

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2021.05.008

# 一株猪源化脓隐秘杆菌的分离鉴定及对促炎细胞因子分泌的影响

田尚全<sup>1</sup>, 王近礼<sup>1</sup>, 易文毅<sup>1</sup>, 谭静梅<sup>1</sup>,  
冉金鑫<sup>1</sup>, 王芝英<sup>1,2</sup>, 周作勇<sup>1,2</sup>

1. 西南大学 动物医学院, 重庆 荣昌 402460; 2. 重庆市兽医科学工程研究中心, 重庆 荣昌 402460

**摘要:** 检测了重庆市璧山区一起屠宰猪肉中出现化脓性病变样本的病原菌, 并研究其药物敏感性、毒力基因分布及其对巨噬细胞分泌 IL-6 和 TNF- $\alpha$  的影响. 从样本中分离获得一株具有极强溶血性的菌株(BS-1 株), 其 16S rRNA 序列与 GenBank 中的猪化脓隐秘杆菌序列(LC500012.1)相似度最高, 为 97.26%. 系统发育分析显示 BS-1 株与其他化脓隐秘杆菌处于同一分支. 药敏试验显示 BS-1 株除对克拉霉素和罗红霉素中度敏感外, 对青霉素 G、庆大霉素、万古霉素、诺氟沙星、氯霉素、米诺环素(甲)和阿莫西林等耐药. 毒力基因检测发现 BS-1 株含有 *Plo*, *NanH*, *NanP*, *FimA* 基因, 无 *CbpA* 和 *FimC* 基因. 细胞因子检测证实 BS-1 株能诱发巨噬细胞 IL-6 和 TNF- $\alpha$  分泌水平显著增加. 试验结果表明: 该猪肉中出现化脓性病变的病原菌为化脓隐秘杆菌, 该菌携带了多种毒力基因, 对常见抗菌药物耐药性严重.

**关键词:** 猪; 化脓隐秘杆菌; 16S rRNA; 毒力基因

**中图分类号:** S828

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1673-9868(2021)05-0062-07

化脓隐秘杆菌 *Trueperella pyogenes* 以前被称为化脓放线菌 *Actinomyces pyogenes* 和化脓棒状杆菌 *Corynebacterium pyogenes*, 属于放线菌科 Actinomycetaceae 隐秘杆菌属 *Arcanobacterium*<sup>[1]</sup>. 化脓隐秘杆菌是一种重要的条件性致病菌, 主要感染猪、牛、羊等多种动物和人, 引发皮下、内脏器官及肌肉组织脓肿, 亦可造成肺炎、胸膜炎、关节炎、心内膜炎和乳腺炎等多种病症, 给养殖业带来重大的经济损失<sup>[1]</sup>. 化脓隐秘杆菌感染致病与其表达的毒力因子有关, 目前报道的毒力因子包括溶血素(Plo)<sup>[2-3]</sup>、胶原结合蛋白(CbpA)、神经氨酸酶(Nan)及菌毛合成蛋白(Fim)等<sup>[4-7]</sup>, 这些毒力因子在该病原感染致病中发挥重要作用.

本实验室从重庆市璧山区一起屠宰猪肉中出现的草绿色化脓病料样本中分离出一株溶血性极强的细菌, 经常规形态学鉴定、16S rRNA 测序分析、毒力基因和耐药谱检测, 将其鉴定为化脓隐秘杆菌. 结合化脓隐秘杆菌感染宿主后主要引起炎性脓肿的致病特征, 研究其作用巨噬细胞对促炎细胞因子 IL-6 和 TNF- $\alpha$  分泌的影响, 以为猪化脓隐秘杆菌病的防控及致病机理研究提供参考.

收稿日期: 2020-09-07

基金项目: 重庆市技术创新与应用示范(社会民生类)项目(cstc2018jsex-msybX0216); 中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(XDJK2020B016).

作者简介: 田尚全, 硕士研究生, 主要从事动物传染病防治研究.

通信作者: 周作勇, 副教授.

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

#### 1.1.1 病料来源

重庆市璧山区一起屠宰猪肉中出现的草绿色粘稠的脓汁(图 1a),以灭菌离心管采集后,低温冷藏送检.

