



研究报告

马源马链球菌兽疫亚种 3 株新疆分离株基因型的鉴定及 MLST 分析

张泽华 张欢 汪丽 古丽米热·对山巴依 吕芬芬 蒲小峰 张宝江 苏艳*

新疆农业大学动物医学学院 新疆 乌鲁木齐 830052

摘要:【背景】马链球菌兽疫亚种(*Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*, SeZ)是引起马腺疫的主要病原,还可引起猪链球菌病,加强该菌的地方株分子流行病学监测对有效防控相关疫病十分必要。

【目的】对新疆地区 2 个马场 SeZ 分离株进行鉴定和药敏特性分析,并分析 3 株新疆分离株的分子流行与菌株的遗传进化特征。【方法】对分离纯化的 3 株病原菌(ZHZ113、ZHZ211 和 ZHZ523)进行染色观察、生化及药敏特性检测,对 16S rRNA 和 *SeM* 基因进行遗传进化分析,以链球菌 7 个管家基因 *arcC*、*nrdE*、*proS*、*spi*、*tdk*、*tpi* 和 *yqiL* 为目的基因对 3 株分离菌进行多位点序列分型(Multilocus Sequence Typing, MLST)研究。【结果】3 株 SeZ 的药敏结果显示这 3 株分离菌对不同抗生素的耐药程度不同,但均对头孢西丁、庆大霉素、链霉素、红霉素、左氧氟沙星、环丙沙星、土霉素等 11 种药物敏感。16S rRNA 基因序列分析显示这 3 株分离菌均属于 II 群(兽疫链球菌)。3 株菌的 MLST 分型结果分别为 ST39、ST419、ST421 型,其中 ST419 和 ST421 型为 SeZ 目前尚未见报道的新 ST 型。*SeM* 基因分析结果显示马源 SeZ 在不同国家、不同动物和不同时间段上的流行分布存在差异和动态变化的特点。【结论】3 株 SeZ 分离菌分别与美国犬源及马源菌株亲缘关系较近,反映部分 SeZ 株在新疆地区的基因型分布及分子流行特点。

关键词: 马链球菌兽疫亚种, 16S rRNA 基因, *SeM* 基因, 多位点序列分型, 药敏特性

Identification and MLST analysis of three novel genotypes of *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* Xinjiang strains

ZHANG Zehua ZHANG Huan WANG Li Gulimire·Duishanbayi LÜ Fenfen
PU Xiaofeng ZHANG Baojiang SU Yan*

College of Veterinary Medicine, Xinjiang Agricultural University, Urumqi, Xinjiang 830052, China

Abstract: [Background] *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* (SeZ) not only causes swine *Streptococcus* disease, but also is an important pathogen that causes strangles. Strangle poses a serious threat to the development of horse and donkey industry in China and it is of great significance to strengthen the molecular epidemiological monitoring of the local SeZ isolates for effective prevention and control of strangle. [Objective] To identify the bacteria and detect drug susceptibility, samples were

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (U1803108)

*Corresponding author: E-mail: 2006au@163.com

Received: 12-04-2021; Accepted: 20-05-2021; Published online: 21-07-2021

基金项目: 国家自然科学基金(U1803108)

*通信作者: E-mail: 2006au@163.com

收稿日期: 2021-04-12; 接受日期: 2021-05-20; 网络首发日期: 2021-07-21

collected from horse farms in Xinjiang. Molecular epidemic and genetic evolution characteristics of the three endemic isolates were also analyzed. **[Methods]** Isolation and identification, physiological and biochemical test, drug sensitivity test of 3 isolates (ZH113, ZHZ211 and ZHZ523), genetic evolution analysis of 16S rRNA and *SeM* genes were performed. Seven housekeeping genes (*arcC*, *nrdE*, *proS*, *spi*, *tdk*, *tpi*, *yqiL*) of 3 isolates were amplified and analyzed through multilocus sequence typing (MLST). **[Results]** Drug sensitivity results showed that all the three isolates were sensitive to 11 drugs like cefuroxime, ceftiofur, gentamicin, streptomycin, erythromycin, doxycycline, levofloxacin, ciprofloxacin, rifampicin, clindamycin and oxytetracycline. The 16S rRNA gene sequence analysis showed that these three isolates belonged to group II (*Streptococcus zooepidemicus*). The MLST results showed that 3 sequence types ST39, ST419 and ST421 were found and ST419 and ST421 were identified as novel ST genotypes, which have not been reported. From the analysis of *SeM* gene sequence and the phylogenetic tree we found that there are variations and dynamic changes in the strangles epidemic distribution from the point of view of different countries, different animals and different time. **[Conclusion]** This study showed that the 3 isolates were closely related to American canine and horse strains and the results provide valuable information to understand the genotype distribution and molecular epidemic characteristics of SeZ in Xinjiang.

Keywords: *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*, 16S rRNA gene, *SeM* gene, multilocus sequence typing (MLST), microbial susceptibility

马链球菌兽疫亚种(*Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*, SeZ)是一种人畜共患的条件致病性链球菌, 属 C 群链球菌成员^[1-2], 可感染人及多种动物, 包括马、驴、猪、犬、猫、牛、羊、鸡等^[3-5]。我国报道了由该菌感染马引起马腺疫和感染猪引起猪链球菌病的病例^[6-7], 给养马业和养猪业均造成了巨大的经济损失。马腺疫被认为是世界范围内最常见的马属动物呼吸道传染病之一^[8-9], 英国每年报道有 600 多起暴发病例, 幼驹往往有较高的死亡率^[10]。国内关于 SeZ 的研究报道多见于猪源与人源^[11]。

多位点序列分型(Multilocus Sequence Typing, MLST)是一种近年来被广泛应用的高分辨率分子分型方法, 基于核酸序列测定和管家基因的序列多态性, 通过管家基因的不同序列号组合决定序列型(Sequence Type, ST)。该法具有分辨率高、重复性好和操作简单等优势^[12]。该法可反映细菌的群体变异和进化特点, 有助于分子流行病学监测和微生物分型、进化的研究^[13]。此外, MLST 数据库能通过互联网将各个实验室的研究成果进行比较, 更有利于分子流行病学的研究^[14]。

类 M 蛋白作为 SeZ 重要的毒力因子和主要保护性抗原^[15], 其 N 端多变区可以被用作分析菌株来源

和分子流行病学的重要指标^[16-18]。然而 16S rRNA 基因由于进化缓慢, 常被用来鉴定细菌种类, 研究表明根据其 V1 和 V2 可变区的变异可分析 SeZ 的进化规律^[19]。

了解马源兽疫链球菌的临床分离株对常用药物的敏感性, 掌握致病菌株基因型的流行分布和进化特征, 对有效防控 SeZ 感染引发的马腺疫具有重要意义。本研究针对 3 株 SeZ 新疆分离株进行了耐药特性检测, 采用 PCR 技术扩增 *SeM*、16S rRNA 及 MLST 分析相关基因, 并进行进化分析, 以期丰富马源兽疫链球菌流行病学资料和防治奠定基础。

1 材料与方法

1.1 样品采集

从新疆伊犁地区 2 个不同规模化养殖的马场无菌采集发病马颌下淋巴结渗出物和鼻拭子样品, 采集 A 马场不同马匹样品 12 份和 B 马场不同马匹样品 15 份。

1.2 主要试剂和仪器

基因组提取试剂盒、胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司产品; DL2000 DNA Marker、*Taq* DNA 聚合酶, 宝生物工

