



驴源兽疫链球菌的分离鉴定及多位点序列分型分析

蒲小峰, 陈晓萌, 汪丽, 张泽华, 吕芬芬, 王浩, 张宝江, 苏艳*

新疆农业大学动物医学学院, 新疆 乌鲁木齐 830052

蒲小峰, 陈晓萌, 汪丽, 张泽华, 吕芬芬, 王浩, 张宝江, 苏艳. 驴源兽疫链球菌的分离鉴定及多位点序列分型分析. 微生物学报, 2022, 62(2): 579–589.

Pu Xiaofeng, Chen Xiaomeng, Wang Li, Zhang Zehua, Lv Fenfen, Wang Hao, Zhang Baojiang, Su Yan. The isolation and identification of *Streptococcus equi* ssp. *zooepidemicus* from donkey and its multilocus sequence typing. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(2): 579–589.

摘要: 【目的】本研究采集了新疆地区驴腺疫病料, 从样品中分离鉴定可疑病原菌并对其进行了基因水平的分型与进化分析。【方法】对采集的新疆地区某驴场驴腺疫病驴颌下淋巴结拭子进行细菌分离培养, 对 2 个分离株(HT111、HT321)进行染色、培养、生化试验、药敏试验, 对其 16S rRNA 及 *SeM* 基因进行测序和进化分析, 并通过 PCR 扩增 7 个管家基因, 利用多位点序列分型 (MLST) 方法鉴定其分子分型。【结果】2 个分离株均属马链球菌兽疫亚种, 其中 HT111 对测试的 13 种抗生素中的 3 种(青霉素、克拉霉素和四环素)耐药, HT321 对 8 种抗生素(阿莫西林、头孢唑啉、头孢噻吩、青霉素、克拉霉素、克林霉素、土霉素和四环素)耐药。序列分型发现了一种新的 ST 型为 ST420 (HT321), 分离株 HT111 为 ST179 型。【结论】本研究在新疆地区首次分离了驴源马链球菌兽疫亚种, 并鉴定出一个新的 ST 型(ST420), 为驴腺疫的流行病学提供了参考数据。

关键词: 驴源; 马链球菌兽疫亚种; 16S rRNA 基因; *SeM* 基因; MLST; 进化特征

基金项目: 国家自然科学基金(U1803108)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (U1803108)

*Corresponding author. Tel: +86-991-8762704; E-mail: 2006au@163.com

Received: 12 April 2021; Revised: 3 August 2021; Published online: 30 August 2021

The isolation and identification of *Streptococcus equi* ssp. *zooepidemicus* from donkey and its multilocus sequence typing

PU Xiaofeng, CHEN Xiaomeng, WANG Li, ZHANG Zehua, LV Fenfen, WANG Hao, ZHANG Baojiang, SU Yan*

College of Veterinary Medicine, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Abstract: [Objective] In this study donkey strangles samples were collected from Xinjiang donkey farm, suspicious pathogenic bacteria were isolated and identified. Then we performed genotyping and evolution analysis of these isolates. [Methods] First, bacteria isolation and culture were conducted using the samples collected from the abscess of submandibular lymph node in donkey farm in Xinjiang and two isolates (HT111, HT321) were identified. Then the morphological observation, physiological and biochemical analysis, drug sensitivity test, 16S rRNA sequencing and phylogenetic tree construction were performed. Besides, the seven housekeeping genes were amplified by PCR and the sequences of genes were analyzed through multiple locus sequence typing (MLST). [Results] Two isolates (HT111, HT321) were identified as *S. equi* ssp. *zooepidemicus* (*S. zooepidemicus*) from the samples. The HT111 isolate was resistant to penicillin, clarithromycin, and tetracycline and HT321 was resistant to eight drugs, amoxicillin, cefuroxime, ceftiofur, penicillin, clarithromycin, clindamycin, oxytetracycline and tetracycline. MLST result showed that ST179 (HT111), ST420 (HT321) were found and ST420 (HT321) was the first identified type. [Conclusion] Two donkey *S. zooepidemicus* strains were isolated and one novel genotype ST420 was identified, which could provide some data for the epidemic investigation and the prevention and control of donkey strangle in the future.

Keywords: donkey derived; *S. equi* ssp. *zooepidemicus*; 16S rRNA genes; *SeM* gene; MLST; evolution characteristics

马链球菌兽疫亚种(*Streptococcus equi* ssp. *zooepidemicus*, SeZ)属 C 群链球菌成员, 可感染马属动物及狗、猫、猪、奶牛、羊等多种动物引起肺部脓肿^[1-3], 通过外伤、手术等感染动物引发败血症、脑膜炎、心内膜炎、关节炎等。该菌宿主多样, 呈全球分布^[4-5]。除马链球菌马亚种(*Streptococcus equi* subsp. *equi*, *S. equi*)外, SeZ 也是引发马属动物腺疫的主要病原, 近年来有报道该菌可通过多种途径传染人^[6]。

高度保守的 16S rRNA 基因多用来鉴定菌株, 该基因的 9 个可变区通常被认为是最能体现种间差异的基因片段, 不同地区的分离菌株, 其可变区具有高度的遗传变异性^[7]。目前为止,

已有研究通过 16S rRNA 对马链球菌兽疫亚种种内变异进行分析^[8]。以往研究证明猪源和马源马链球菌兽疫亚种的类 M 蛋白位于菌体表面, 进化过程中在各种选择性压力作用下以一定的频率不断发生变异^[9], 尤其是在免疫选择性压力的作用下, 其保护性中和表位会发生明显的点突变^[10-12]。因此, *SeM* 的 N 端表现出多样性, 各地区分离出来的菌株 *SeM* 序列差异显著^[13], 这对追溯传染源和流行病学调查有重要意义。

多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST)是根据细菌基因组中 7 个管家基因在不同菌株之间的多态性建立起的一种分型方法, 该方法可以在全球数据库中开展比对分析, 已被用

