszerogowane do dwóch podzbiorów – I i II, obejmujących, odpowiednio: *A. haemolyticum*, *A. hippocoleae*, *A. phocae* i *A. pluranimalium* oraz *A. abortisuis*, *A. bialowiezense*, *A. bonasi*, *A. pyogenes* i *A. bernardiae* (22). Wykazano ponadto, że podobieństwo sekwencji genetycznej podjednostki 16S rRNA pomiędzy gatunkami przypisanymi do obydwu podzbiorów jest wysokie i wynosi 95,4-97,4% w przypadku podzbioru I i 95,3-98,6% w podzbiorze II (6-8). Molekularne różnicowanie bakterii należących do odrębnych podzbiorów możliwe jest na podstawie analizy specyficznych nukleotydów w obrębie genu kodującego podjednostkę 16S rRNA. Przykładowo, w pozycji 625 genu drobnoustrojów z podzbioru I znajduje się cytozyna (C), natomiast jej odpowiednikiem w podzbiorze II jest uracyl (U) (15, 16, 43, 50).

Badania profilu kwasów tłuszczowych wykazały, że podstawowy składnik ściany komórkowej *A. abortisuis*, *A. bernardiae*, *A. bialowiezense*, *A. bonasi* i *A. pyogenes* stanowią proste łańcuchy jednonienasyconych kwasów tłuszczowych, wśród których dominuje C_{18:1}ω9c (13, 54). W zróżnicowanej ilości u poszczególnych szczepów występują także C_{18:1}ω7c i C_{18:1}ω7t. Ponadto, u badanych drobnoustrojów potwierdzono obecność niewielkich ilości kwasów tłuszczowych z grupami metylowymi w bocznych rozgałęzieniach oraz dwunienasyconych kwasów tłuszczowych C_{18:2}ω6,9c. Skład ściany komórkowej bakterii z podzbioru I, do którego zaliczono cztery gatunki rodzaju *Arcanobacterium*, tworzą natomiast głównie jednonienasycone kwasy tłuszczowe C_{18:1}ω9c, C_{18:1}ω7c i C_{16:1}ω7c, a także w niewielkich proporcjach C_{16:1}ω9c i C_{20:1}ω9c, których obecność jest zróżnicowana w zależności od szczepu (54).

Profil polarnych lipidów ściany komórkowej bakterii z rodzaju *Arcanobacterium* nie został jeszcze w pełni poznany i dotychczas bliżej scharakteryzowano jedynie nieliczne lipidy spośród występujących w komórkach bakteryjnych (17). Większość gatunków w obrębie rodzaju *Arcanobacterium*, w tym: *A. haemolyticum*, *A. phocae*, *A. pluranimalium*, *A. hippocoleae*, *A. abortisuis*, *A. pyogenes*, *A. bernardiae*, *A. bialowiezense* i *A. bonasi* zawiera difosfatydyloglicerol (DPG), fosfatydyloglicerol (PG), fosfatydyloinozytol (PI), nieznanne aminolipidy (AL2) oraz grupę tzw. nieznaną fosfolipidów (53). W oparciu o występowanie fosfoglikolipidów (PGL) możliwe było wyodrębnienie w obrębie badanego rodzaju grupy bakterii zawierających PGL, obejmującej gatunki: *A. abortisuis*, *A. bernardiae*, *A. bialowiezense*, *A. bonasi* i *A. pyogenes* oraz grupy obejmującej pozostałe gatunki, nie zawierające PGL. Obecność glikolipidów stwierdzono jedynie u gatunku *A. hippocoleae*. U żadnego z badanych gatunków nie stwierdzono natomiast obecności fosfolipidów zawierających grupę azotową, takich jak fosfatydyloetanolamina lub fosfatydylocholina (40, 53, 54).

Różnice pomiędzy bakteriami należącymi do wyróżnionych podzbiorów stwierdzono także w badaniach dotyczących analizy peptydoglikanów ściany komórkowej (20, 29). Badania te wykazały, że drobnoustroje podzbioru I zawierają peptydoglikany typu A5α ze zmieniającymi się mostkami peptydowymi L-Lys-L-Lys-D-Glu łączącymi kwas N-acetylmuraminowy z tetrapeptydem, w których niewielkie ilości lizyny mogą być częściowo zastępowane ornityną. Drobnoustroje z podzbioru II zawierają ten sam typ peptydoglikanu (A5α), jednakże z dwoma zmieniającymi się różnymi podstawnikami, tj. L-Lys-L-Lys-D-Glu oraz L-Lys-L-Ala-L-Lys-D-Glu.

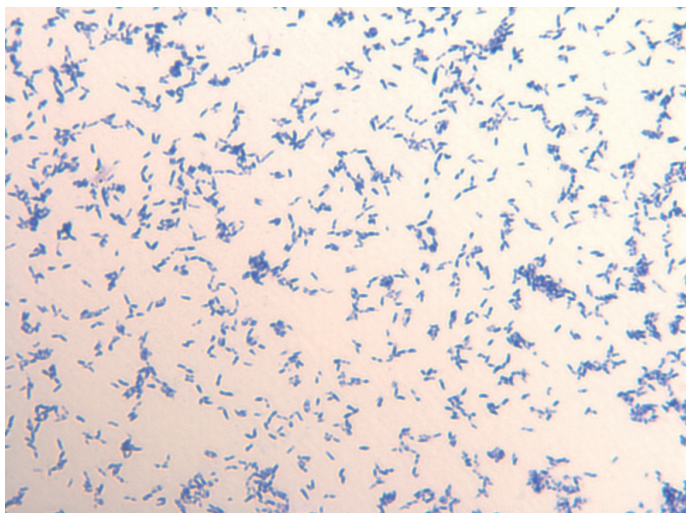
Wykazano ponadto, że bakterie należące do podzbioru I cechowały się dodatnią reakcją w teście CAMP, natomiast należące do podzbioru II nie powodowały powstawania charakterystycznej dopełniającej strefy hemolizy w postaci tzw. „efektu łopaty – shovel ef-

fect”, co przyjmowane jest jako ujemny wynik reakcji (51).