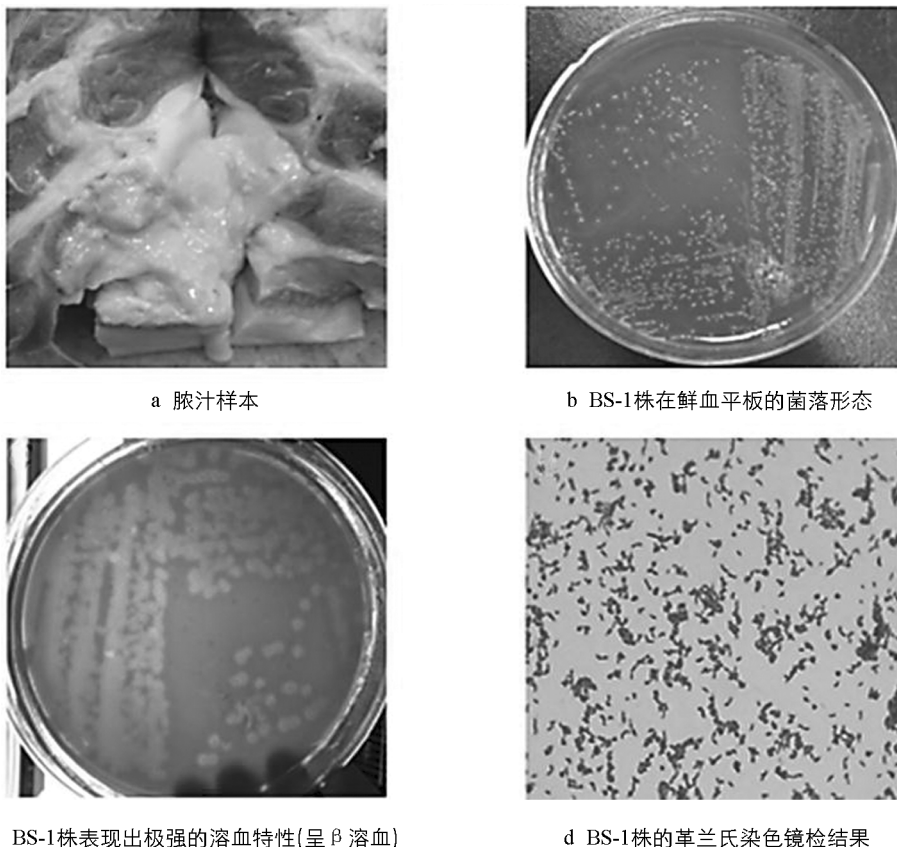


图 1 BS-1 菌株的来源样本、分离培养及染色镜检结果

#### 1.1.2 主要试剂及细胞

药敏纸片购于杭州滨和微生物试剂有限公司; Lysis Buffer for Microorganism to Direct PCR、preMix  $2\times$  Taq 和 DNA Marker 购于大连宝生物有限公司; 胎牛血清购自于 Biological Industries 公司; IL-6 和 TNF- $\alpha$  ELISA 检测试剂盒购自 Thermo Fisher Scientific(USA). J774A.1 巨噬细胞由西南大学动物科学学院周洋博士惠赠.

#### 1.1.3 检测引物

以 Li 等<sup>[8]</sup>报道的细菌 16S *rRNA* 基因及 Rzewuska 等<sup>[9]</sup>报道的化脓隐秘杆菌 *Plo*, *CbpA*, *NanP*, *NanH*, *FimA* 和 *FimC* 毒力基因引物为检测引物(表 1), 由上海百力格生物技术服务有限公司合成.

#### 1.1.4 试验动物

C57BL/6 小鼠, 体质量 18~22 g, 购自重庆市中药研究院.

## 1.2 试验方法

### 1.2.1 细菌的分离鉴定及致病性试验

将病料接种于鲜血琼脂培养基上, 37 °C 培养 48 h, 观察菌落形态. 挑取单个菌落纯化培养和革兰氏染色镜检. 将分离菌(BS-1)菌液按 0.3 mL/只( $1.2\times 10^9$  CFU/mL)腹腔注射 C57BL/6 小鼠, 观察其致病性.