来研究细菌的传播及菌群演化^[14], 目前我国学者已用该分型法对猪链球菌做了分型研究^[15-17]。

关于驴源马链球菌兽疫亚种的分离及分子分型的报道目前还未见到。本研究对新疆地区驴腺疫病驴样本进行细菌分离, 得到 2 株分离菌, 随后对其进行了生理生化及分子生物学特性分析, 并通过对分离株 16S rRNA 基因的 V1-V5 可变区比较分析, *SeM* 基因的变化特点分析及进行 MLST 的分子分型, 评估其种内的进化特征, 为驴腺疫的流行、传播和防控提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 病料与菌株

新疆地区某驴场患驴出现了体温升高、心跳加快, 同时还伴有流鼻涕, 呼吸困难、下颌脓肿破溃、个别病驴鼻孔流出脓性分泌物等疑似腺疫的临床症状, 2018 年及 2019 年该场陆续从山东省、河南省引进驴种还有本地的驴种, 在养殖过程均有该病的发生, 发病驴以幼驴及体格弱小的驴比例较多。采集病驴颌下淋巴结分泌物及鼻拭子取样。

1.2 培养基及主要试剂

DNA 提取试剂盒、胶回收试剂盒、*E. coli* DH5 α 均购自天根生化科技(北京)有限公司; 细菌生化鉴定管、胰蛋白胨、酵母浸粉、药敏试纸均购自杭州滨和微生物试剂有限公司; 其他试剂均为国产分析纯。

1.3 细菌的分离培养及观察

将无菌采集的患驴病样涂布于鲜血平板, 37 °C 培养 12 h, 分离纯化后观察生长特性及菌落形态, 挑选单菌落, 对其进行革兰氏染色, 显微镜下观察分离细菌的形态。

1.4 生化试验

将分离菌株的纯化培养物接种于细菌生化反应管中, 37 °C 培养 18-24 h, 进行吡咯烷酮

试验、曲美他嗪、蕈糖、蔗糖、山梨醇、二苯基磷、精氨酸等 12 项生物化学特性的检测。观察并记录结果。

1.5 药物敏感性试验

采用纸片扩散法, 将分离菌涂布于 MH 琼脂平板, 用 13 种抗生素的药敏纸片紧贴于平板上, 37 °C 培养 12 h, 测量抑菌圈直径, 参照 NCCLS (美国临床实验室标准化委员会) 的标准判定细菌对药物的敏感性。

1.6 16S rRNA 基因的扩增测序及进化分析

按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒所述操作步骤提取分离菌株的基因组。采用 16S rRNA 引物^[7]: 上游引物 16S-F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; 下游引物 16S-R: 5'-ACCTGTCACCCGATGTACCGAAGTA-3'。测序后的 16S rRNA 序列与 GenBank 中 36 株国际参考菌株的相关序列进行 BLAST 和比对, 利用 Mega7.0 软件中的邻接法(neighbor-joining, NJ), 构建系统发育树。

1.7 细菌 *SeM* 基因扩增及进化分析

以提取的分离菌基因组 DNA 为模板, 分别以引物: *SeM*-F: 5'-TCTTTGCGTTTAGGAGA-3'; *SeM*-R: 5'-AGCATCAGAAAATAAGT-3', 进行 PCR 扩增^[12]。分离菌株 *SeM* 测序后的序列与数据库 PubMLST-*SeM* 中 209 个 *SeM* 等位基因 N 端序列进行比对, 用 Mega7.0 软件构建系统发育树。

1.8 看家基因的扩增及 MLST 分型分析

根据 *S. zooepidemicus* 7 个看家基因(*arcC*、*nrdE*、*pros*、*spi*、*tdk*、*tpi*、*yqiL*)设计引物, 对看家基因进行 PCR 扩增和测序^[17]。PCR 反应体系同 1.7。PCR 扩增产物检测后回收测序。利用 *S. zooepidemicus* MLST 数据库(<https://pubmlst.org/zooepidemicus>)得到 7 个等位基因型, 确定分离菌株的基因序列型, 并采用 BioNumerics 软件构建最小生成树。

2 结果与分析

2.1 分离菌的菌落及形态

采集的病样经分离后得到可疑菌株 HT111 及 HT321, 其在鲜血培养基上 37 °C 培养 18 h 可长出白色或无色、半透明、圆形, 中间凸起的菌落, 有明显的溶血现象(图 1A)。镜下观察到革兰氏阳性、椭圆或圆形、排列成单个或短链状的菌体(图 1B)。

2.2 生化试验结果

2 株分离菌的生化反应结果见表 1, HT111、HT321 均对二苯基胂、葡磷反应为阴性, 对吡咯烷酮、精氨酸、乳糖等的反应为阳

性。此外分离株 HT321 髓磷脂连接糖反应为阴性(表 1)。2 株分离菌的生化反应结果与《伯杰细菌鉴定手册》^[18]中关于马链球菌兽疫亚种的结果相似。

2.3 药物敏感性试验结果

药物敏感性试验结果表明(表 2), 分离株 HT111 对 13 种抗生素中的 3 种(青霉素、克拉霉素和四环素)耐药, 对 10 种(阿莫西林、氨苄西林、头孢呋辛、头孢噻呋、头孢西丁、克林霉素、土霉素、磺胺异恶唑、磺胺嘧啶钠和利福平)敏感。分离菌 HT321 对 13 种抗生素中的 8 种(阿莫西林、头孢呋辛、头孢噻呋、青霉素、克拉霉素、克林霉素、土霉素和四环