Na podstawie zaprezentowanych wyników badań oraz różnic wszystkich badanych cech stwierdzanych pomiędzy bakteriami zgrupowanymi w podzbiorze I i II, Yassin i wsp. (54) w 2011 r. ostatecznie wyodrębnili rodzaj *Trueperella* z rodzaju *Arcanobacterium*.

Właściwości biochemiczne *Trueperella pyogenes*

Gatunek *Trueperella pyogenes* różni się od innych gatunków należących do rodzaju *Trueperella* zdolnością do hydrolizy żelatyny. Niektóre szczepy *T. pyogenes* w zależności od warunków środowiskowych mogą być katalazo-dodatnie oraz fermentować glukozę i maltozę, nie wytwarzając ureazy (52). Drobnoustrój ten rośnie obficie w warunkach mikroaerofilnych (5-10% CO₂) na podłożach wzbogaconych dodatkiem 5% krwi baraniej lub końskiej, wytwarzając drobne, okrągłe, lekko wypukłe, nieprzezroczyste kolonie o średnicy 0,1-0,2 mm, otoczone wąską strefą hemolizy typu β. Po 48-72 godzinach inkubacji kolonie stają się większe, osiągają średnicę 0,5 do 1,5 mm, są bardziej wypukłe, półprzezroczyste, o ostrym, wyraźnym brzegu (19). W obrazie mikroskopowym w preparatach wykonanych z 18-godzinnej hodowli na pożywce stałej, barwionych metodą Grama widoczne są G⁺, krótkie, nieregularne, nieco zakrzywione pałeczki o wymiarach 0,2-0,9 × 0,3-2,5 μm, kształtem przypominające literę V lub T oraz tworzące grona lub układające się w formie palisady (ryc. 1). W hodowlach poddawanych dłuższej inkubacji kolonie *T. pyogenes* stają się ziarniste, a komórki bakterii wykazują tendencję do zróżnicowania fenotypowego, wybarwiają się zmiennie, G⁺ lub G⁻ oraz często ulegają segmentacji, przyjmując kształt małych, nieregularnych ziarniaków (19, 22, 24). Typową cechą bakterii należących do rodzaju *Trueperella* jest występowanie w ścianie komórkowej peptydoglikanu typu A5α oraz grupy acetylowej na końcu aminoterminalnym (N) kwasu



Ryc. 1. Preparat mikroskopowy z 24-godz. hodowli *T. pyogenes* na pożywce Columbia Agar. Barwienie metodą Grama, pow. × 1250

muraminowego (21, 22, 40). W strukturze chemicznej ściany komórkowej tych drobnoustrojów brak jest natomiast kwasów mykolinowych. Głównymi cukrami ściany komórkowej są ramnoza i glukoza. Zawartość zasad azotowych G+C w łańcuchu DNA oscyluje w granicach 56-66 mol% (38, 40, 43). Drobnoustroje z rodzaju *Trueperella* wykazują typ fermentacyjny w przemianie węglowodanów, a głównymi produktami fermentacji są kwasy: mlekowy, octowy i bursztynowy. Wytwarzanie kwasu bursztynowego uzależnione jest od gatunku bakterii i nie zawsze wykrywane w badaniach biochemicznych (37, 47). Aktualnie obowiązującą taksonomię oraz wybrane właściwości biochemiczne *T. pyogenes* zestawiono w tabeli 1.

Charakterystyka piolizyny

Dzięki wytwarzaniu różnorodnych czynników zjadliwości *T. pyogenes* jest w stanie kolonizować wiele tkanek, wywołując zmiany chorobowe w obrębie różnych narządów i układów (42, 46). Głównym czynnikiem zjadliwości, wytwarzanym przez wszystkie szczepy *T. pyogenes*, jest wewnątrzkomórkowa toksyna – piolizyna (PLO), będąca białkiem o masie 55 kDa o charakterze cytolizyny zależnej od cholesterolu (CDC, Cholesterol-Dependent Cytolysin). Piolizyna wykazuje działanie cytolityczne w stosunku do różnych typów komórek, zwłaszcza neutrofilów i makrofagów (6, 18, 39, 45). Po dożylnym lub dootrzewnym podaniu białym myszkom ujawnia dodatkowo właściwości dermonekrotyczne i letalne. Toksyna wykazuje także właściwości hemolityczne i zdolna jest do wywoływania lizy krwinek czerwonych u różnych gatunków zwierząt. W warunkach *in vitro* właściwość tę potwierdza występowanie charakterystycznej strefy hemolizy β wokół kolonii bakteryjnych na pożywce agarowej z dodatkiem krwi końskiej lub owczej.

Mechanizm działania cytolizyn zależnych od cholesterolu drobnoustrojów G⁺, do których zalicza się także listeriolizynę O, perfringolizynę O, pneumolizynę O i streptolizynę O, polega na wiązaniu się z cholesterolem i tworzeniu dużych, oligomerycznych porów w błonie komórkowej komórek gospodarza (14, 29, 45). W warunkach *in vivo* piolizyna wywołuje ponadto aktywację układu dopełniacza, stymuluje produkcję cytokin, hamuje eksplozję tlenową oraz bakterio-bójczą aktywność granulocytów obojętnochłonnych i monocytów, a także wykazuje bezpośrednie działanie cytotoksyczne w stosunku do leukocytów i makrofagów. Poprzez oddziaływanie na ekspresję cytokin oraz produkcję prostaglandyny E₂ (PGE₂) piolizyna moduluje drogę sygnałową w komórkach gospodarza. PLO pobudza także ekspresję genu odpowiedzialnego za syntezę TNFα w makrofagach, co bezpośrednio wiąże się z rozwojem procesu zapalnego (44). Wykazano, że toksyna ta ma właściwości immunogenne, a podanie zwierzętom rekombinowanej, inaktywowanej formaliną i znakowanej histydyną PLO stymuluje odporność na zakażenie (30, 33).