程(大连)有限公司;肉汤培养基、LB 培养基、琼脂粉、血琼脂培养基、MH 琼脂培养基、细菌微量生化反应管、药敏试纸,杭州滨合微生物试剂有限公司。PCR 仪和凝胶成像系统, Bio-Rad 公司;全自动高压灭菌器,上海博讯生物有限公司。

1.3 PCR 扩增引物

PCR 引物见表 1,引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.4 细菌的分离培养与染色

采集的样品接种于血琼脂培养基,37 °C 培养 20 h 后,挑取单菌落进行纯化培养,观察菌落形态,并进行革兰氏染色鉴定,显微镜观察染色特性及形态特征。

1.5 细菌的生化特性

挑取单菌落于 LB 液体培养基中,37 °C、150 r/min 培养 20 h,吸取菌液 20 μL 加入微量生化反应管中,37 °C 培养 18–24 h,记录分离菌对吡咯烷酮、精氨酸、二苯基胂、七叶苷、蕈糖、蔗糖、山梨醇等 17 项生化反应的结果。

1.6 药敏试验

采用纸片扩散法,用药敏试纸蘸取稀释好的药品,检测分离菌对 21 种抗生素(阿莫西林、氨苄

西林、头孢呋辛、头孢噻吩、头孢西丁、青霉素、庆大霉素、链霉素、红霉素、克拉霉素、多西环素、左氧氟沙星、诺氟沙星、恩诺沙星、环丙沙星、磺胺异恶唑、磺胺嘧啶钠、利福平、克林霉素、土霉素、四环素)的敏感性。将菌液均匀涂布到 MH 琼脂培养基上,再将药敏纸片贴在培养基表面,37 °C 培养后测量抑菌圈的直径,根据临床和实验室标准化委员会判定标准判定药敏结果^[20]。

1.7 16S rRNA 基因和 *SeM* 基因的 PCR 扩增与序列分析

挑取 *SeZ* 分离株的单菌落接种至肉汤培养基,37 °C、200 r/min 培养 18 h 后,4 000 r/min 离心 2 min 收集菌体,用试剂盒提取细菌基因组 DNA。PCR 引物序列见表 1。16S rRNA 基因与 *SeM* 基因的 PCR 反应体系(25 μL): *Taq* Mix 12.5 μL, ddH₂O 9.5 μL,上、下游引物(50 μmol/L)各 1 μL,模板 1 μL。16S rRNA 基因的 PCR 反应条件:95 °C 5 min;95 °C 30 s,56 °C 30 s,72 °C 90 s,35 个循环;72 °C 10 min。*SeM* 基因的 PCR 反应条件:95 °C 5 min;94 °C 30 s,45 °C 45 s,72 °C 105 s,35 个循环;72 °C 10 min。PCR 扩增产物经电泳检测后,回收目的片段并测序。

表 1 本研究使用的引物

Table 1 Primers used in this study

基因名称	引物序列	退火温度	产物长度
Gene name	Primers sequence (5'→3')	Annealing temperature (°C)	Product length (bp)
16S rRNA	F: AGAGTTTGATCCTGGCTCA R: ACCTGTCACCCGATGTACC	56	1 000
<i>SeM</i>	F: TCTTTGCGTTTAGGAGACA R: AGCATCAGAAAATAAGT	45	1 600
<i>arcC</i>	F: AGCCATCTACCGACTAACAC R: TCTGAAAGGGTTTGGCTAGC	54	437
<i>nrdE</i>	F: TTCTCCTTCAGGTGACAGATG R: AGACTAGGCGTTTGAACCTG	54	448
<i>proS</i>	F: TTGGTTGGAAATGACCAGATC R: CCTGATCCTTGACATTAACGG	53	435
<i>spi</i>	F: CTTAGAGCATTGCGCTAAGC R: TTGCCTGCTATCTAGGGAAG	54	459
<i>tdk</i>	F: GAATTCAGGAAAAGACCATTG R: TAATGCTTGCGACAAACTGG	50	370
<i>tpi</i>	F: GGCAGTAGTAAGCAAATTACC R: AGCAAGGCAAGGAAGCTATC	53	424
<i>yqiL</i>	F: CCACATGGGAATTACAGCAG R: TCAATACAGACGTCCCTTGA	55	396

将分离菌的 16S rRNA 基因序列和 *SeM* 基因序列分别与 GenBank 中马链球菌相关参考菌株的相应序列进行比对, 并用 MEGA 软件构建系统进化树。

1.8 管家基因的 PCR 扩增及 MLST 分型

分别以分离菌株基因组为模板, 采用 7 个管家基因 *arcC*、*nrdE*、*proS*、*spi*、*tdk*、*tpi* 和 *yqiL* 的引物(表 1)进行 PCR 扩增及电泳检测。PCR 反应体系同 1.7。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 退火温度见表 1, 退火 45 s, 72 °C 35 s, 33 个循环; 72 °C 10 min。PCR 扩增产物检测后回收测序, 所得测序序列经 MLST 数据库(<https://pubmlst.org/szooepidemicus>)获得等位基因的序号, 并确定 3 个分离菌株的序列型(Sequence Type, ST), 然后应用 BioNumerics 软件对分离菌及库中马链球菌兽疫亚种参考菌株构建 ST 型最小生成树(Minimum Spanning Tree)。

2 结果与分析

2.1 分离培养与染色结果

分离菌(ZHZ113、ZHZ211 和 ZHZ523)在鲜血琼脂培养基上恒温培养后, 长出具有 β 溶血、透明或白色的菌落(图 1A)。革兰氏染色后镜下可观察到单个或成短链状分布的革兰氏阳性球菌(图 1B)。

2.2 生化试验结果

3 株分离菌(ZHZ113、ZHZ211 和 ZHZ523)的生化反应结果与文献[21]中关于马链球菌兽疫亚种的结果相似, 分离菌株的生化反应结果见表 2。

2.3 药敏试验结果

药敏试验结果显示 3 株分离菌(ZHZ113、ZHZ211 和 ZHZ523)对 21 种抗菌药物的敏感性有差异, 3 株菌均对青霉素耐药, 对 21 种抗生素中的 11 种(头孢噻唑、头孢西丁、庆大霉素、链霉素、红霉素、多西环素、左氧氟沙星、环丙沙星、利福平、克林霉素、土霉素)敏感(表 3)。

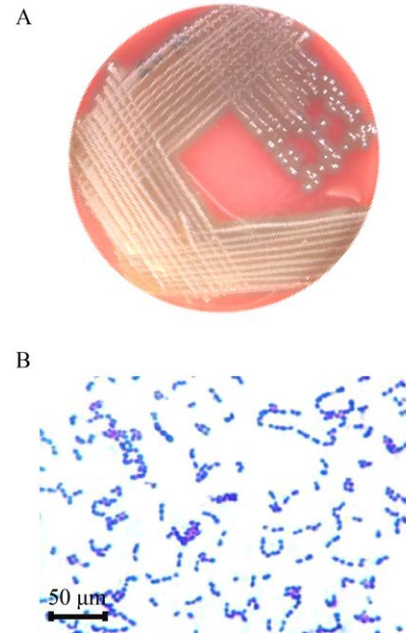


图 1 分离菌的菌落形态及镜下革兰氏染色形态 (1 000×)

Figure 1 Colony morphology and Gram staining morphology of the isolate (1 000×)