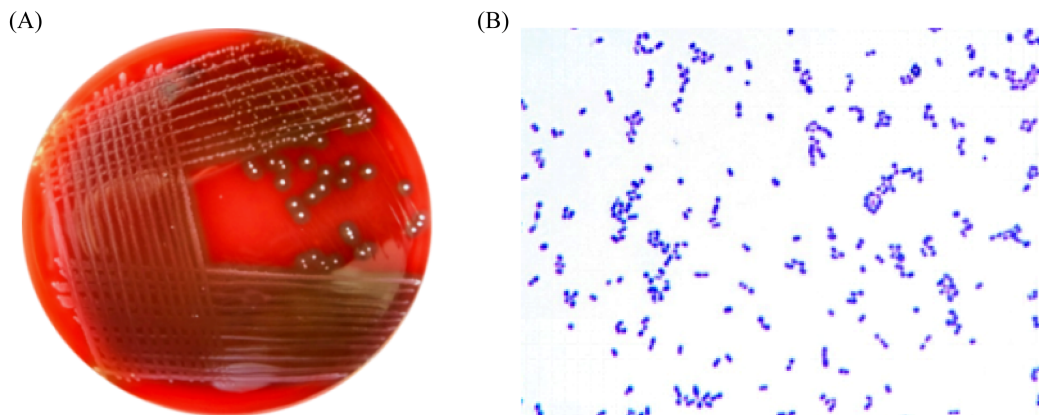


图 1 分离菌株生长及革兰染色形态($\times 1\ 000$)

Figure 1 Growth and Gram staining microscopic morphology of isolates ($\times 1\ 000$). A: growth characteristics of isolates; B: microscopic morphology result of isolates.

表 1 分离菌株生化试验结果

Table 1 Biochemical test results of isolates

Items	Results		Items	Results	
	HT111	HT321		HT111	HT321
Pyrrolidone	+	+	Trimetazidine	+	+
Arginine	+	+	Mushroom sugar	+	+
Diphenylphosphine	-	-	Saccharose	+	+
Methacryloyl group	+	+	Sorbitol	+	+
Esculocide	+	+	Glufos	-	-
Myelin linked sugar	+	-	Lactose	+	+

+: positive, producing acid and not producing gas; -: negative, not producing acid and gas.

表 2 分离菌株药物敏感性实验结果

Table 2 Drug sensitivity test results of isolates

Drugs	Sensitivity		Drugs	Sensitivity	
	HT111	HT321		HT111	HT321
Amoxicilin	S	R	Sulfafurazole	S	S
Ampicillin	S	I	Sulfadiazine Sodium	S	S
Cefuroxime	S	R	Rifampin	S	S
Ceftiofur	S	R	Clindymycin	S	R
Cefoxitin	S	S	Oxytetracycline	S	R
Penicillin	R	R	Tetracycline	R	R
Clarithromycin	R	R			

素)耐药, 对氨苄西林中度敏感, 对 4 种抗生素(头孢西丁、磺胺异恶唑、磺胺嘧啶钠、利福平)敏感。

2.4 分离菌 16S rRNA 扩增及序列分析

分离菌株 HT111、HT321 16S rRNA 基因 PCR 扩增后测序, 基于 16S rRNA 基因序列进行比对分析和构建的进化树图表明, 所有比较的相关链球菌株可分为 5 个不同群(Group I、

Group II、Group III、Group IV、Group V), 马链球菌兽疫亚种分别属于其中 2 个群(Group II 及 Group III), 2 个分离株属于 III 群, 2 株驴源分离菌株的 16S rRNA 基因序列在 V2 区存在明显的变化特征(图 2)。进化树分析结果表明, 这 2 株分离菌与英国(UK-EF406019)及国内(China-MK886616)的马源分离株亲缘关系最近(图 3)。

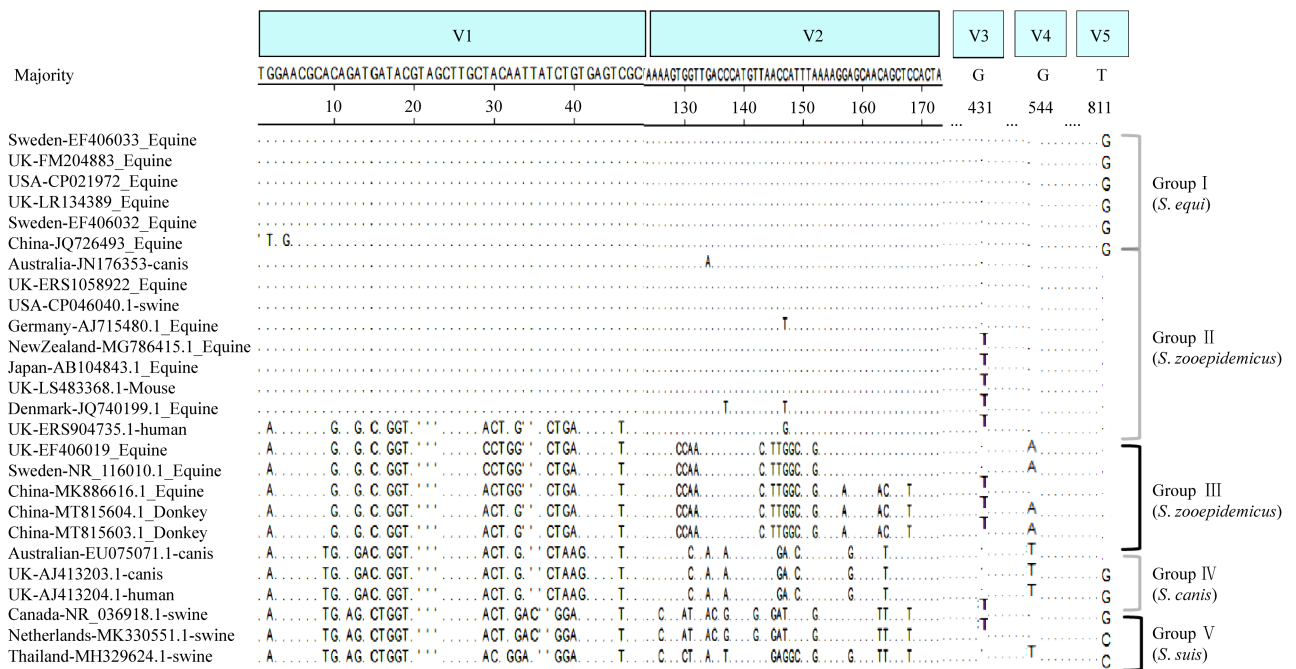


图 2 分离菌株及参考菌株 16S rRNA 基因可变区序列比对

Figure 2 Sequence alignment of 16S rRNA gene variable region of isolates.