Tab. 1. Taksonomia i właściwości biochemiczne *Trueperella pyogenes*

Taksonomia	Królestwo	Bakterie
	Typ	<i>Actinobacteria</i>
	Klasa	<i>Actinobacteria</i>
	Rząd	<i>Actinomycetales</i>
	Rodzina	<i>Actinomycetaceae</i>
	Rodzaj	<i>Trueperella</i>
	Gatunek	<i>Trueperella pyogenes</i>
Wybrane właściwości biochemiczne		
Peptydoglikany ściany komórkowej	typ A5 α L-Lys-L-Ala-L-Lys-D-Glu	
Skład chinonów	MK-10(H ₄), MK-9(H ₄)	
Profil lipidowy	DPG, PG, PI, PGL	
Zawartość zasad G+C w DNA	56-58 mol%	
Profil kwasów tłuszczowych	jednonienasycone kwasy tłuszczowe	C _{18:1} ω9c (C _{18:1} ω7c i C _{18:1} ω7t)
	dwunienasycone kwasy tłuszczowe	C _{18:2} ω6,9c
	nasycone kwasy tłuszczowe	C _{16:0} (24,5%), C _{14:0} (17,2%), C _{18:0} (10,1%), pozostałe nkt (1,6%)
CAMP test	ujemny	
Aktywność metaboliczna	celobioza	-
	D-glukoza	+
	glicerol	-
	glikogen	+
	laktoza	+
	maltoza	+
	D-mannitol	-
	mannoza	+
	D-ryboza	+
	trechaloza	+
	D-ksyloza	+
	sacharoza	+/-
Aktywność hydrolityczna	żelatyny	+
	benzoioglicyny	+
Aktywność enzymatyczna	eskulina	-
	katalaza	-
	ureaza	-
	fosfataza kwaśna	-
	fosfataza zasadowa	-
	α-galaktozydaza	-
	β-galaktozydaza	+
	α-glukozydaza	+
	β-glukoronidaza	+
	N-acetylo-β-glukozamidaza	-
	arylamidaza leucyny	+
	lipaza-esteraza(C8)	-
	pirazynamidaza	-
arylamidaza pirolidonylowa (różnicowanie z paciorkowcami β-hemolizującymi)	-	
Wytwarzanie acetoiny	-	

Objaśnienia: „+” – reakcja dodatnia, „-” – reakcja ujemna, „+/-” – reakcja dodatnia u nielicznych szczepów

Gen *plo*, kodujący toksynę PLO *T. pyogenes* i otwarta ramka odczytu *orf121* o nieznannej dotychczas funkcji zlokalizowane są na tzw. wyspie patogenności o wielkości 2,7 kbp i cechują się zredukowaną liczbą guaniny i cytozyny (44, 45). Wspomniana wyspa patogenności, której sekwencja nukleotydowa jest wysoce konserwatywna, rozdziela geny metabolizmu podstawowego *T. pyogenes*, *smc* i *ftsY*, które u innych prokariotów zlokalizowane są obok siebie (18, 45). W warunkach eksperymentalnych wykazano, że poprzez homologiczne rekombinacje z udziałem genu *sly* kodującego suilizynę wyspę można inkorporować do obszaru międzygenowego, pomiędzy geny *smc* i *ftsY*, (14, 29, 54). Na podstawie tych badań wysunięto hipotezę nabytego horyzontalnego transferu genów *plo* i *orf121*. Obecność wyspy zjadliwości, zawierającej gen *plo*, usytuowanej pomiędzy genami metabolizmu podstawowego sprzyja wzajemnemu oddziaływaniu tych genów. Wykazano, że ekspresja genów *smc* i *ftsY* w obecności wyspy patogenności przyczynia się do pobudzenia wzrostu bakterii (14). W przypadku delekcji wyspy ekspresja jedynie genów metabolizmu podstawowego prowadzi do powstawania mutantów o osłabionym tempie wzrostu, nie wytwarzających piolizyny. Regulacja syntezy i funkcji PLO, mająca miejsce *in vivo*, jest niezbędna do zainicjowania i rozwoju zakażenia (18, 27, 41). Podczas wstępnej fazy wzrostu bakterii dochodzi do stymulacji produkcji PLO oraz zwiększenia uszkodzenia tkanek przez toksynę. Wykazano istnienie dodatniej korelacji między wzrostem stężenia mRNA *plo* i zwiększeniem koncentracji PLO w komórce, co świadczy o regulacji produkcji toksyny na poziomie transkrypcji (18). Badania sekwencji nukleotydowej genów strukturalnych *plo* wskazują na przypuszczalne istnienie dwóch sekwencji promotorowych, P1 i P2 oraz trzech powtarzających się bezpośrednio po sobie sekwencji DR1, DR2 i DR3 (44, 45). Badania z wykorzystaniem metody ukierunkowanej mutagenyzy wykazały, że promotor P2 o wielkości 63bp zlokalizowany powyżej kodonu startowego PLO jest dominującym promotorem wstępnej fazy produkcji piolizyny (29, 45, 54). Dwie powtarzające się sekwencje, DR1 i DR2 o wielkości 25bp każda są podobne pod względem struktury pierwszorzędowej, natomiast sekwencja DR3 różni się od dwóch pozostałych długością, wynoszącą 100 bp oraz ich wzajemnym uszeregowaniem.