注: A: 菌落形态; B: 革兰氏染色形态

Note: A: Colony morphology; B: Gram staining morphology

表 2 生化鉴定结果

Table 2 Biochemical test results

项目 Items	菌株 Strains		
	ZHZ113	ZHZ211	ZHZ523
吡咯烷酮 PYRA	+	+	+
精氨酸 ADH	-	+	+
二苯基膦 DPP	-	-	-
甲基丙烯酰基 PMG	+	+	-
七叶苷 ESC	-	-	-
髓磷脂连接糖 MAG	+	+	+
曲美他嗪 TMZ	+	-	+
蕈糖 TRE	+	+	+
蔗糖 SUC	+	+	+
山梨醇 SOR	+	+	+
葡磷 VP-MR	-	-	-
溶血 Hemolysis	+	+	+

注: +: 阳性; -: 阴性

Note: +: Positive; -: Negative

表 3 药敏试验结果

Table 3 Microbial susceptibility test results

药物 Drugs	敏感性 Sensitivity		
	ZHZ113	ZHZ211	ZHZ523
阿莫西林 Amoxicilin	R	S	I
氨苄西林 Ampicillin	R	I	R
头孢呋辛 Cefuroxime	R	I	R
头孢噻吩 Cefotiofur	S	S	S
头孢西丁 Cefoxitin	S	S	S
青霉素 Penicillin	R	R	R
庆大霉素 Gentamicin	S	S	S
链霉素 Streptomycin	S	S	S
红霉素 Erythromycin	S	S	S
克拉霉素 Clarithromycin	I	I	I
多西环素 Doxycycline	S	S	S
左氧氟沙星 Levofloxacin	S	S	S
诺氟沙星 Norfloxacin	R	S	S
恩诺沙星 Enrofloxacin	R	R	S
环丙沙星 Ciprofloxacin	S	S	S
磺胺异恶唑 Sulfafurazole	R	R	S
磺胺嘧啶钠 Sulfadiazine sodium	I	R	R
利福平 Rifampin	S	S	S
克林霉素 Clindamycin	S	S	S
土霉素 Oxytetracycline	S	S	S
四环素 Tetracycline	I	S	S

注: S: 敏感; R: 耐药; I: 中介

Note: S: Susceptible; R: Resistant; I: Intermediate

2.4 细菌 16S rRNA 基因扩增及序列分析

以分离菌基因组 DNA 为模板 PCR 扩增 16S rRNA 基因, 然后将分离菌与马链球菌相关参考菌株的 16S rRNA 基因进行序列比对(图 2)并构建系统发育树(图 3), 发现可分成 5 个群(Group I、Group II、Group III、Group IV、Group V), 3 株分离菌(ZHZ113、ZHZ211 和 ZHZ523)归属于 II 群(马链球菌兽疫亚种)。分离菌与英国分离株

LR594033、中国分离株 JQ726499 和韩国分离株 MN267505 亲缘关系最近。

2.5 分离菌的 *SeM* 基因扩增及序列分析

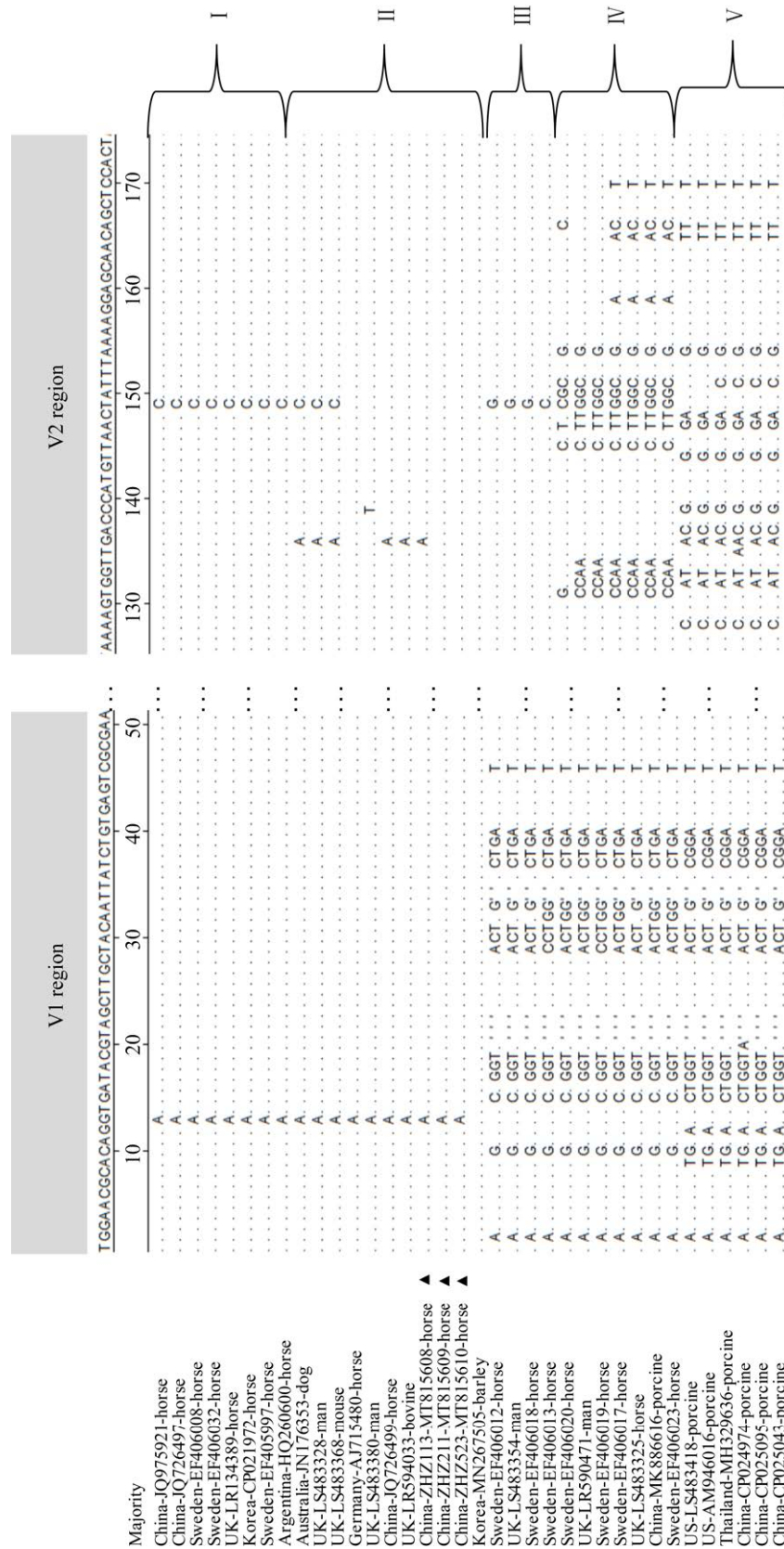
PCR 扩增分离菌 *SeM* 基因, 将分离菌 ZHZ113、ZHZ211、ZHZ523 的 *SeM* 基因的 PCR 产物进行测序, 与 GenBank 数据库中不同时间、不同地区及不同马场来源的部分分离株进行氨基酸序列比对分析。结果显示: 分离菌 ZHZ211 与美国犬源菌株 859903 和 KF214282 亲缘关系接近; 分离菌 ZHZ523 与德国马源菌株 MH286981 及美国犬源菌株 MH768747 亲缘关系接近; 分离株 ZHZ113 与美国马源分离菌 KC146019 和 KC146016 亲缘关系接近(图 4)。