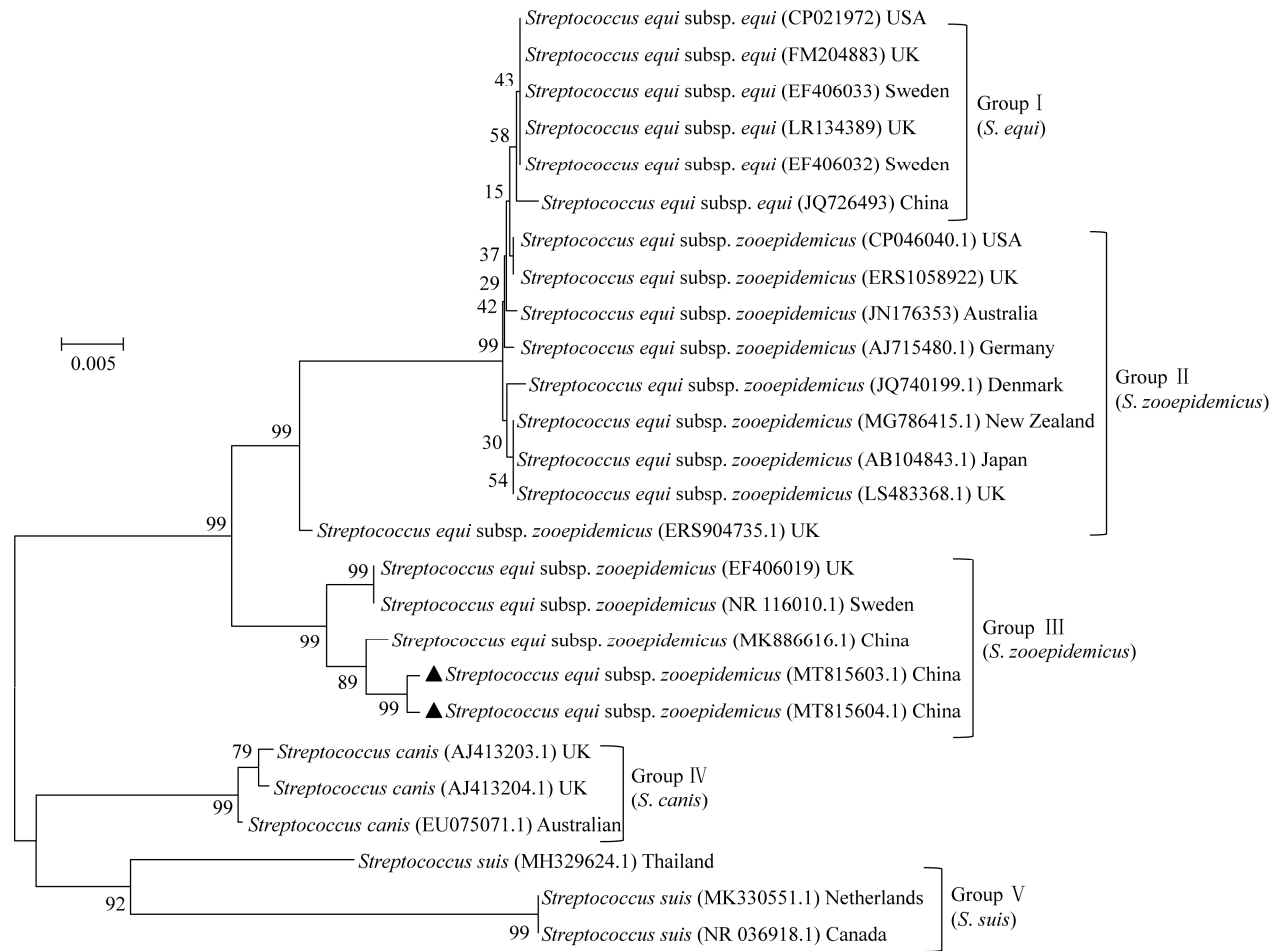


图 3 16S rRNA 基因的系统发育树

Figure 3 Phylogenetic tree based on 16S rRNA sequences.

2.5 分离株 *SeM* 基因序列系统发育树分析

以分离菌株 HT111、HT321 的基因组 DNA 为模板,对 *SeM* 基因进行 PCR 扩增。对分离株与 34 个国外及国内分离株 *SeM* 基因构建系统发育树并从流行区域、年份、宿主层面分析,流行地区分析的结果显示 2 个分离菌与美国分离株、德国分离株和英国分离株亲缘关系较近,流行年份分析结果显示 2 株分离菌与 2013 年美国分离株、2019 年德国分离株及 2015 年英国菌株亲缘关系较近,宿主方面分析结果表明本次驴源分离株与美国马源分离株、德国马源分离株及英国马源分离株亲缘关系较近(图 4)。

2.6 分离菌株的 MLST 分型结果

以分离菌株 HT111、HT321 基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增 7 个管家基因(*arcC*、*nrdE*、*pros*、*spi*、*tdk*、*tpi*、*yqiL*)。2 株分离菌的管家基因测序后得到等位基因号鉴定 HT111 为 ST179 型,HT321 为 ST420 型(表 3),后者为新发现基因型。根据 BioNumerics 对管家基因构建的最小生成树(图 5),分析结果显示新的 ST420 (HT321)型与 ST356 遗传距离较近,与其他 ST 型无进化关系。ST179 (HT111)则与 ST395、ST396、ST151、ST402、ST281、ST282、ST283、ST325 型 8 种 ST 型有进化关系,且遗传距离较近。