用 Lysis Buffer for Microorganism to Direct PCR 裂解细菌获得基因组 DNA, 以 16S *rRNA* 引物进行 PCR 扩增. PCR 扩增体系为基因组 DNA 2  $\mu$ L, premix  $2\times$  Taq 12.5  $\mu$ L, 上、下游引物各 1  $\mu$ L, 用 dd H<sub>2</sub>O 补至

25  $\mu\text{L}$ . PCR 扩增条件为 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s, 54  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 1.5 min, 30 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min. 经电泳检测后, 将 PCR 产物送往重庆擎科兴业生物技术有限公司测序. 测序结果进行 BLAST 在线相似度比对. 以放线菌科的伪结核棒状杆菌 *Corynebacterium pseudotuberculosis* 16S rRNA 为外群, 选取猪、山羊、绵羊和牛源化脓隐秘杆菌 *T. pyogenes*、感染人的溶血隐秘杆菌 *Arcanobacterium haemolyticum*、感染狐和貂的 phocae 隐秘杆菌 *A. phocae* 16S rRNA 序列(表 2), 以 CLUSTAL X 进行多重序列比对, 采用 MEGA 8.0 构建系统进化树, 分析 BS-1 株的 16S rRNA 聚类情况.

表 1 化脓隐秘杆菌 16S rRNA 和主要毒力基因扩增引物

基因		引物序列 5'-3'	扩增大小/bp
16S rRNA	SF	AGAGTTTGATCTGGCTCAG	1 500
	SR	CGGCTACCTTGTTACGACTT	
<i>Plo</i>	SF	TCATCAACAATCCCACGAAGAG	150
	SR	TTGCCTCCAGTTGACGCTTT	
<i>CbpA</i>	SF	GCAGGGTTGGTGAAAGAGTTTACT	124
	SR	GCTTGATATAACCTTCAGAATTTGCA	
<i>NanP</i>	SF	TTGAGCGTACGCAGCTCTTC	150
	SR	CCACGAAATCGGCCTTATTG	
<i>NanH</i>	SF	CGCTAGTGCTGTAGCGTTGTTAAGT	781
	SR	CCGAGGAGTTTTGACTGACTTTGT	
<i>FimA</i>	SF	CACTACGCTCACCATT CACAAG	625
	SR	GCTGTAATCCGCTTTGTCTGTG	
<i>FimC</i>	SF	TGTCGAAGGTGACGTTCTTCG	863
	SR	CAAGGTCACCGAGACTGCTGG	

注: *Plo*(编码溶血素), *CbpA*(编码胶原结合蛋白), *NanP*, *NanH*(编码神经氨酸酶), *FimA*, *FimC*(编码菌毛合成蛋白).

表 2 用于化脓隐秘杆菌系统进化分析的 16S rRNA 序列

病原菌	宿主	国家	序列号	来源
<i>T. pyogenes</i>	Swine	Japan	LC500012.1	GenBank
	Goat	Japan	LC500006.1	GenBank
	Cattle	Japan	LC500007.1	GenBank
	Swine	China	—	This study
	Sheep	China	JQ975914.1	GenBank
<i>A. haemolyticum</i>	Human	China	MK61173.1	GenBank
	Human	USA	MH569545.1	GenBank
	Human	UK	NR-025347.1	GenBank
<i>A. phocae</i>	Vulpeslagpus	France	LT854831.1	GenBank
	Mink	GER	MN593009.1	GenBank
	Vulpeslagpus	France	LT854821.1	GenBank
<i>C. pseudotuberculosis</i>	Cattle	Japan	NR-115562.1	GenBank

### 1.2.2 分离菌药敏试验

将分离菌(BS-1 株)接种于含 10% 血清的 LB(lysogeny broth)肉汤中, 37 °C 培养 48 h, 制成 0.5 个麦氏单位的菌悬液, 吸取 100  $\mu$ L 均匀涂布在鲜血琼脂平板表面, 待菌液吸收后, 贴上药敏纸片, 37 °C 培养 48 h, 记录抑菌圈大小。