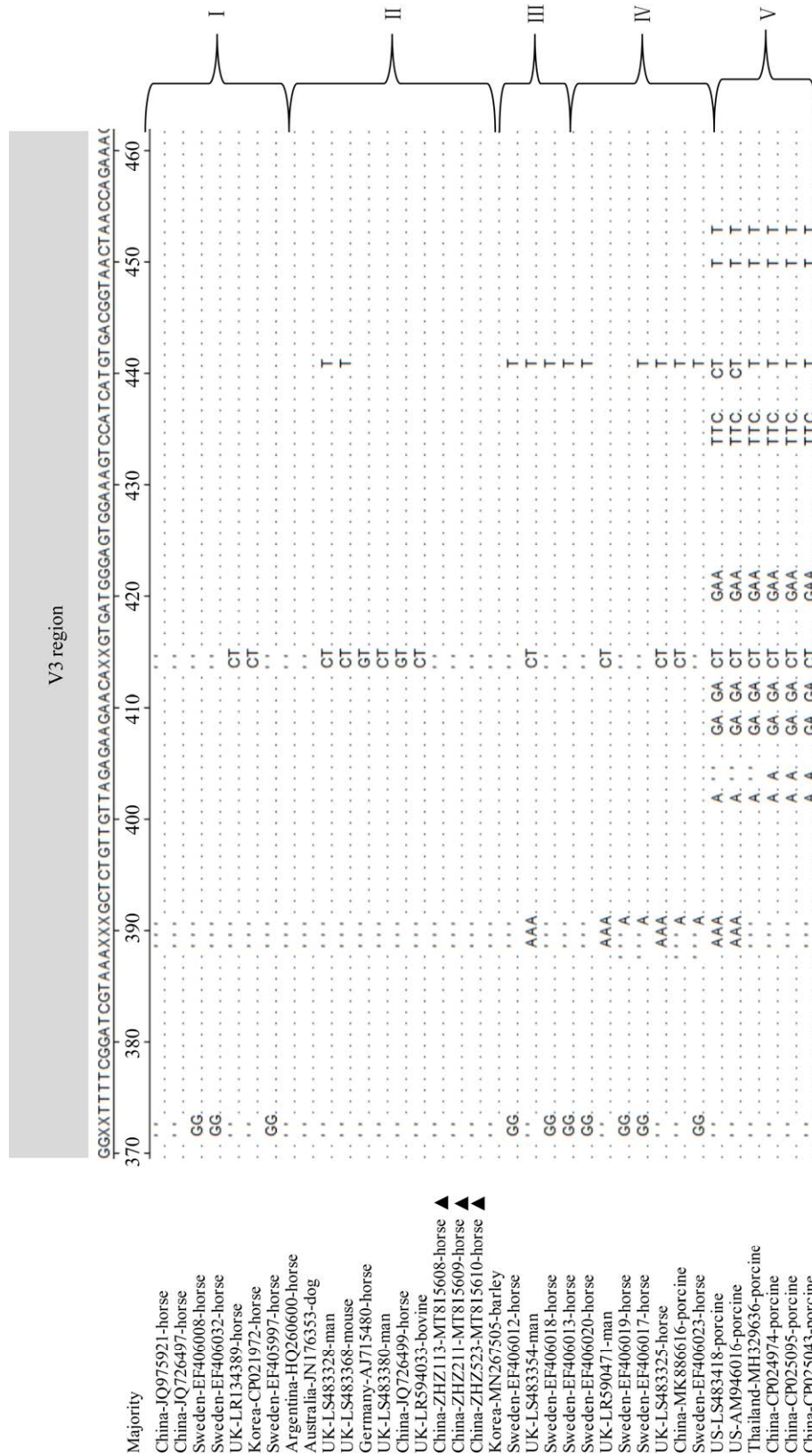
2.6 分离菌的 MLST 分型结果

分别以 3 株分离菌基因组 DNA 为模板 PCR 扩增 7 个管家基因 *arcC*、*nrdE*、*proS*、*spi*、*tdk*、*tpi* 和 *yqiL*。3 株分离菌的 MLST 分型结果见表 4, 分别为 3 个不同的 ST 型 ST39 (ZHZ113)、ST419 (ZHZ523)和 ST421 (ZHZ211), 其中分离菌 ST419 和 ST421 鉴定为 2 个新发现的 ST 型。利用 BioNumerics 软件构建 3 株分离菌与其他相关参考菌株的 ST 型的最小生成树(图 5), 结果发现 ST39 与 ST233、ST346 和 ST35 亲缘性最近, ST419 与 ST138、ST346 和 ST35 亲缘性最近, ST421 与 ST45、ST28、ST335、ST319 和 ST110 亲缘性较近。

3 讨论与结论

随着集约化马养殖业的发展, 马腺疫发病率逐渐上升^[22], 给马养殖业造成较大的经济损失。马链球菌兽疫亚种是可引起马腺疫的一种重要人畜共患病原菌, 是马腺疫的重要病原菌, 该菌还可感染猪引起猪链球菌病^[23-24]。欧美国家报道马源兽疫链球菌不仅可在多种动物中流行和分离, 还发现该菌可在马和犬之间传播^[25-26], 还有报道证明其在马和人之间传播^[27]。