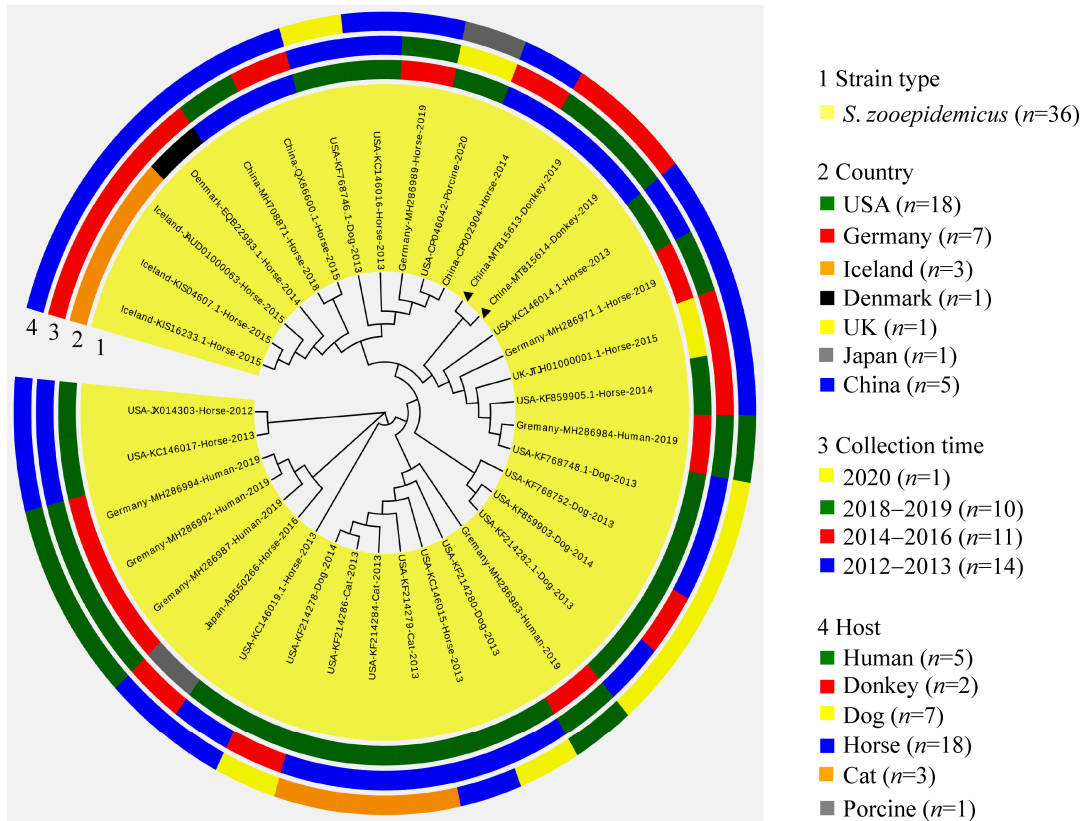


图 4 分离菌株 *SeM* 进化树分析(▲代表分离菌株)
Figure 4 Phylogenetic tree of *SeM* gene of isolates (▲ Isolates).

表 3 分离菌株的看家基因谱及 ST 型
Table 3 House keeping genes and ST types of isolates

Strains	<i>yqil</i>	<i>arcC</i>	<i>nrdE</i>	<i>pros</i>	<i>spi</i>	<i>tdk</i>	<i>tpi</i>	ST
HT111	45	45	45	45	45	45	45	179
HT321	12	12	64	10	45	22	49	420

3 讨论

马腺疫作为马属动物的常发传染病之一，在世界范围内流行。近年来，随着国内马养殖业的快速发展，马腺疫的感染呈逐年上升趋势，已造成严重经济损失。马链球菌兽疫亚种是该病的重要病原之一，拥有广泛的宿主种类，是一种重要人畜共患病病原菌^[19-20]。研究结果表明，马链球菌兽疫亚种可在马和犬、马和猫，

以及人和犬之间传播^[2,4,21]，其引起的感染在欧美等地多发生于马、奶牛、犬等动物，而中国主要在猪群中常见^[22]，还可引起马和人之间传播^[6,23]。朱曼玲等对山东某驴场发生的驴腺疫进行了诊断，通过生化反应和 16S rRNA 方法鉴定病原为驴源马链球菌兽疫亚种^[24]。目前国内外均未见驴源马链球菌兽疫亚种的感染病例报道，且我国对该菌在马属动物中的流行情况的调查较少，流行病学资料较为匮乏。

本研究对 2 株新疆地区驴场采集到驴腺疫发病驴颌下组织分离到的 *SeZ* 分离株 HT111、HT321 进行了鉴定和 *SeM* 分析。*SeM* 是马链球菌兽疫亚种和马链球菌兽疫亚种菌体表面的一种重要毒力因子和保护性抗原。进化过程中，在外界环境及机体免疫的选择压力作用下，*SeM*