### 1.2.3 分离菌毒力基因检测

制备 BS-1 株的基因组 DNA, 检测毒力基因携带情况. PCR 扩增条件为 94 °C 预变性 10 min; 94 °C 变性 30 s, 57 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1.5 min, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min. PCR 扩增产物分别用 4% (*Plo*, *CbpA*, *NanP*) 和 1% (*NanH*, *FimA*, *FimC*) 的琼脂糖凝胶进行电泳检测。

### 1.2.4 分离菌株对巨噬细胞 IL-6 和 TNF- $\alpha$ 分泌的影响

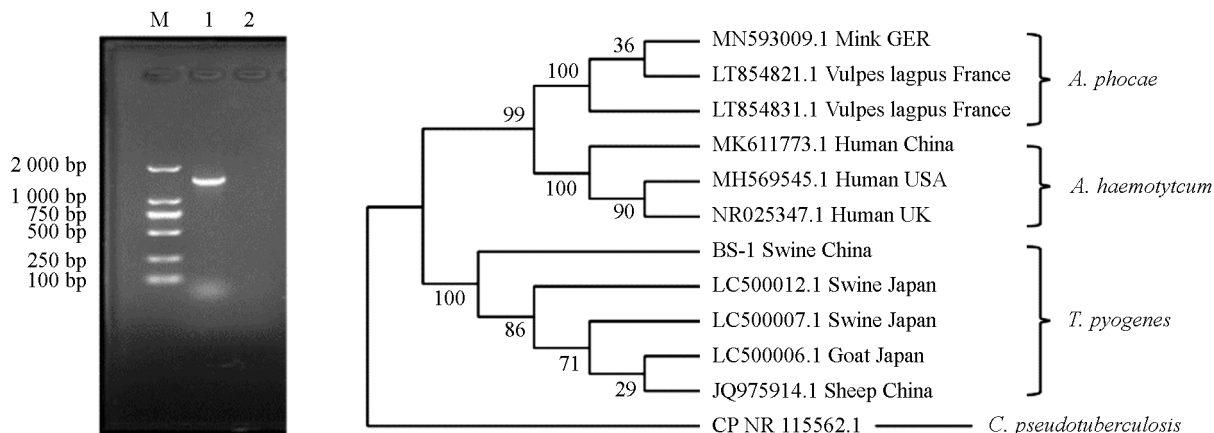
培养 BS-1 株菌液, 以感染复数为 10 (MOI=10) 作用 J774A.1 巨噬细胞 1 h, 更换含庆大霉素培养液继续培养, 24 h 后收集培养上清, 按照 ELISA 试剂盒说明书检测 IL-6 和 TNF- $\alpha$  含量. 用 SPSS 软件分析数据差异性。

## 2 试验结果

### 2.1 细菌的分离鉴定结果

以待检脓汁划线接种后分离获得形态单一、溶血性极强(呈  $\beta$  溶血)约 1 mm 大小的菌落, 其表面光滑, 呈半湿润状、灰白色(图 1b、图 1c). 染色镜检显示该分离菌(BS-1)为革兰氏阳性杆菌, 呈散在分布的形态多样的短小杆菌(图 1d). BS-1 株接种 3 h 后, 小鼠表现为精神萎靡、反应迟钝、动作缓慢等症状, 并于 7 h 内全部死亡, 解剖发现肝肿大、脾肿大且有出血点. 对照组小鼠无明显眼观症状和死亡。

对 BS-1 株 16S *rRNA* 基因扩增获得 1 500 bp 左右的条带(图 2a), 测序及系统进化分析发现该菌 16S *rRNA* 序列与化脓隐秘杆菌序列相似度较高, 其中与 NIAH13535 株(LC500012.1)相似度最高, 为 97.26%. 系统进化分析显示, 该菌与化脓隐秘杆菌聚类到一个分支(图 2b). 结合病原形态特征, 将该 BS-1 株鉴定为化脓隐秘杆菌。



a BS-1 的 16S *rRNA* 扩增电泳结果

b 基于 BS-1 的 16S *rRNA* 序列的系统进化树

M 为 DL2000 DNA Marker, 1 为 BS-1 株, 2 为空白对照。

图 2 BS-1 株的 16S *rRNA* 扩增电泳检测及其序列系统进化分析结果

### 2.2 BS-1 株的药敏试验结果

根据美国实验标准委员会(NCCLS)药敏纸片扩散法规标准, 以常见的 18 种抗菌药物进行药敏试验, 发现 BS-1 株仅对克拉霉素和罗红霉素中度敏感, 而对青霉素 G、庆大霉素、万古霉素、诺氟沙星、氯霉素、米诺环素(甲)、阿莫西林等耐药(表 3)。