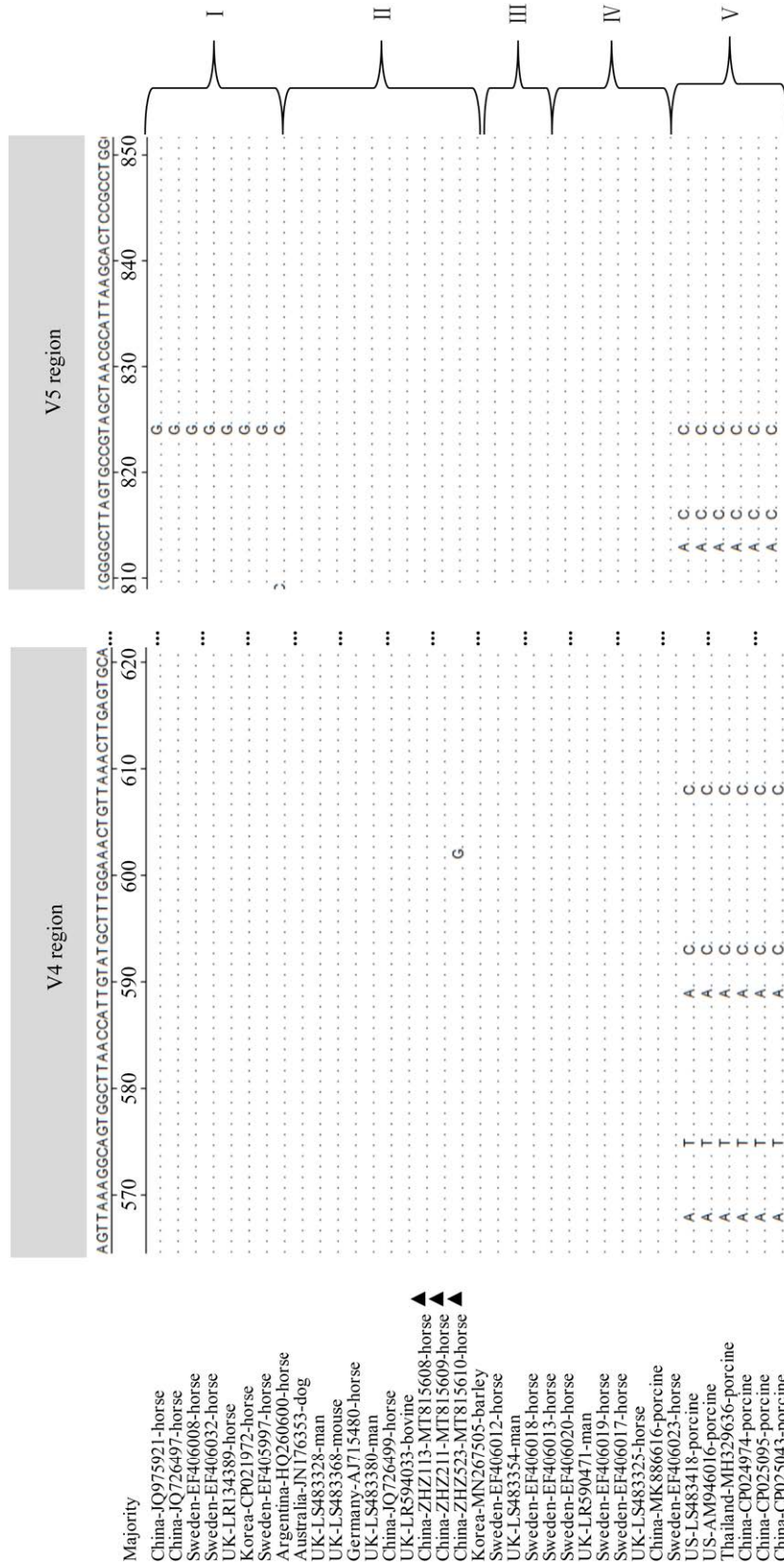


图 2 部分 16S rRNA 基因序列比对结果
Figure 2 Partial results of 16S rRNA genes sequence alignment