Podstawowa struktura aminokwasowa piolizyny *T. pyogenes* jest w 31-41% analogiczna do składu aminokwasowego innych cytolizyn CDC (1, 29). Stwierdzane różnice pomiędzy tymi białkami dotyczą m.in. braku wrażliwości toksyny *T. pyogenes* na czynniki redukujące, np. wodór. Charakterystyczną cechą morfologiczną tej cytolizyny jest jej przestrzenna struktura utworzona przez cztery domeny, spośród których największe znaczenie funkcjonalne mają domeny trzecia i czwarta. Część karboksyterminalna (C-końcowa) domeny czwartej przylega do

wewnętrznej podstawowej sekwencji aminokwasowej i zawiera charakterystyczną sekwencję undekapeptydową, która jest niezmienna w całej rodzinie cytolizyn. Funkcjonalnie domena czwarta odpowiedzialna jest za wchodzenie w reakcję z cholesterolem oraz warunkuje rozpoznawanie błony komórkowej komórek docelowych. Domena trzecia zaangażowana jest natomiast w oligomeryzację i adhezję do błony komórkowej gospodarza (1, 6, 7, 18, 29, 44). PLO, podobnie jak intermediolizyna (ILY), występująca u bakterii *Streptococcus spp.* różni się od innych cytolizyn CDC budową undekapeptydu C-końcowego łańcucha domeny czwartej, w której cysteina zastąpiona jest alaniną (12). W grupie cytolizyn zależnych od cholesterolu (CDC) cysteina odpowiedzialna jest za aktywację produkcji piolizyny, stąd jej niewystępowanie w PLO warunkuje zaburzenie procesu wytwarzania tej toksyny. Wspomniane miejsce mutagenyzy czyni także PLO podatną na destrukcyjne oddziaływanie wolnych rodników tlenowych (4). W obrębie sekwencji undekapeptydowej piolizyny ważną funkcję pełnią również trzy miejsca położenia tryptofanu, odpowiedzialne za aktywność hemolityczną i wiązanie cholesterolu przez toksynę. Wykazano, że zmiany w obrębie tych sekwencji prowadzą do zaburzeń aktywności PLO w komórce (36, 54). Aktywność PLO regulowana jest także za pośrednictwem białek sekwencji N-końcowej domeny czwartej, zbudowanych z łańcuchów aminokwasowych różnej długości. Wykazano, że przeciwciała monoklonalne, poprzez łączenie się z tymi regionami, są w stanie blokować aktywność hemolityczną piolizyny (26, 27). Właściwości hemolityczne PLO nie są natomiast blokowane w wyniku interakcji przeciwciał z sekwencją undekapeptydową. Tym niemniej dowiedziono, że mutacje aminokwasowe zachodzące w obrębie tego fragmentu domeny czwartej wpływają istotnie na aktywność cytolityczną toksyny (26). Przykładowo, zamiana tryptofanu w pozycji 499 na fenyloalaninę lub delekcja proliny zmniejszają aktywność hemolityczną i zdolność wiązania cholesterolu przez PLO.

Czynniki adhezyjne

Trueperella pyogenes, będąca komensalem błony śluzowej układu oddechowego, moczowo-płciowego oraz przewodu pokarmowego świń i innych gatunków zwierząt gospodarskich wykazuje zdolność adhezji do komórek gospodarza (46). Proces ten jest efektem interakcji licznych bakteryjnych białek powierzchniowych z receptorami komórkowymi i stanowi pierwszy etap rozwoju zakażenia. Z fizjologicznego punktu widzenia jest on także ważny dla zarazka, ponieważ stwarza mu możliwość utrzymywania się i przeżywania na powierzchni błony śluzowej. Główną rolę w procesie adhezji *T. pyogenes* do komórek epitelialnych gospodarza odgrywiają neuraminidazy, NanH i NanP, prowadzące do ekspozycji na powierzchni komórki ukrytych receptorów dla adhezyn. Funkcją neuraminidaz jest także zwiększanie lepkości śluzu, sprzyjające kolonizacji

tkanek oraz osłabianie odpowiedzi immunologicznej gospodarza poprzez odsłonięcie cząstek IgA, dzięki czemu stają się one bardziej podatne na działanie proteaz bakteryjnych (17, 31, 32). Neuraminidaza H jest białkiem o masie 107 kDa i kodowana jest przez gen *nanH*. Białko to zawiera konserwatywny katalityczny motyw RIP/RLP oraz pięć kopii motywu Asp box (7, 8, 12, 17). *NanH* umiejscowiona jest w ścianie komórkowej *T. pyogenes* podobnie jak część C-końcowa motywu kotwiczącego bakterii G+. Drugi z genów, *nanP* koduje neuraminidazę P będącą białkiem o masie 186,8 kDa, które, podobnie jak *NanH*, zawiera motywy RIP/RLP i Asp box oraz motyw kotwiczący w ścianie komórki bakteryjnej (54). Funkcja neuraminidaz sprowadza się do cięcia wiązań hydroksylowych w obrębie reszt końcowych kwasu sialowego w węglowodanach i glikoproteinach (27). Specyficzność tych enzymów może zależeć od typu podstawników, O lub N albo natury połączeń α -glikozylowych przyłączających kwas sialowy do cząsteczki kotwiczącej (26, 54).

Obok neuraminidaz rolę czynnika adhezyjnego *T. pyogenes* pełni także specyficzne białko powierzchniowe, mające zdolność przyłączania się do składników macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM, Extracellular Matrix) komórek gospodarza (42, 53). W przypadku bakterii G+ białka tego typu grupowane są w rodzinie MSCRAMM (Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules), obejmującej zakotwiczone białka powierzchniowe (powierzchniowe adhezyny), cechujące się m.in. zdolnością wiązania fibrynogenu, fibronektyny, lamininy, kolagenu oraz witronektyny (42).