### 2.3 BS-1 株的毒力基因检测结果

毒力基因检测显示 BS-1 株携带有 *Plo*, *NanP*, *NanH* 和 *FimA* 共 4 个毒力基因, 未检测到 *CbpA* 和 *FimC* 基因(图 3)。

表 3 BS-1 株的药敏试验结果

名称	抑菌圈大小/mm	结果判定	名称	抑菌圈大小/mm	结果判定
青霉素 G	4.7	R	罗红霉素	15.0	I
克拉霉素	13.7	I	米诺环素(甲)	13.0	R
庆大霉素	6.3	R	阿莫西林	7.0	R
呋喃唑酮(痢特灵)	4.0	R	头孢西丁	8.3	R
万古霉素	5.0	R	卡那霉素	7.3	R
诺氟沙星	2.7	R	四环素	6.7	R
氯霉素	10.7	R	甲氧嘧啶(TMP)	7.3	R
链霉素	6.3	R	头孢曲松(菌)	7.0	R
头孢拉定·先锋 VI	5.0	R	呋喃妥因	8.3	R

注：“R”代表耐药；“I”代表中度敏感。

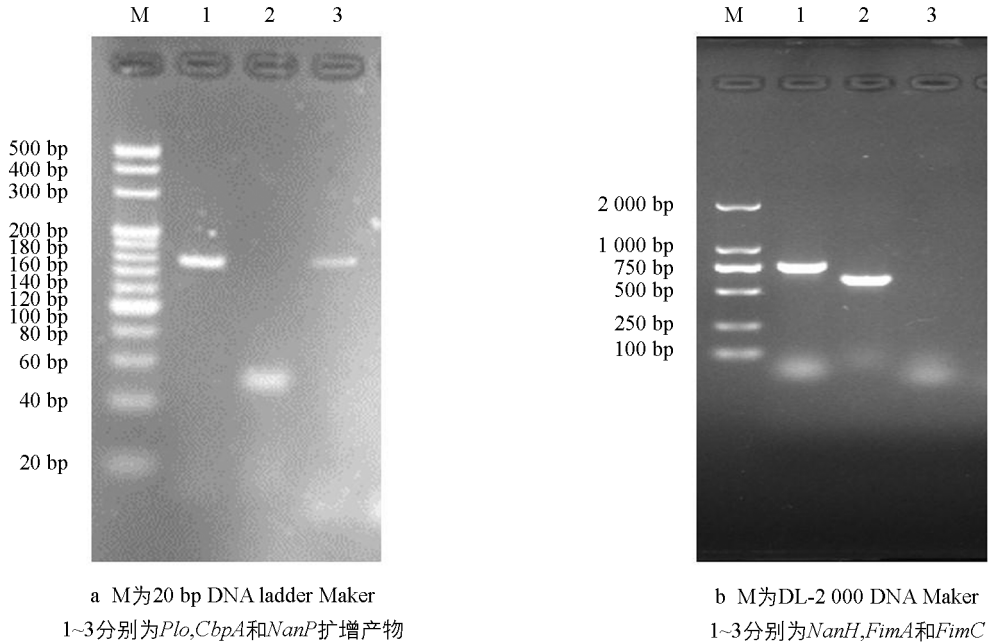
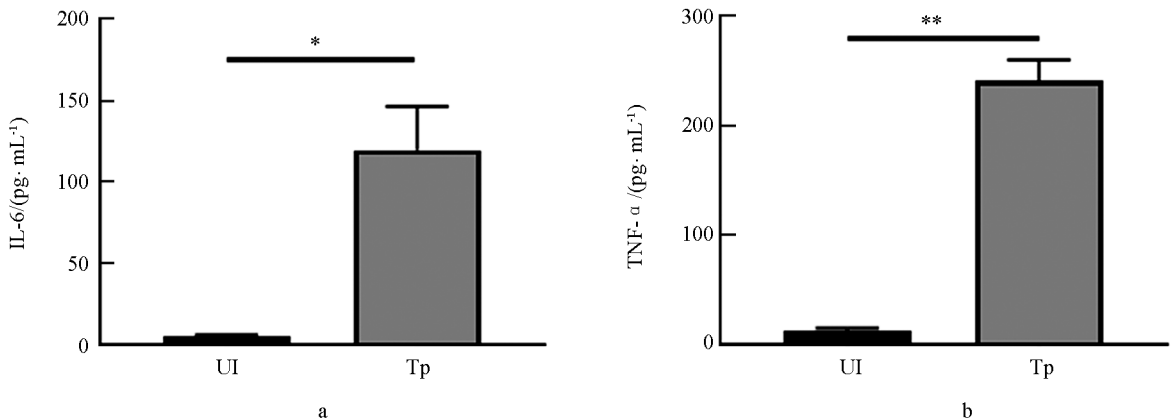