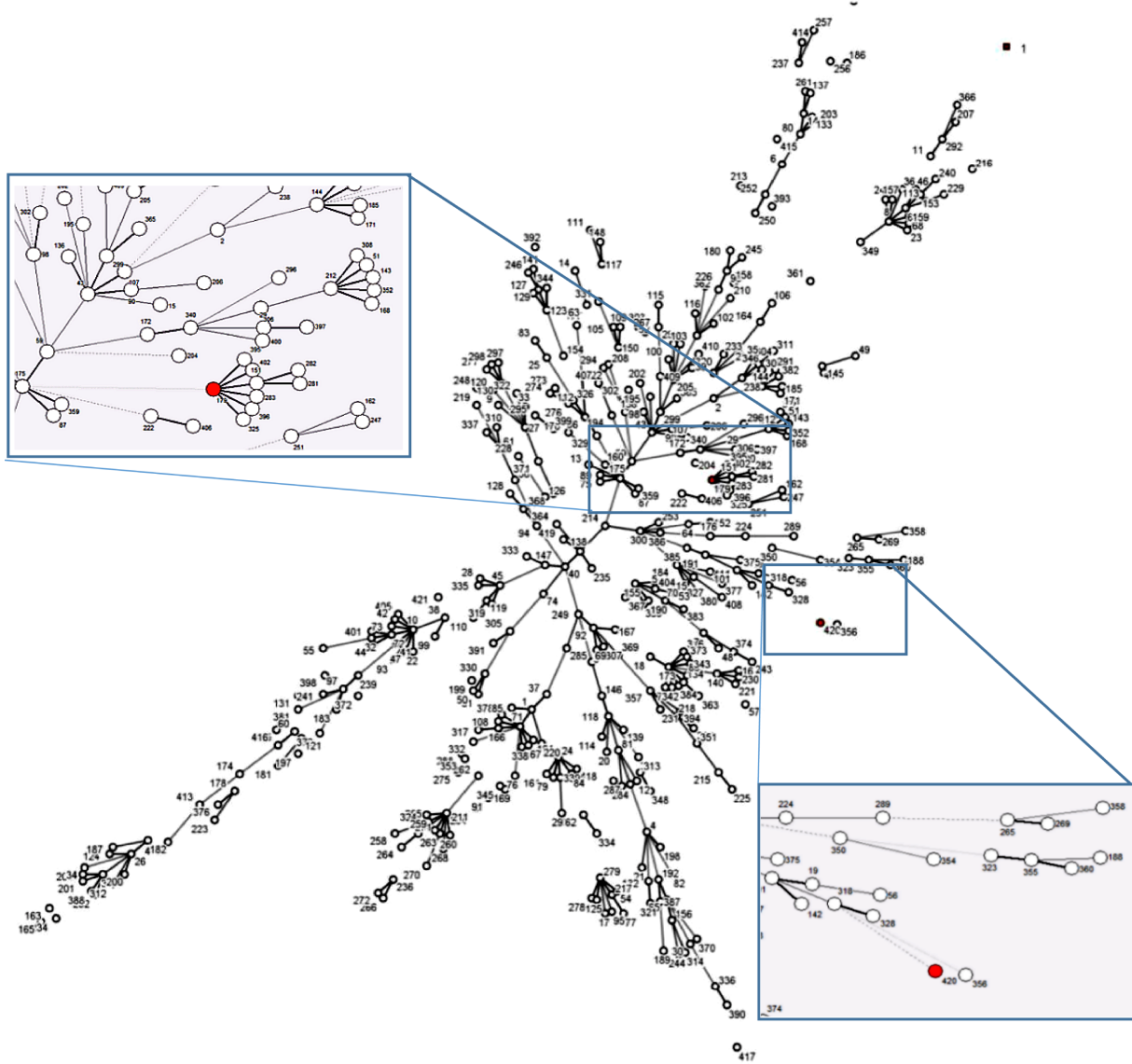


图 5 根据马链球菌数据库构建的 ST 型最小生成树

Figure 5 Clustering tree of ST based on *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* database.

蛋白 N 端第 106–166 位氨基酸被认为是其高变区，往往以一定频率发生变异并表现出序列多样性^[25]。研究表明，不同动物源菌株之间序列变异较大，且不同地域分离的菌株其 *SeM* 序列也存在明显差异。目前认为 *SeM* 基因的变化能代表马链球菌兽疫亚种的进化规律和趋势^[26]。Ivens 等通过对马源马链球菌马亚种 *SeM* 基因分析得出马匹进口可对马腺疫的流行和传播产

生重要的影响^[27]。冯凯等对 2018 年新疆地区马源 *SeZ* 流行株与国外分离株进行 *SeM* 基因的比较分析，发现 ZMSY15-1 分离株与美国马源株 NH55426 亲缘关系最近，而美国马源分离株与犬源分离株有一定的亲缘关系^[28]。

本研究对 2 株分离菌 *SeM* 基因分析的结果显示，分离菌株与 2013 年在美国分离的马源马链球菌兽疫亚种 KC1460141、德国 2019 年

检出的马源马链球菌兽疫亚种 MH2869711 及英国 2015 年检出的马源马链球菌兽疫亚种 JTJH010000011 亲缘关系较近, 而与其他地区分离菌株都较远; 分离菌株独自形成一支。新疆地区之前报道了驴源、马源马链球菌马亚种及马源马链球菌兽疫亚种^[15-17,19]。本次对 *SeM* 基因分析的结果还发现, 2 株驴源分离株与国内新疆地区 2018 年检出的马源马链球菌兽疫亚种分离株 MH708871 (ZMSY15-1)、国内 2015 年检出的马源马链球菌兽疫亚种分离株 QX666001 及国内 2014 年检出的马源马链球菌兽疫亚种分离株 CP002904 亲缘关系较远, 这一现象可能与不同时间马匹的跨区转运和该菌在宿主体内的进化有关^[20]。

16S rRNA 基因序列的遗传变异在 V1-V2 区变化最为明显^[7], 为了更全面地了解其可变区的变化, 本研究还对 V3-V5 变异区域进行了分析。可将分析菌株分为 5 组, 马链球菌兽疫亚种占据了其中的 2 组 (II 群和 III 群)。Preziuso 等的研究认为, 对 *SeZ* 16S rRNA 基因可变区的分析有利于分析该菌的流行特点^[8]。*SeZ* 主要分布于第 II、III 群, 在 V1、V2 区有着 3 种变化, 而在 V3-V5 区差异较小。本研究中 2 株驴源 *SeZ* 分离株属于 III 群, 该群菌株与 II 群菌株具有可在多种动物中进行传播的特点, 而 II 群菌株多在人和马之间传播, 该结果与 Preziuso 等的研究相似^[8]。

MLST 分型法可反映出微生物的进化生物学, 已被广泛用于微生物传播和种群动态的研究中^[29]。该法已成功用于揭示马链球菌马亚种和兽疫亚种的进化关系^[30], 且目前已成为研究 *SeZ* 基因分型和遗传进化的常用技术^[31]。Acke 等对英国不同养殖场应用 MLST 法分析得到 *SeZ* 在犬群中流行的基因型主要为 ST39、ST294 和 ST296^[2], 该研究团队又在 2017 年对