Białka MSCRAMM mają kilka wspólnych cech strukturalnych, m.in. N-końcową sekwencję sygnałową odpowiedzialną za sekrecję tych białek, hydrofobową domenę śródbłonową, jedną lub więcej powtarzających się sekwencji polipeptydowych oraz region C-końcowy kotwiczący białko w ścianie komórkowej (1, 12, 23, 54). ECM pośredniczy pomiędzy bakteryjnym MSCRAMM i integrynami komórek gospodarza w adhezji bakterii do komórek. Białka te odpowiedzialne są także za zjadliwość bakterii, przykładem MSCRAMM wiążące fibronektynę ułatwia wnikanie drobnoustrojów do komórek gospodarza (23, 36). W przypadku *T. pyogenes* do rodziny MSCRAMM zalicza się białko wiążące kolagen (CbpA) o masie 120 kDa, mające zdolność wiązania kolagenu typu I, II i IV (12, 28, 50). CbpA jest pod względem budowy podobne do białka wiążącego kolagen (Cna), występującego u *S. aureus*, które także zawiera domenę odpowiadającą białkom grupy MSCRAMM (12, 54). Zdolność wiązania kolagenu przypisywana jest subdomenie niepowtarzalnej domeny A białek *Acm*, *Ace* i *Cna*. Wszystkie trzy białka mają w obrębie subdomeny pięć wspólnych konserwatywnych aminokwasów, niezbędnych do wiązania kolagenu. CbpA różni się od wspomnianych białek dwoma aminokwasami (29, 40). W pozycji 179 występuje glicyna zamiast tyrozyny,

natomiast w pozycji 198 arginina zamiast asparaginy. Warto podkreślić że każda zmiana aminokwasowa w obrębie subdomeny powoduje zmniejszenie powinowactwa białka do kolagenu. Istnienie większych różnic wykazano natomiast w przypadku domeny B (1, 40). Długość domeny B w białku CbpA jest zróżnicowana i waha się od 90 do 96 aminokwasów, natomiast stopień podobieństwa sekwencji aminokwasowej wynosi od 30,2% do 95,7%. Funkcja i znaczenie domeny B nie zostały dokładnie określone. Świadczy o tym fakt, że rekombinowane białka *Cna* są w stanie związać kolagen z domeną A bez obecności domeny B (33). Należy zaznaczyć, że geny kodujące białko CbpA wykrywane są jedynie u 48% szczepów *T. pyogenes*, podczas gdy np. *nanP* występuje u 64,2% szczepów tych bakterii (5, 26, 55).

Charakterystyka fimbrii

Ważnym czynnikiem wirulencji *T. pyogenes* są fimbrie (51, 55). Obecność tego typu organelli charakterystyczna jest przeważnie dla bakterii G-, ale nieliczne drobnoustroje G+, w tym *Actinomyces spp.*, *Streptococcus spp.* bytujące na błonie śluzowej jamy gębowej, niektóre gatunki należące do rodzaju *Corynebacterium* oraz *T. pyogenes* również wykazują zdolność ich wytwarzania (56). Geny kodujące białka fimbrialne, podobnie jak gen *plo*, zlokalizowane są w tzw. wyspach patogenności, będących ruchomymi elementami operonu bakteryjnego. Funkcja dotychczas poznanych białek fimbrialnych, *FimB*, *FimA* oraz *StrA*, sprowadza się głównie do ułatwiania drobnoustrojom przenikania przez błonę komórkową (36, 43, 53). Białko *FimA* zawiera sekwencję sygnałową, domenę umożliwiającą przenikanie bakterii przez błonę komórkową oraz sekwencje piliny i E box, niezbędne do powstawania fimbrii (56). Białko *FimB* nie zawiera sekwencji piliny, natomiast ma domenę wiążącą się z fibronektyną. Gen *StrA* koduje białka enzymatyczne, sortazę i transpeptydazę, pośredniczące w sekrecji białek wirulencji oraz odpowiadające za zakotwiczenie bakterii w ścianie komórki gospodarza. Wykazano, że łączne lub pojedyncze występowanie genów *FimA* i *FimB* w komórce bakteryjnej dotyczy około 94% szczepów *T. pyogenes*, podczas gdy obecność genu *StrA* jest charakterystyczna dla wszystkich badanych szczepów (27, 43, 54). Fimbrie *T. pyogenes*, dzięki zdolności wiązania się z fibronektyną, zaangażowane są także w procesie adhezji do komórek gospodarza, w czym pośredniczy białko *FimB* (48, 49, 56).

Biofilm

W trakcie zakażenia wywołwanego przez *T. pyogenes* stwierdza się charakterystyczny typ wzrostu drobnoustrojów, polegający na tworzeniu specyficznych wielowarstwowych zespołów zwanych biofilmem (25, 56). W tego rodzaju strukturze bakterie wykazują odmienne cechy morfologiczne i funkcjonalne w porównaniu ze wzrostem planktonicznym. W biofilmie

drobnoustroje tworzą zorganizowaną społeczność bakterii, w której poszczególne komórki przywierają wzajemnie do siebie za pomocą fimbrii lub poprzez bezpośredni kontakt. Otoczone są wówczas wydzielaną przez nie substancją polisacharydową i wykazują zredukowaną aktywność metaboliczną, co skutkuje m.in. opornością na czynniki antybakteryjne oraz mechanizmy przeciwważnej odpowiedzi immunologicznej gospodarza, w tym na fagocytozę. Zdolność tworzenia biofilmu przez *T. pyogenes* została potwierdzona w przypadku przewlekłych zapaleń u człowieka, takich jak: zapalenie ozębnej, włóknikowe zapalenie nerek, zapalenie mięśnia sercowego, przewlekłe zapalenie ucha wewnętrznego, zapalenie kości (25) oraz nie poddające się leczeniu antybiotykami zapalenie gruczołu mlekowego u bydła (23).