图 3 BS-1 株毒力基因检测结果

## 2.4 BS-1 株感染对 J774A.1 巨噬细胞 IL-6 和 TNF- $\alpha$ 分泌的影响

化脓隐秘杆菌感染宿主后所引起的化脓性病变本质为炎症反应，因此本研究检测了该病原感染巨噬细胞后促炎细胞因子分泌情况。结果发现，与未受感染的 J774 A.1 巨噬细胞相比，BS-1 株感染巨噬细胞 IL-6 和 TNF- $\alpha$  分泌水平显著增加(图 4)。



UI 代表未感染对照组；Tp 代表化脓隐秘杆菌 BS-1；\* 表示  $p < 0.05$ ，差异具有统计学意义；\*\* 表示  $p < 0.01$ ，差异具有统计学意义。

图 4 BS-1 株感染对 J774A.1 巨噬细胞 IL-6 和 TNF- $\alpha$  分泌的影响

### 3 结 语

化脓隐秘杆菌与马红球菌及伪结核棒状杆菌相似,均为放线菌属病原中引起化脓性感染的重要病原<sup>[1]</sup>。近年来关于该病原感染猪的病例报道渐多,其分离地点包括广东、上海、吉林、河南、天津和四川等地<sup>[4, 10-16]</sup>,表明化脓隐秘杆菌感染猪致病的现象日益严重。化脓隐秘杆菌可与副猪嗜血杆菌、多杀性巴氏杆菌、致病性大肠杆菌混合感染,对猪的致病性增强,为疾病诊断和防治带来很大的困难<sup>[10, 16]</sup>。本文从重庆地区屠宰猪的肌肉脓汁中分离出具有较强致病力的化脓隐秘杆菌,提示当地养猪场需注意对该病原做好防控工作。掌握病原菌对药物的敏感性情况是有效防控其感染致病的关键,本研究发化脓隐秘杆菌 BS-1 株仅对克拉霉素和罗红霉素中度敏感,而对青霉素 G、万古霉素、诺氟沙星、氯霉素、阿莫西林等耐药,与 Santos 等<sup>[17]</sup>的研究结果类似。这可能与近年来该地区部分猪场不合理使用抗菌药物有关。

病原菌毒力基因的携带水平大都与其致病能力密切相关,蔡瑶等<sup>[10]</sup>报道分离自四川浦江的猪源化脓隐秘杆菌携带有 *plo*, *NanH*, *FimA*, *FimC* 和 *FimG* 基因,无 *NanP*, *CbpA* 和 *FimE* 基因。董文龙等<sup>[14]</sup>报道分离自吉林省的 8 株猪源化脓隐秘杆菌均携带有 *Plo* 基因,但均缺失 *CbpA* 基因, *NanH* 及 *NanP* 基因携带水平分别为 25% 和 50%。本研究发化脓隐秘杆菌 BS-1 株携带了 *Plo*, *NanP*, *NanH* 和 *FimA* 基因,但没有 *CbpA* 和 *FimC* 基因,与蔡瑶等<sup>[10]</sup>和董文龙等<sup>[14]</sup>报道的化脓隐秘杆菌均携带有 *Plo* 基因相同,而其他基因携带水平有一定的差异,其原因可能与化脓隐秘杆菌不同来源地有关。