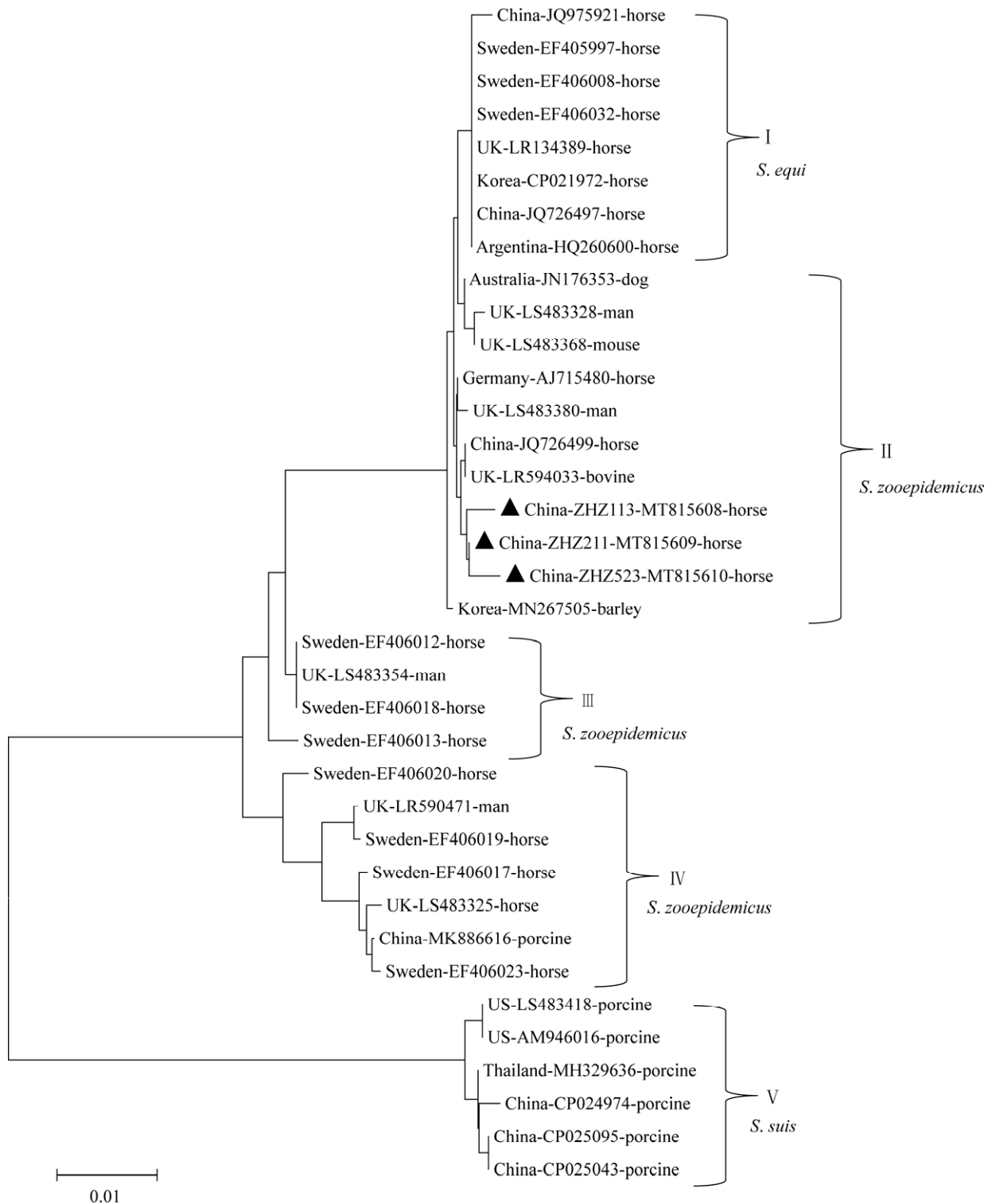


图 3 基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树

Figure 3 Phylogenetic tree based on 16S rRNA genes sequence

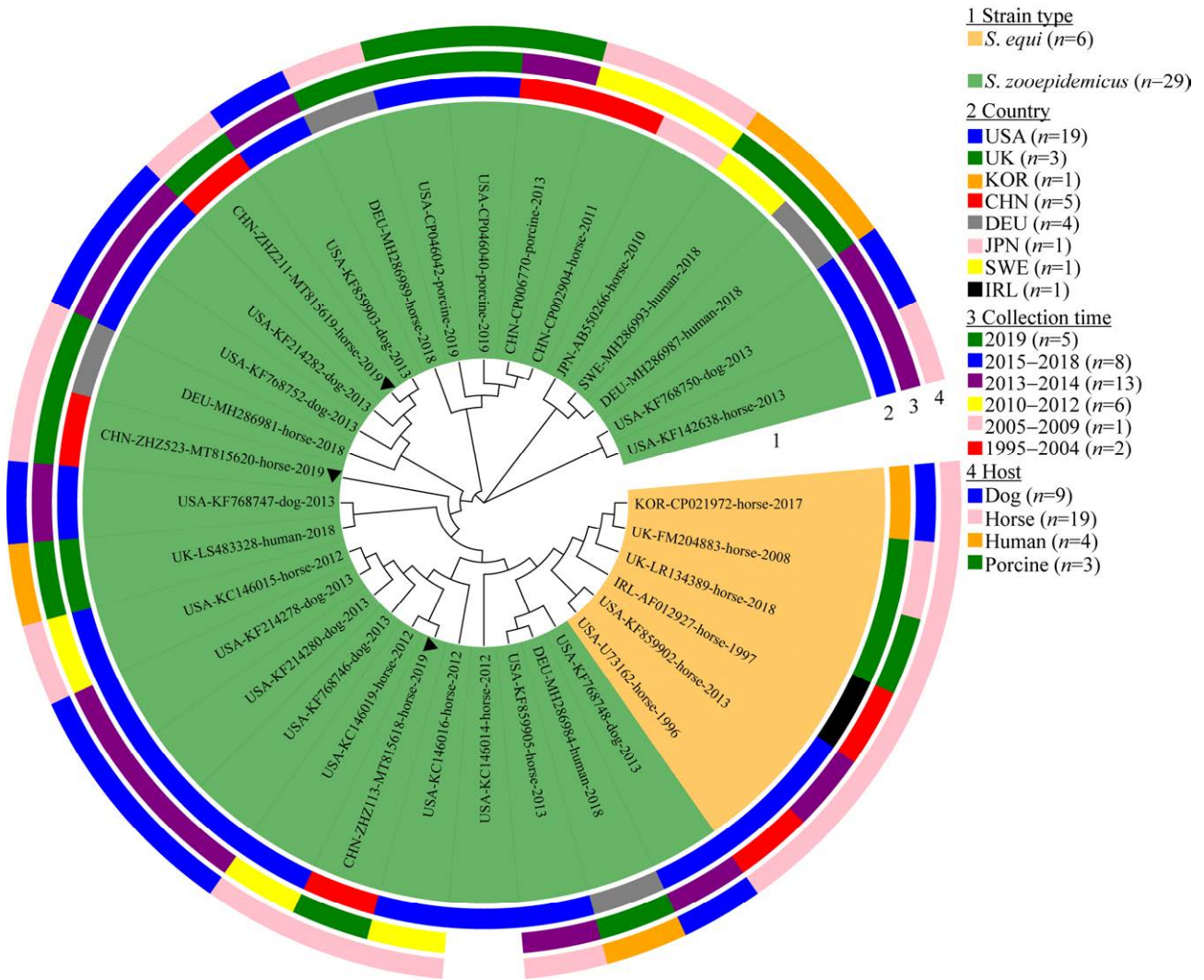


图 4 根据 SeM 氨基酸序列对不同地区、时间、宿主菌株的比较结果

Figure 4 Comparison results of different regions, time and host strains according to SeM amino acid sequence

表 4 分离菌的 MLST 分型

Table 4 Multilocus sequence types of isolates

Strains	ZHZ113	ZHZ523	ZHZ211
<i>yqiL</i>	28	16	12
<i>arcC</i>	19	3	3
<i>nrdE</i>	17	3	3
<i>proS</i>	17	29	17
<i>spi</i>	2	75	6
<i>tdk</i>	1	1	53
<i>tpi</i>	10	5	49
STs	39	419	421

链球菌分类方法主要有 3 种，即种名分类法、兰氏分群法和溶血性分类法。因种名分类法是依据细菌的形态、生理生化特性及 16S rRNA 基因序列进行分类，为目前最被认可的一种分类法^[28]。本研究利用种名分类法鉴定后的结果表明，3 株分离菌 ZHZ113、ZHZ211 和 ZHZ523 为马源兽疫链球菌，其中，ZHZ211 来自一个马场，ZHZ113 和 ZHZ523 来自另外一个马场。因此，本次发现其中一个马场内存在新鉴定 ST 基因型 ZHZ211 (ST421)，另一马场内存在 2 种 ST 基因型 ZHZ113

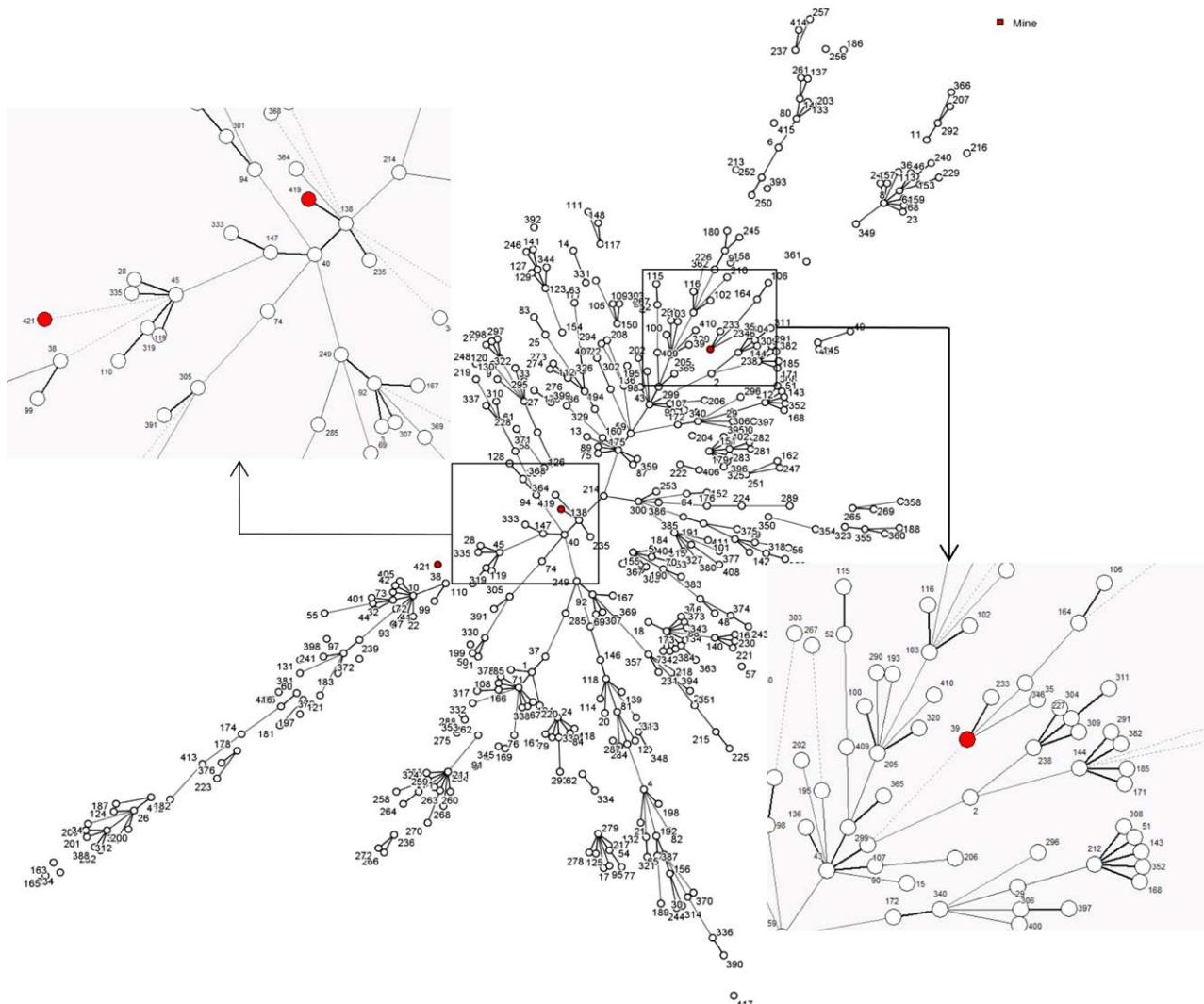


图 5 根据马链球菌兽疫亚种 ST 型构建的最小生成树

Figure 5 The minimum spanning tree based on the ST types of *S. zoepidemicus*

(ST39)、ZHZ523 (ST419), ZHZ523 (ST419) 和 ZHZ211 (ST421) 为 2 个新发现的 ST 型。

马链球菌的 16S rRNA 基因已经多次被用来分析该菌的种内遗传变化^[19,29]。本研究根据 16S rRNA 基因 V1、V2 区变化特征和构建的系统发育进化树将分离菌与国外分离株共分成了 5 个不同的群, 结果发现马链球菌马亚种全部归属于 I 群, 而 3 株分离菌均归属于 II 群马链球菌兽疫亚种。3 株分离菌在 V1 和 V2 区表现出序列变化特征与目前大家普遍认为的马链球菌马亚种是由马链球菌兽疫亚种