Inne czynniki zjadliwości

Do czynników wirulencji *T. pyogenes* należą także specyficzne białka zależne od wapnia, wykazujące aktywność proteolityczną (37). Badania tych białek metodą SDS-PAGE wykazały, że należą one do grupy proteaz serynowych (1, 56). Białka zależne od wapnia odgrywają istotną rolę w procesie zakażenia i uszkodzenia tkanek, ucieknie zarazka spod kontroli immunologicznej gospodarza oraz modulacji układu immunologicznego podczas infekcji i rozwoju zapalenia. Wykazano, że w przebiegu zakażenia *T. pyogenes* poziom tych proteaz wydatnie wzrasta (1). Badania prowadzone w ogniskach endemicznego występowania choroby wykazały ponadto, że u ponad 35% zakażonych świń stwierdza się obecność przeciwciał przeciwko tym proteazom, a w 93% przypadków chorobowych można je wyizolować ze zmian chorobowych, np. z ropni, co potwierdza, że są one konieczne do rozwoju choroby (9-12). Ważnym czynnikiem wirulencji *T. pyogenes*, obok proteaz serynowych, jest także DNA-za uczestnicząca w depolimeryzacji lepkich końców DNA, uwolnionych ze zniszczonych komórek gospodarza w trakcie procesu zapalnego (19).

Podsumowanie

Poznanie rodzajów oraz mechanizmów działania na poziomie molekularnym poszczególnych czynników wirulencji *T. pyogenes* wzbogaci wiedzę nt. patogenyzy zakażeń tymi drobnoustrojami oraz stworzy podstawę opracowania racjonalnej strategii zapobiegania tym infekcjom. Charakterystyka czynników wirulencji *T. pyogenes* może zostać wykorzystana do opracowania biopreparatu do swoistej profilaktyki zakażeń u trzody chlewnej i innych gatunków zwierząt.

Piśmiennictwo

- Alouf J. E., Billington S. J., Jost B. H.: Repertoire and general features of the family of cholesterol-dependent cytolysins. [w:] Alouf J. E., Popoff M. R.: Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins. Academic Press, London 2006, 643-658.
- Al-Tarazi Y., Hijazin M., Alber J., Lammler Ch., Ahmed Hassan A., Timke M., Kostrzewa M., Prenger-Berninghoff E., Zschock M.: Phenotypic and genotypic characteristics of Trueperella (Arcanobacterium) pyogenes isolated from

- lung abscesses of one humped camels (Camelus dromedarius) in Jordan. J. Camelid Sci. 2012, 5, 99-104.
- Azuma R., Murakami S., Ogawa A., Okada Y., Miyazaki S., Makino T.: Arcanobacterium abortusis sp. nov., isolated from a placenta of a sow following an abortion. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2009, 59, 1469-1473.
- Bass L., Liebert C. A., Lee M. D., Summers A. O., White D. G., Thayer S. G., Maurer J. J.: Incidence and characterization of integrons, genetic elements mediating multiple-drug resistance, in avian Escherichia coli. Antimicrob. Agents Chemother. 1999, 43, 2925-2929.
- Billington S. J., Jost B. H.: Multiple genetic elements carry the tetracycline resistance gene tet(W) in the animal pathogen Arcanobacterium pyogenes. Antimicrob. Agents Chemother. 2006, 50, 3580-3587.
- Billington S. J., Jost B. H., Cuevas W. A., Bright K. R., Songer J. G.: The Arcanobacterium (Actinomyces) pyogenes hemolysin, pyolysin, is a novel member of the thiol-activated cytolysin family. J. Bacteriol. 1997, 179, 6100-6106.
- Billington S. J., Songer J. G., Jost B. H.: The variant undecapeptide sequence of the Arcanobacterium pyogenes haemolysin, pyolysin, is required for full cytolytic activity. Microbiol. 2002b, 148, 3947-3954.
- Bizzini A., Jaton K., Romo D., Bille J., Prod'homme G., Greub G.: Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry as an alternative to 16S rRNA gene sequencing for identification of difficult-to-identify bacterial strains. J. Clin. Microbiol. 2011, 49, 693-696.
- Cheng-Chung L., Ter-Hsin C., Ching-Liu S., Nan-Yu S., Chan J. P.-W.: Disseminated abscessation complicated with bone marrow abscess caused by Arcanobacterium pyogenes in a goat. J. Vet. Med. Sci. 2010, 72, 1089-1092.
- Christensen R. V., Aalbaek B., Jensen H. E.: Pathology of udder lesions in sows. J. Vet. Med. A Physiol. Pathol. Clin. Med. 2007, 54, 491-493.
- Clapperton M., Diack A. B., Matika O., Glass E. J., Gladney Ch. D., Mellencamp M. A., Hoste A., Bishop S. C.: Traits associated with innate and adaptive immunity in pigs: heritability and associations with performance under different health status conditions. Gen. Select. Evol. 2009, 41, 54.
- Collins M. D., Jones D., Kroppenstedt R. M., Schleifer K. H.: Chemical studies as a guide to the classification of Corynebacterium pyogenes and Corynebacterium haemolyticum. J. Gen. Microbiol. 1982, 128, 335-341.
- Collins M. D., Pirouz T., Goodfellow M., Minnikin D. E.: Distribution of menaquinones in actinomycetes and corynebacteria. J. Gen. Microbiol. 1977, 100, 221-230.
- Ding H., Lämmler C.: Purification and further characterization of a haemolysin of Actinomyces pyogenes. J. Vet. Med. B 1996, 43, 179-188.
- Edwards S. A.: Perinatal mortality in the pig: environmental or physiological solutions? Liv. Prod. Sci. 2002, 78, 3-12.
- Ertas H. B., Kilic A., Özbek G., Muz A.: Isolation of Arcanobacterium (Actinomyces) pyogenes from abscessed cattle kidney and identification by PCR. Turk. J. Vet. Anim. Sci. 2005, 29, 455-459.
- Esmay P. A., Billington S. J., Link M. A., Songer J. G., Jost B. H.: The Arcanobacterium pyogenes collagen-binding protein, CbpA, promotes adhesion to host cells. Infect. Immun. 2003, 71, 4368-4374.
- Funk P. G., Staats J. J., Howe M., Nagaraja T. G., Chengappa M. M.: Identification and partial characterization of Actinomyces pyogenes hemolysin. Vet. Microbiol. 1996, 50, 129-142.
- Hassan A. A., Ülbeği-Mohyla H., Kanbar T., Alber J., Lammler C., Abdulmawjood A., Speck S., Zschock M., Weiss R.: Molecular identification of Arcanobacterium bialowiezense and Arcanobacterium bonasi based on 16S-23S rRNA intergenic spacer region sequences. Vet. Microbiol. 2008, 130, 410-414.
- Hassan A. A., Ülbeği-Mohyla H., Kanbar T., Alber J., Lammler C., Abdulmawjood A., Zschock M., Weiss R.: Phenotypic and genotypic characterization of Arcanobacterium haemolyticum isolates from infections of horses. J. Clin. Microbiol. 2009, 47, 124-128.
- Hijazin M., Hassan A. A., Alber J., Lämmler C., Timke M., Kostrzewa M., Prenger-Berninghoff E., Zschock M.: Evaluation of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) for species identification of bacteria of genera Arcanobacterium and Trueperella. Vet. Microbiol. 2012a, 157, 243-245.
- Hijazin M., Metzner M., Erhard M., Nagib S., Alber J., Lämmler C., Hassan A. A., Prenger-Berninghoff E., Zschock M.: First description of Trueperella (Arcanobacterium) bernardiae of animal origin. Vet. Microbiol. 2012b, 159, 515-518.
- Hijazin M., Ülbeği-Mohyla H., Alber J., Lammler C., Hassan A. A., Abdulmawjood A., Prenger-Berninghoff E., Weiss R., Zschock M.: Molecular identification and further characterization of Arcanobacterium pyogenes isolated from bovine mastitis and from various other origins. J. Dairy Sci. 2011a, 94, 1813-1819.
- Hijazin M., Ülbeği-Mohyla H., Alber J., Lämmler C., Hassan A. A., Timke M., Kostrzewa M., Prenger-Berninghoff E., Weiss R., Zschock M.: Identification