化脓隐秘杆菌感染宿主后主要引起炎性脓肿的致病特征,促炎性细胞因子在该病原感染致炎中起了重要作用。TNF- $\alpha$  和 IL-6 均是由单核巨噬细胞等产生的重要促炎细胞因子,与多杀性巴氏杆菌、伪结核棒状杆菌等病原感染巨噬细胞诱发大量的 TNF- $\alpha$  和 IL-6 分泌相似<sup>[18-19]</sup>。本研究表明化脓隐秘杆菌感染可诱发巨噬细胞大量分泌 TNF- $\alpha$  和 IL-6,其诱发机理及在该病原感染致病中的作用机制有待进一步研究。

重庆璧山区该起屠宰猪肉中的脓肿病变由化脓隐秘杆菌感染引起,该病原耐药性较强,携带有多种毒力基因,可激活巨噬细胞分泌 TNF- $\alpha$  和 IL-6。本研究为化脓隐秘杆菌的防控及致病机理研究提供了资料。

### 参考文献:

- [1] RZEWUSKA M, KWIECIEŃ E, CHROBAK-CHMIEL D, et al. Pathogenicity and Virulence of *Trueperella Pyogenes*: a Review [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(11): E2737.
- [2] AMOS M R, HEALEY G D, GOLDSTONE R J, et al. Differential Endometrial Cell Sensitivity to a Cholesterol-Dependent Cytolysin Links *Trueperella Pyogenes* to Uterine Disease in Cattle [J]. *Biology of Reproduction*, 2014, 90(3): 1-13, 54.
- [3] 田 凯,王秋霞,郭文洁,等.化脓隐秘杆菌溶血素的研究进展[J].*中国兽医杂志*,2010,46(12):65-67.
- [4] 姜 轩,徐承倩,张 欣,等.猪源化脓隐秘杆菌分离鉴定与病原特性研究[J/OL].*中国动物传染病学报*,2020-02-12,http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2031.S.20200212.0744.004.html.
- [5] 郭文洁,赵敬翠,刘耀川,等.化脓隐秘杆菌毒力因子的研究进展[J].*中国兽医杂志*,2010,46(1):52-53.
- [6] YAN M H, HU Y H, BAO J, et al. Isoleucine 61 is Important for the Hemolytic Activity of Pyolysin of *Trueperella Pyogenes* [J]. *Veterinary Microbiology*, 2016, 182: 196-201.
- [7] 李伟杰,魏财文,刘 燕,等.奶牛源化脓隐秘杆菌的分离鉴定及其毒力基因的检测[J].*中国畜牧兽医*,2014,41(11):68-72.
- [8] LI H X, YANG H Y, ZHOU Z Y, et al. Isolation, Antibiotic Resistance, Virulence Traits and Phylogenetic Analysis of *Corynebacterium Pseudotuberculosis* from Goats in Southwestern China [J]. *Small Ruminant Research*, 2018, 168: 69-75.
- [9] RZEWUSKA M, STEFAŃSKA I, OSIŃSKA B, et al. Phenotypic Characteristics and Virulence Genotypes of *Trueperella* (*Arcanobacterium*) *Pyogenes* Strains Isolated from European Bison (*Bison Bonasus*) [J]. *Veterinary Microbiology*, 2012, 160(1/2): 69-76.
- [10] 蔡 瑶,周雪珂,江朝源,等.猪肺源致病性大肠杆菌和化脓隐秘杆菌混合感染病原的分离鉴定及主要毒力因子的检

测 [J]. 江苏农业学报, 2020, 36(1): 254-256.