冰岛流行的 257 株马源及人源马链球菌兽疫亚种进行 MLST 分析后, 认为 ST-209 为主要的流行基因型, 该型菌株可在病人及患马中检出, 具有重要的公共卫生意义^[32]。Gruszynski 等从豚鼠检测到 ST194 *SeZ* 菌株, 该研究还发现该基因型与人源菌株和国内猪源 *SeZ* 为同一基因型^[33]。Bisgaard 等从患鸡体内检出了禽源马链球菌兽疫亚种 ST173 和 ST280, 并发现禽源 ST208 来源于马源菌株^[3]。本研究检出驴源马链球菌兽疫亚种 ST179 和 ST420, 且 ST420 为驴源新基因型。推测本次驴源 ST179 来源于以往流行的马源 ST179, 该结果与本研究中对 *SeM* 分析的结果一致。

本研究首次报道了我国驴源马链球菌兽疫亚种, 并鉴定了该菌新的 ST 型。试验分离出的 2 个 ST 型分别为 ST179 和 ST420, 其中 ST420 为新基因型, 且与其他 ST 型亲缘关系较远; ST179 主要分布在大洋洲、欧洲和北美洲等地区。根据 MSLT 数据库显示, 兽疫链球菌 ST420 型在亚洲地区未见病例报道, 这一结果的发现填补了我国相关数据的空白。新疆地区驴源马链球菌兽疫亚种多型共存的情况, 使得驴源疫病的防控治疗难度加大。

参考文献

- [1] Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 2016, 33(7): 1870-1874.
- [2] Acke E, Midwinter AC, Lawrence K, Gordon S, Moore S, Rasiah I, Steward K, French N, Waller A. Prevalence of *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisililis* and *S. equi* subsp. *zooepidemicus* in a sample of healthy dogs, cats and horses. *New Zealand Veterinary Journal*, 2015, 63(5): 265-271.
- [3] Bisgaard M, Bojesen AM, Petersen MR, Christensen H. A major outbreak of *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* infections in free-range chickens is

- linked to horses. *Avian Diseases Digest*, 2012, 7(3): e49–e50.
- [4] Gruszczyski K, Young A, Levine SJ, Garvin JP, Brown S, Turner L, Fritzinger A, Gertz RE Jr, Murphy JM, Vogt M, Beall B. *Streptococcus equi* subsp. *zooeidemicus* infections associated with guinea pigs. *Emerging Infectious Diseases*, 2015, 21(1): 156–158.
- [5] Salasias SIO, Wibawan IWT, Pasaribu FH, Abdulmawjood A, Lammler C. Persistent occurrence of a single *Streptococcus equi* subsp. *zooeidemicus* clone in the pig and monkey population in Indonesia. *Journal of Veterinary Science*, 2004, 5(3): 263.
- [6] Pelkonen S, Lindahl SB, Suomala P, Karhukorpi J, Vuorinen S, Koivula I, Väisänen T, Pentikäinen J, Autio T, Tuuminen T. Transmission of *Streptococcus equi* subspecies *zooeidemicus* infection from horses to humans. *Emerging Infectious Diseases*, 2013, 19(7): 1041–1048.
- [7] Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 1991, 173(2): 697–703.
- [8] Preziuso S, Moriconi M, Cuteri V. Genetic diversity of *Streptococcus equi* subsp. *zooeidemicus* isolated from horses. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 2019, 6: 7–13.
- [9] Waller AS, Robinson C. *Streptococcus zooeidemicus* and *Streptococcus equi* evolution: the role of CRISPRs. *Biochemical Society Transactions*, 2013, 41(6): 1437–1443.
- [10] Timoney JF, DeNegri R, Sheoran A, Forster N. Affects of N-terminal variation in the SeM protein of *Streptococcus equi* on antibody and fibrinogen binding. *Vaccine*, 2010, 28(6): 1522–1527.
- [11] Harris SR, Robinson C, Steward KF, Webb KS, Paillot R, Parkhill J, Holden MTG, Waller AS. Genome specialization and decay of the strangles pathogen, *Streptococcus equi*, is driven by persistent infection. *BioRxiv*, 2015. DOI: 10.1101/014118.
- [12] Libardoni F, Vielmo A, Farias L, Matter LB, Pötter L, Spilki FR, Vargas AC. Diversity of *seM* gene in *Streptococcus equi* subsp. *equi* isolated from strangles outbreaks. *Veterinary Microbiology*, 2013, 162(2/3/4): 663–669.
- [13] Walker JA, Timoney JF. Molecular basis of variation in protective SzP proteins of *Streptococcus equi* subsp. *zooeidemicus*. *American Journal of Veterinary Research*, 1998, 59(9): 1129–1133.
- [14] Hamilton A, Robinson C, Sutcliffe IC, Slater J, Maskell DJ, Davis-Poynter N, Smith K, Waller A, Harrington DJ. Mutation of the maturase lipoprotein attenuates the virulence of *Streptococcus equi* to a greater extent than does loss of general lipoprotein lipidation. *Infection and Immunity*, 2006, 74(12): 6907–6919.
- [15] 郑礼杰, 李欣霖, 张文, 陈建国, 谈忠鸣, 许金凤. 1例引起突发性耳聋的猪链球菌的鉴定及分子流行病学分析. *国际检验医学杂志*, 2020, 41(17): 2150–2154.
- Zheng LJ, Li XL, Zhang W, Chen JG, Tan ZM, Xu JF. Identification and molecular epidemiological analysis of *Streptococcus suis* in a case of sudden deafness. *International Journal of Laboratory Medicine*, 2020, 41(17): 2150–2154. (in Chinese)
- [16] 朱乐欣, 张立加, 蒋小武. 一株 ST638 新型猪链球菌的分离鉴定及其毒力检测. *南昌师范学院学报*, 2019, 40(6): 28–31.
- Zhu LX, Zhang LJ, Jiang XW. Isolation, identification and virulence assessment of a new sequence type ST638 strain of *Streptococcus suis*. *Journal of Nanchang Normal University*, 2019, 40(6): 28–31. (in Chinese)
- [17] 张燎原, 陈章, 汪清峰, 王玮, 孙裴, 魏建忠, 李郁. 猪链球菌 2 型安徽分离株多位点序列分型与毒力特征研究. *中国预防兽医学报*, 2019, 41(2): 118–124.
- Zhang LY, Chen Z, Wang QF, Wang W, Sun P, Wei JZ, Li Y. Study on multilocus sequence typing and virulence characteristics of clinical *Streptococcus suis* type 2 isolated from Anhui Province. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2019, 41(2): 118–124. (in Chinese)
- [18] Sinclair CG. Bergey's manual of determinative bacteriology. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1939(6): 605–606.
- [19] Liang HH, Tang B, Zhao PP, Deng MY, Yan LL, Zhai P, Wei ZG. Identification and characterization of a novel protective antigen, Sec_205 of *Streptococcus equi* ssp. *zooeidemicus*. *Vaccine*, 2018, 36(6): 788–793.
- [20] Watson JR, Leber A, Velineni S, Timoney JF, Ardura MI. Recurrent *Streptococcus equi* subsp. *zooeidemicus* bacteremia in an infant. *Journal of Clinical Microbiology*, 2015, 53(9): 3096–3099.
- [21] Steward KF, Robinson C, Holden MTG, Harris SR, Ros AF, Perez GC, Baselga R, Waller AS. Diversity of *Streptococcus equi* subsp. *zooeidemicus* strains isolated from the Spanish sheep and goat population