- of Arcanobacterium (Trueperella) abortusis, a novel species of veterinary importance, by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. 2011b, 125, 32-37.
25. Hoyle B., Costerton J.: Bacterial resistance to antibiotics: the role of biofilms. Prog. Drug Res. 1991, 37, 91-105.
 26. Imaizumi K., Serizawa A., Hashimoto N., Kaidoh T., Takeuchi S.: Analysis of the functional remains of Arcanobacterium pyogenes pyolysin using monoclonal antibodies. Vet. Microbiol. 2001, 81, 235-242.
 27. Jost B. H., Billington S. J.: Arcanobacterium pyogenes: molecular pathogenesis of an animal opportunist. Antonie Van Leeuwenhoek 2005, 88, 87-102.
 28. Jost B. H., Billington S. J.: Corynebacterium and Arcanobacterium, [w:] Gyles C. L., Prescott J. F., Songer J. G., Thoen C. O.: Pathogenesis of Bacterial Infection in Animals. Blackwell Publishing, Ames, Iowa 2004, 77-86.
 29. Jost B. H., Lucas E. A., Billington S. J., Rainer A. J., McGee D. J.: Arcanolysin is a cholesterol-dependent cytolysin of the human pathogen Arcanobacterium haemolyticum. BMC Microbiol. 2011, 11, 239.
 30. Jost B. H., Songer J. G., Billington S. J.: An Arcanobacterium (Actinomyces) pyogenes mutant deficient in production of the pore-forming cytolysin pyolysin has reduced virulence. Infect. Immun. 1999, 67, 1723-1728.
 31. Jost B. H., Songer J. G., Billington S. J.: Cloning, expression, and characterization of a neuraminidase gene from Arcanobacterium pyogenes. Infect. Immun. 2001, 69, 4430-4437.
 32. Jost B. H., Songer J. G., Billington S. J.: Identification of a second Arcanobacterium pyogenes neuraminidase and involvement of neuraminidase activity in host cell adhesion. Infect. Immun. 2002b, 70, 1106-1112.
 33. Jost B. H., Trinh H. T., Songer J. G., Billington S. J.: Immunization with genetic toxoids of the Arcanobacterium pyogenes cholesterol-dependent cytolysin, pyolysin, protects mice against infection. Infect. Immun. 2003b, 71, 2966-2969.
 34. Kaneko K., Nakamura M., Sato R.: Influence of Trueperella pyogenes in uterus on corpus luteum lifespan in cycling cows. Theriogen. 2013, 79, 803-808.
 35. Lehnen A., Busse H. J., Frolich K., Krasinska M., Kampfer P., Speck S.: Arcanobacterium bialowiezense sp. nov. and Arcanobacterium bonasai sp. nov., isolated from the prepuce of European bison bulls (Bison bonasus) suffering from balanoposthitis, and emended description of the genus Arcanobacterium Collins et al., 1983. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2006, 56, 861-866.
 36. Liu M. C., Wu C. M., Liu Y. C., Zhao J. C., Yang Y. L., Shen J. Z.: Identification, susceptibility, and detection of integron-gene cassettes of Arcanobacterium pyogenes in bovine endometritis. J. Dairy. Sci. 2009, 92, 3659-3666.
 37. MacKenzie S. L.: Gas chromatographic analysis of amino acids as the N-heptafluorobutyl isobutyl esters. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1987, 70, 151-160.
 38. Mesbah M., Premachandran U., Whitman W. B.: Precise measurement of the G+C content of deoxyribonucleic acid by high-performance liquid chromatography. Inter. J. Sys. Bacteriol. 1989, 39, 159-167.
 39. Meyer D. K., Reboli A. C.: Other Corynebacteria and Rhodococcus, [w:] Mandell G. L., Dolin R., Bennet J. E.: Principles and Practice of Infectious Diseases. Churchill-Livingstone, New York 2005, 2465-2478.
 40. Mimmik D. E., Hutchinson I. G., Caldicott A. B., Goodfellow M.: Thin-layer chromatography of methanolysates of mycolic acid-containing bacteria. J. Chromat. A 1980, 188, 221-233.
 41. Murakami S., Ogawa H., Azuma R., Ohba T., Murata R.: Aborted lesions of a pig associated with Arcanobacterium abortusis and the immunohistochemical features. J. Vet. Med. Sci. 2011, 73, 797-799.