- [11] 刘 杰, 刘守川, 赵坤坤, 等. 猪化脓隐秘杆菌的分离及鉴定 [J]. 猪业科学, 2019, 36(5): 78-79.
- [12] 董文龙, 王家祯, 朱世馨, 等. 猪源化脓隐秘杆菌的分离鉴定及病理组织学观察 [J]. 上海交通大学学报(农业科学版), 2016, 34(3): 22-27.
- [13] 张乐宜, 蔡汝健, 宋长绪. 猪化脓隐秘杆菌的分离鉴定及病原特性研究 [J]. 动物医学进展, 2014, 35(5): 44-49.
- [14] 董文龙, 魏 菁, 耿昕颖, 等. 吉林省 8 株猪源化脓隐秘杆菌主要毒力基因的鉴定及耐药性分析 [J]. 中国兽医科学, 2016, 46(1): 69-73.
- [15] 齐新永, 徐 锋, 张维谊, 等. 猪化脓隐秘杆菌的分离鉴定 [J]. 上海畜牧兽医通讯, 2015(1): 30-31.
- [16] 王治方, 焦文强, 张青娴, 等. 规模化猪场副猪嗜血杆菌、多杀性巴氏杆菌和化脓隐秘杆菌控制性研究 [J]. 山西农业科学, 2018, 46(7): 1181-1185.
- [17] SANTOS T M A, CAIXETA L S, MACHADO V S, et al. Antimicrobial Resistance and Presence of Virulence Factor Genes in Arcanobacterium Pyogenes Isolated from the Uterus of Postpartum Dairy Cows [J]. Veterinary Microbiology, 2010, 145(1/2): 84-89.
- [18] ZHOU Z Y, LI H X, TIAN S Q, et al. Critical Roles of NLRP3 Inflammasome in IL-1 $\beta$  Secretion Induced by Corynebacterium Pseudotuberculosis in Vitro [J]. Molecular Immunology, 2019, 116: 11-17.
- [19] FANG R D, LEI G H, JIANG J L, et al. High-and Low-Virulent Bovine Pasteurella Multocida Induced Differential NLRP3 Inflammasome Activation and Subsequent IL-1 $\beta$  Secretion [J]. Veterinary Microbiology, 2020, 243: 108646.

## Isolation and Identification of *Trueperella pyogenes* from Swine and Its Effect on the Secretion of Proinflammatory Cytokines

TIAN Shang-quan<sup>1</sup>, WANG Jin-li<sup>1</sup>, YI Wen-yi<sup>1</sup>,  
TAN Jing-mei<sup>1</sup>, RAN Jin-xin<sup>1</sup>, WANG Zhi-ying<sup>1,2</sup>, ZHOU Zuo-yong<sup>1,2</sup>

1. School of Veterinary Medicine, Southwest University, Rongchang Chongqing 402460, China;

2. Veterinary Science Engineering Research Center of Chongqing, Rongchang Chongqing 402460, China

**Abstract:** This study detected the pathogenic bacteria that caused the purulent lesions in slaughtered pig pork in Bishan District, Chongqing, and studied the drug sensitivity, virulence gene distribution and the ability of the isolated bacteria that induced IL-6 and TNF- $\alpha$  secretion in macrophages. In result, a strain (BS-1) with extremely strong hemolytic properties was isolated from the sample, and the 16S *rRNA* sequence of BS-1 was found to be most similar (97.26%) to that of *Trueperella pyogenes* (LC500012.1), and the phylogenetic analysis showed that BS-1 was located in the same branch as the other *T. pyogenes* strains. The drug susceptibility test showed that BS-1 was moderately sensitive to clarithromycin and roxithromycin, but resistant to penicillin G, gentamicin, vancomycin, norfloxacin, chloramphenicol, minocycline (A) and amoxicillin. virulence gene test showed that BS-1 contained *Plo*, *NanH*, *NanP*, and *FimA*, but no *CbpA* and *FimC*. Cytokine test confirmed that BS-1 induced a significant increase in IL-6 and TNF- $\alpha$  secretion in macrophages. These results indicated that the pathogen of pyogenic lesions in the slaughtered pork was *T. pyogenes*, which carried multiple virulence genes and was highly resistant to common antimicrobial drugs.

**Key words:** swine; *Trueperella pyogenes*; 16S *rRNA*; virulence gene