- and the identification, function and prevalence of a novel arbutin utilisation system. *Veterinary Microbiology*, 2017, 207(7): 231–238.
- [22] Zhang SH, Wang YK, Liu PH, Shen SF, Shen LP, Wang J. Identification of swine *Streptococcus* isolates in Shanghai. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2001, 21(1): 42–46.
- [23] Sigríður B, Simon RH, Vilhjólmur S, Eggert G, íóáÓlof GS, Kristina G, Karen FS, Richard N, Carl R, Amelia RC, Julian P, Matthew TH, Andrew SW, Mark JW, Gary MD. Genomic dissection of an icelandic epidemic of respiratory disease in horses and associated zoonotic cases. *American Society for Microbiology*, 2017, 8(4): e00826-17.
- [24] 朱曼玲, 齐鹏飞, 黄迪海, 王长法, 张燕, 张伟. 驴源马腺疫链球菌的分离与鉴定. *中国动物检疫*, 2020, 37(1): 83–86.
- Zhu ML, Qi PF, Huang DH, Wang CF, Zhang Y, Zhang W. Isolation and identification of donkey-derived *Streptococcus equinus*. *China Animal Health Inspection*, 2020, 37(1): 83–86. (in Chinese)
- [25] Timoney JF, Walker J, Zhou M, Ding J. Cloning and sequence analysis of a protective M-like protein gene from *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*. *Infection and Immunity*, 1995, 63(4): 1440–1445.
- [26] Lindahl S, Soderlund R, Frosth S, Pringle J, Baverud V, Aspan A. Tracing outbreaks of *Streptococcus equi* infection (strangles) in horses using sequence variation in the *seM* gene and pulsed-field gel electrophoresis. *Veterinary Microbiology*, 2011, 153(1/2): 144–149.
- [27] Ivens PAS, Matthews D, Webb K, Newton JR, Steward K, Waller AS, Robinson C, Slater JD. Molecular characterisation of ‘strangles’ outbreaks in the UK: the use of M-protein typing of *Streptococcus equi* ssp. *equi*. *Equine Veterinary Journal*, 2011, 43(3): 359–364.
- [28] 冯凯, 王浩, 周婷婷, 马晓慧, 恩克·博力德, 余明江, 苏艳. 马源马链球菌兽疫亚种新疆株的分离鉴定及遗传特性分析. *中国畜牧兽医*, 2019, 46(1): 231–238.
- Feng K, Wang H, Zhou TT, Ma XH, ENKe B, She MJ, Su Y. Isolation, identification and genetic characterization analysis of *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* from horse in Xinjiang. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2019, 46(1): 231–238. (in Chinese)
- [29] Britton AP, Blum SE, Legge C, Sojony K, Zabek EN. Multi-locus sequence typing of *Streptococcus equi* subspecies *zooepidemicus* strains isolated from cats. *The Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2018, 30(1): 126–129.
- [30] Holden MTG, Heather Z, Paillot R, Steward KF, Webb K, Ainslie F, Jourdan T, Bason NC, Holroyd NE, Mungall K, Quail MA, Sanders M, Simmonds M, Willey D, Brooks K, Aanensen DM, Spratt BG, Jolley KA, Maiden MCJ, Kehoe M, Chanter N, Bentley SD, Robinson C, Maskell DJ, Parkhill J, Waller AS. Genomic evidence for the evolution of *Streptococcus equi*: host restriction, increased virulence, and genetic exchange with human pathogens. *PLoS Pathogens*, 2009, 5(3): e1000346.
- [31] Webb K, Jolley KA, Mitchell Z, Robinson C, Newton JR, Maiden MCJ, Waller A. Development of an unambiguous and discriminatory multilocus sequence typing scheme for the *Streptococcus zooepidemicus* group. *Microbiology: Reading England*, 2008, 154(Pt 10): 3016–3024.
- [32] Björnsdóttir S, Harris SR, Svansson V, Gunnarsson E, Sigurðardóttir OG, Gammeljord K, Steward KF, Richard Newton J, Robinson C, Charbonneau ARL, Parkhill J, Holden MTG, Waller AS. Genomic dissection of an Icelandic epidemic of equine respiratory disease in horses and associated zoonotic cases. *BioRxiv*, 2016. DOI: 10.1101/059949.
- [33] Gruszynski K, Young A, Levine SJ, Garvin JP, Brown S, Turner L, Fritzinger A, Gertz RE Jr, Murphy JM, Vogt M, Beall B. *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* infections associated with Guinea pigs. *Emerging Infectious Diseases*, 2015, 21(1): 156–158.

(本文责编 张晓丽)