进化而来的结论一致^[30], 该群菌株在 V1 和 V2 区的序列与马链球菌马亚种更相似。此外, 在 II 群菌株中还发现了人源兽疫链球菌菌株, 这与 Preziuso 等的研究认为该群菌株的宿主不包括人源菌株不完全一致^[29]。III 群和 IV 群菌株序列的 V1 区相似, V2 区差异较大, 因而属于不同的群。V 群菌株是猪链球菌菌株, 本次对 V1 和 V2 可变区的比较发现该群菌株与 IV 群的兽疫亚种菌株基因序列具有相似性, 而且 IV 群兽疫链球菌中有的菌株为猪源, 据此我们推测 IV 群菌株应与 V 群的猪链球菌在进

化上有一定的亲缘关系。

SeM 蛋白作为马链球菌兽疫亚种的重要毒力因子, 其 N 端基因序列具有多样性, 不同地域菌株往往差异显著^[31-33], 目前认为 SeM 基因的多样性可代表该菌的进化规律与流行特征^[34]。本研究对 3 株本地分离菌和国外分离株从菌株类型、采集地点、采集时间和宿主 4 个方面进行了综合分析与比较, 将氨基酸序列进行比较并构建出系统发育树, 比较后发现分离菌株 ZHZ211 与 2013 年在美国分离得到的犬源兽疫链球菌株亲缘关系较近。2019 年冯凯等对一株马链球菌兽疫亚种新疆株 ZMSY15-1 进行了 SeM 基因的比较分析后, 发现该分离株与人源兽疫链球菌及犬源兽疫链球菌的亲缘关系均较远^[7]。本研究的结果与 Webb 等研究认为该群菌株更容易感染犬一致^[35]。

MLST 分型法已被广泛用于微生物传播和种群动态的研究中^[36], 可反映出微生物的进化生物学。在马链球菌的研究中, 该方法被用来揭示马链球菌马亚种和兽疫亚种的进化关系^[30], 已成为研究兽疫链球菌基因分型和遗传进化的常用技术^[35]。本研究得到了 3 个不同的 ST 型, 其中 ZHZ523 和 ZHZ211 分别被鉴定为 2 个新的 ST 型即 ST419 和 ST421。分离菌 ZHZ113 为 ST39, 该型最早在英国被检出, 之后陆续在其他地区被检出。2015 年 Acke 等应用 MLST 法对英国不同犬养殖场分析, 得到 SeZ 的流行基因型主要为 ST39、ST294 和 ST296^[25]。我们推测本次检出的 ST39 为同时在马和犬中流行的菌株类型。从本次建立的最小生成树可发现, 该型在流行过程中还从未在亚洲地区被检出过。用最小生成树分析本次分离株 ST419 和 ST421 发现, ST419 与 ST138 亲缘关系较近, 而 ST421 和其他 ST 型亲缘关系都较远, ST138 菌株仅在欧洲被检出。因此, 推测 3 株菌中的 2 株与欧洲流行株有亲缘关系, 另外 1 株 ST421 为国内流行株。Kittang 等应用 MLST 方法从挪威患病的马场工人人体内检出了 SeZ 新的基因型 ST364, 并通过

与其他 SeZ 菌株比对分析, 认为该人源菌株与马源菌株 ST40、ST138 和 ST214 亲缘关系较近^[37]。

本研究对马源兽疫链球菌 3 株分离菌分别用 3 种不同的方法从 3 个不同层面进行了流行和进化分析。利用 16S rRNA 基因及 SeM 序列比较分析得出分离菌株中有 2 株与美国犬源菌株有亲缘关系。MLST 分型鉴定了 2 个新的 ST 型(ST419 及 ST421), 丰富了 SeZ 的分子流行病学资料。

REFERENCES

- [1] Cheng LF, Wu ZQ, Liu RC, Kong LF, Fu GH, Chen HM, Huang Y. Isolation and identification of *S. equi* ssp. *zooepidemicus* from *Macaca mulatta*[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2020, 40(6): 1158-1161 (in Chinese)
程龙飞, 吴志强, 刘荣昌, 孔丽芳, 傅光华, 陈红梅, 黄瑜. 猕猴源马链球菌兽疫亚种的分离鉴定[J]. 中国兽医学报, 2020, 40(6): 1158-1161
- [2] Waller AS, Paillot R, Timoney JF. *Streptococcus equi*: a pathogen restricted to one host[J]. Journal of Medical Microbiology, 2011, 60(Pt9): 1231-1240
- [3] Velineni S, DeNegri R, Artiushin SC, Timoney JF. Comparison of specificities of serum antibody responses of horses to clinical infections caused by *Streptococcus equi* or *zooepidemicus*[J]. Veterinary Microbiology, 2015, 180(3/4): 253-259
- [4] Gruszynski K, Young A, Levine SJ, Garvin JP, Brown S, Turner L, Fritzinger A, Gertz RE Jr, Murphy JM, Vogt M, et al. *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* infections associated with Guinea pigs[J]. Emerging Infectious Diseases, 2015, 21(1): 156-158
- [5] Salasia SIO, Wibawan IWT, Pasaribu FH, Abdulmawjood A, Lammler C. Persistent occurrence of a single *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* clone in the pig and monkey population in Indonesia[J]. Journal of Veterinary Science, 2004, 5(3): 263
- [6] Liu PH, Shen SF, Wang YK, Zhang SH, Yao HC, Lu CP. Identification of the isolates of swine streptococcosis in Shanghai[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2001, 21(1): 42-46 (in Chinese)
刘佩红, 沈素芳, 王永康, 张苏华, 姚火春, 陆承平. 上海地区猪源链球菌分离株的病原特性鉴定[J]. 中国兽医学报, 2001, 21(1): 42-46
- [7] Feng K, Wang H, Zhou TT, Ma XH, Enke Bolide, She MJ, Su Y. Isolation, identification and genetic analysis of Xinjiang strain of *Streptococcus equi* subspecies *zooepidemicus* from horse in Xinjiang[J]. China Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2019, 46(1): 231-238