 42. Pietrocola G., Valtulina V., Rindi S., Jost B. H., Speziale P.: Functional and structural properties of CbpA, a collagen-binding protein from Arcanobacterium pyogenes. Microbiol. 2007, 153, 3380-3389.
 43. Ramos C. P., Foster G., Collins M. D.: 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. Int. J. Syst. Bacteriol. 1997, 47, 46-53.
 44. Rudnick S. T., Jost B. H., Billington S. J.: Transcriptional regulation of pyolysin production in the animal pathogen, Arcanobacterium pyogenes. Vet. Microbiol. 2008, 132, 96-104.
 45. Rudnick S. T., Jost B. H., Songer J. G., Billington S. J.: The gene encoding pyolysin, the pore-forming toxin of Arcanobacterium pyogenes, resides within a genomic islet flanked by essential genes. FEMS Microbiol. Lett. 2003, 225, 241-247.
 46. Rzewuska M., Stefańska I., Osińska B., Kizerwetter-Świda M., Chrobak D., Kaba J., Bielecki W.: Phenotypic characteristics and virulence genotypes of Trueperella (Arcanobacterium) pyogenes strains isolated from European bison (Bison bonasus). Vet. Microbiol. 2012, 160, 69-76.
 47. Salmon H., Licence S. T., Binns R. M.: Staining of pig lymphocytes subpopulations with acid α -naphthyl acetate esterase. Vet. Immunol. Immunopath. 1987, 14, 173-179.
 48. Santos T. M., Caixeta L. S., Machado V. S., Rauf A. K., Gilbert R. O., Bicalho R. C.: Antimicrobial resistance and presence of virulence factor genes in Arcanobacterium pyogenes isolated from the uterus of postpartum dairy cows. Vet. Microbiol. 2010, 145, 84-89.
 49. Stocker C. J., Sugars K. L., Harari O. A., Landis R. C., Morley B. J., Haskard D. O.: TNF-alpha, IL-4, and IFN-gamma regulate differential expression of P and E selectin expression by porcine aortic endothelial cells. J. Immunol. 2000, 164, 3309-3315.
 50. Ülbegi-Mohyla H., Hassan A. A., Hijazin M., Alber J., Lammler C., Abdulmawjood A., Prenger-Berninghoff E., Weiß R., Zschock M.: Characterization of Arcanobacterium abortusis by phenotypic properties and by sequencing the 16S-23S rDNA intergenic spacer region. Vet. Microbiol. 2011, 148, 431-433.
 51. Ülbegi-Mohyla H., Hassan A. A., Kanbar T., Alber J., Lammler C., Prenger-Berninghoff E., Weiss R., Siebert U., Zschock M.: Synergistic and antagonistic hemolytic activities of bacteria of genus Arcanobacterium and CAMP-like hemolysis of Arcanobacterium phocae and Arcanobacterium haemolyticum with Psychrobacter phenylpyruvicus. Res. Vet. Sci. 2009, 87, 186-188.
 52. Wust J., Martinetti G. D., Luthy-Hottenstein J., Brun F., Altwegg M.: Isolation of Gram-positive rods that resemble but are clearly distinct from Actinomyces pyogenes from mixed wound infection. J. Clin. Microbiol. 1993, 31, 1127-1135.
 53. Yassin A. F., Haggel B., Budzikiewicz H., Schaal K. P.: Fatty acid and polar lipid composition of the genus Amycolatopsis application of fast atom bombardment mass spectrometry to structure analysis of underivatized phospholipids. Int. J. Syst. Bacteriol. 1993, 43, 414-420.
 54. Yassin A. F., Hupfer H., Siering C., Schumann P.: 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. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2011, 61, 1265-1274.
 55. Zastębowska E., Lassa H.: Genotypic characterization and evaluation of an antibiotic resistance of Trueperella pyogenes (Arcanobacterium pyogenes) isolated from milk of dairy cows with clinical mastitis. Vet. Microbiol. 2012, 161, 153-158.
 56. Zhao K., Tian Y., Yue B., Wang H., Zhang X.: Virulence determinants and biofilm production among Trueperella pyogenes recovered from abscesses of captive forest musk deer. Arch. Microbiol. 2013, 195, 203-209.

Adres autora: dr Łukasz Jarosz, Katedra Epizootologii i Klinika Chorób Zakaźnych, ul. Głębocka 30, 20-612 Lublin; e-mail: lukasz.jarosz@up.lublin.pl