- (in Chinese)
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[J]. 中国畜牧兽医, 2019, 46(1): 231-238
- [8] Waller AS. New perspectives for the diagnosis, control, treatment, and prevention of strangles in horses[J]. The Veterinary Clinics of North America Equine Practice, 2014, 30(3): 591-607
- [9] Wang CD, Su Y, Bo LT, Li H, Ouyang W, Wang D, Wang PM, Zhu YZ, Dang DW. Detection and analysis of serum antibodies against *Streptococcus equi* subspecies *equi* in four counties of Xinjiang[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2015, 36(5): 125-127 (in Chinese)
王彩蝶, 苏艳, 波拉提, 李海, 欧阳文, 王东, 王培明, 朱义忠, 党道伟. 新疆 4 县马腺疫链球菌血清抗体检测与分析[J]. 动物医学进展, 2015, 36(5): 125-127
- [10] Parkinson NJ, Robin C, Newton JR, Slater J, Waller AS. Molecular epidemiology of strangles outbreaks in the UK during 2010[J]. Veterinary Record, 2011, 168(25): 666
- [11] Wang CX, Liu HD, Zhan LE, Lu BY, Tang J, Zhan HJ, Jing YL, Li TT. Isolation, identification and toxicity analysis of *Streptococcus suis*[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2014, 34(6): 936-941 (in Chinese)
王彩先, 刘华栋, 詹丽娥, 陆冰洋, 唐娟, 詹海杰, 景娅丽, 李婷婷. 猪链球菌的分离鉴定及毒力分析[J]. 中国兽医学报, 2014, 34(6): 936-941
- [12] Akemuhan Mamuer, Yao XH, Liu YY, Wang SF, Yang ZY, Xia LN. Analysis of drug resistance and genetic relationship of *Staphylococcus* from different animal sources in Yanqi County, Xinjiang[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2020, 41(7): 27-33 (in Chinese)
马木尔·阿克木汗, 姚晓慧, 刘英玉, 王舒丰, 杨紫嫣, 夏利宁. 新疆焉耆县不同动物源葡萄球菌耐药性及其亲缘关系分析[J]. 动物医学进展, 2020, 41(7): 27-33
- [13] Liu P, Cheng ZL, Chen M, Liu SD. *Streptococcus suis* type 2 strain from donkey: isolation, identification, and MLST typing[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2018, 38(10): 1920-1925 (in Chinese)
刘朋, 程子龙, 陈萌, 刘思当. 驴源猪链球菌 2 型的分离和鉴定及 MLST 分型[J]. 中国兽医学报, 2018, 38(10): 1920-1925
- [14] Maiden MCJ. Multilocus sequence typing of bacteria[J]. Annual Review of Microbiology, 2006, 60(1): 561-588
- [15] Timoney JF, Artiushin SC, Boschwitz JS. Comparison of the sequences and functions of *Streptococcus equi* M-like proteins SeM and SzPSe[J]. Infection and Immunity, 1997, 65(9): 3600-3605
- [16] Anzai T, Kuwamoto Y, Wada R, Sugita S, Kakuda T, Takai S, Higuchi T, Timoney JF. Variation in the N-terminal region of an M-like protein of *Streptococcus equi* and evaluation of its potential as a tool in epidemiologic studies[J]. American Journal of Veterinary Research, 2005, 66(12): 2167-2171
- [17] Kelly C, Bugg M, Robinson C, Mitchell Z, Davis-Poynter N, Newton JR, Jolley KA, Maiden MCJ, Waller AS. Sequence variation of the *SeM* gene of *Streptococcus equi* allows discrimination of the source of strangles outbreaks[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2006, 44(2): 480-486
- [18] 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*[J]. Equine Veterinary Journal, 2011, 43(3): 359-364
- [19] Abdulmajood A, Lämmler CH. Determination of intraspecies variations of the V2 region of the 16S rRNA gene of *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*[J]. Research in Veterinary Science, 2000, 68(1): 33-39
- [20] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test; approved standard-eleventh edition. CLSI document M02-A10[S]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012
- [21] Holt JG. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology[M]. Ninth Edition. America: Lippincott Williams & Wilkins, 1993: 816
- [22] Kang LC, Chen XH, Zhong FG, Huang X, Han ML, He YH. Isolation, identification and vaccine development of *Streptococcus equi*[J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2013(9): 109-111 (in Chinese)
康立超, 陈新华, 钟发刚, 黄新, 韩猛立, 何延华. 马腺疫链球菌的分离鉴定与疫苗的研制[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2013(9): 109-111
- [23] Fan HJ, Lu CP, Tang JQ. Analysis of the M-like gene of *Streptococcus zooepidemicus* Chinese isolates from pig[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2006, 39(1): 210-214 (in Chinese)
范红结, 陆承平, 唐家琪. 猪源马链球菌兽疫亚种中国分离株类 M 基因特性分析[J]. 中国农业科学, 2006, 39(1): 210-214
- [24] Miao LZ, Yu XY, Wang Y, Fu Q, Li SG, Xie JW. Isolation and molecular biological identification of *Streptococcus zooepidemicus* from Bama fragrant pig[J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2015(1): 129-131 (in Chinese)
苗立中, 于新有, 王艳, 付强, 李书光, 谢金文. 巴马香猪源马兽疫链球菌分离及分子生物学鉴定[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2015(1): 129-131
- [25] Acke E, Midwinter AC, Lawrence K, Gordon SJG, Moore S, Rasiah I, Steward K, French N, Waller A. Prevalence of *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* and *S. equi* subsp. *zooepidemicus* in a sample of healthy dogs, cats and horses[J]. New Zealand Veterinary Journal, 2015, 63(5):

- 265-271
- [26] Sowman H, Cave N, Dunowska M. A survey of canine respiratory pathogens in New Zealand dogs[J]. *New Zealand Veterinary Journal*, 2018, 66(5): 236-242
- [27] 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 *zooepidemicus* infection from horses to humans[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2013, 19(7): 1041-1048
- [28] Van Belkum A, Tassios PT, Dijkshoorn L, Haeggman S, Cookson B, Fry NK, Fussing V, Green J, Feil E, Gerner-Smidt P, et al. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology[J]. *Clinical Microbiology and Infection*, 2007, 13: 1-46
- [29] Preziuso S, Moriconi M, Cuteri V. Genetic diversity of *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* isolated from horses[J]. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 2019, 65: 7-13
- [30] Holden MTG, Heather Z, Paillot R, Steward KF, Webb K, Ainslie F, Jourdan T, Bason NC, Holroyd NE, Mungall K, et al. Genomic evidence for the evolution of *Streptococcus equi*: host restriction, increased virulence, and genetic exchange with human pathogens[J]. *PLoS Pathogens*, 2009, 5(3): e1000346
- [31] Liu YT, Wang CD, Xia LN, Su Y. Cloning and sequence difference analysis of the *SeM* gene of *Streptococcus equi* subsp. *equi* isolated in Xinjiang[J]. *Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica*, 2015, 24(3): 14-19 (in Chinese)
刘云涛, 王彩蝶, 夏利宁, 苏艳. 马链球菌马亚种新疆株 *SeM* 基因的克隆及序列差异分析[J]. *西北农业学报*, 2015, 24(3): 14-19
- [32] Wang SJ, Jiang CG, Wu JN, Liu YG, Jin JM, Liu H, Cai XH, Zhang XY. Isolation and identification of a *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* and the M-like gene analysis[J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2012, 34(11): 878-881 (in Chinese)
王淑杰, 姜成钢, 武嘉男, 刘永刚, 金家民, 刘鹤, 蔡雪辉, 张秀英. 致病性马兽疫链球菌的分离鉴定、生物学特性及其 M-like 基因的序列分析[J]. *中国预防兽医学报*, 2012, 34(11): 878-881
- [33] Libardoni F, Vielmo A, Farias L, Matter LB, Pötter L, Spilki FR, De Vargas AC. Diversity of *SeM* in *Streptococcus equi* subsp. *equi* isolated from strangles outbreaks[J]. *Veterinary Microbiology*, 2013, 162(2): 663-669
- [34] Lindahl S, Söderlund R, Frosth S, Pringle J, Båverud V, Aspán A. Tracing outbreaks of *Streptococcus equi* infection (strangles) in horses using sequence variation in the *seM* gene and pulsed-field gel electrophoresis[J]. *Veterinary Microbiology*, 2011, 153(1/2): 144-149
- [35] 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[J]. *Microbiology: Reading, England*, 2008, 154(Pt 10): 3016-3024
- [36] Britton AP, Blum SE, Legge C, Sojony K, Zabek EN. Multi-locus sequence-typing of *Streptococcus equi* subspecies *zooepidemicus* strains isolated from cats[J]. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2018, 30(1): 126-129
- [37] Kittang BR, Pettersen VK, Oppegaard O, Skutlaberg DH, Dale H, Wiker HG, Skrede S. Zoonotic necrotizing myositis caused by *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* in a farmer[J]. *BMC Infectious Diseases*, 2017, 17(1): 1-8