

## 研究报告

## 一株牛源多动物链球菌致病性及基因组特性分析

范文雨, 顾兰英, 高之煜, 曹鑫艳, 张彦兵\*, 孙延鸣\*

石河子大学 动物科技学院, 新疆 石河子 832003

范文雨, 顾兰英, 高之煜, 曹鑫艳, 张彦兵, 孙延鸣. 一株牛源多动物链球菌致病性及基因组特性分析[J]. 微生物学通报, 2024, 51(11): 4644-4666.

FAN Wenyu, GU Lanying, GAO Zhiyu, CAO Xinyan, ZHANG Yanbing, SUN Yanming. Pathogenicity and genomic characteristics of a *Streptococcus pluranimalium* strain isolated from bovine[J]. Microbiology China, 2024, 51(11): 4644-4666.

**摘要:**【背景】多动物链球菌(*Streptococcus pluranimalium*, Sp)最早于1999年由Devriese等报道,是一种具有广泛宿主来源的潜在人畜共患病原体。目前的研究中,该菌种已从牛、羊、猪、肉鸡等多个物种的感染组织中被分离确认。然而,目前对其致病性、耐药性和基因组学等相关研究较少。

【目的】从牛呼吸道分离鉴定一株Sp菌,分析其致病性及耐药性;通过基因组测序分析,明确其基因组的基本特征及部分毒力因子和耐药基因。【方法】从患病牛鼻拭子分离菌株并进行16S rRNA基因测序鉴定,开展对兔致病性试验和药敏试验;通过Illumina测序、组装以获取该菌株基因组一般特征信息,进行Swiss-Prot、NR、GO、COG、KEGG、CAZy、TCDB、Pfam数据库注释并分析基因功能,并通过PHI、VFDB、CARD数据库注释该菌株的毒力因子及耐药基因。【结果】分离到一株多动物链球菌Bov5,可引起兔肺组织肺间隔增厚及炎性细胞浸润;药敏试验结果显示其对林可霉素和克林霉素耐药,对链霉素中介;全基因组测序组装后确定其基因组大小为2 038 579 bp (2.04 Mb),注释到的编码基因共计1 981个,注释到毒力因子100个,突变导致病原致病能力增强的基因28个,耐药相关基因83个。【结论】分离到一株具有较强致病性的牛源多动物链球菌,构建了菌株基因组框架图,挖掘出系列毒力和耐药相关基因,为进一步研究Sp致病基因和耐药基因奠定了基础。

**关键词:** 牛; 链球菌; 全基因组测序; 致病性; 耐药性

资助项目: 国家自然科学基金(32060133, 32360901); 新疆建设兵团指导性科技计划(2023ZD042); 新疆维吾尔自治区自然科学基金(2022D01B197); 石河子大学青年创新培育人才项目(CXPY202211); 石河子大学高层次人才科研启动项目(RCZK202043)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32060133, 32360901), the Xinjiang Construction Corps Guiding Science and Technology Program (2023ZD042), the Science Foundation of Xinjiang Uygur Autonomous Region (2022D01B197), the Shihezi University Youth Innovation Talent Training Program (CXPY202211), and the High-level Talents Research Program of Shihezi University (RCZK202043).

\*Corresponding authors. E-mail: ZHANG Yanbing, zhangyanbing@shzu.edu.cn; SUN Yanming, sym@shzu.edu.cn

Received: 2024-03-21; Accepted: 2024-04-15; Published online: 2024-05-21

## Pathogenicity and genomic characteristics of a *Streptococcus pluranimalium* strain isolated from bovine

FAN Wenyu, GU Lanying, GAO Zhiyu, CAO Xinyan, ZHANG Yanbing\*, SUN Yanming\*

College of Animal Science and Technology, Shihezi University, Shihezi 832003, Xinjiang, China

**Abstract:** [Background] *Streptococcus pluranimalium* was initially reported by Devriese et al. in 1999 as a potential zoonotic pathogen with a broad range of hosts. Although this pathogen has been isolated and identified from infected tissues of several species, including cattle, sheep, pigs, and broilers, there are few studies reporting its pathogenicity, antibiotic resistance, and genomics, which remain to be studied. [Objective] This study aims to identify a *S. pluranimalium* strain isolated from bovine respiratory tract and analyze its pathogenicity and antibiotic resistance. The basic characteristics of the genome and some virulence factors and antibiotic resistance genes were identified by genome sequencing. [Methods] Nasal swabs were collected from diseased cattle for identification of the pathogenic bacteria by 16S rRNA sequencing. Furthermore, the pathogenicity of the isolate in rabbits and the drug susceptibility of the strain were studied. Illumina sequencing and assembly were carried out to obtain an overview of the genome of the strain. Swiss-Prot, NR, GO, COG, KEGG, CAZy, TCDB, and Pfam were used for gene annotation and function analysis. PHI, VFDB and CARD were employed to annotate the virulence factors and drug resistance genes of the strain. [Results] *S. pluranimalium* Bov5 was successfully isolated, which induced pulmonary septal thickening and inflammatory cell infiltration in the rabbit lung tissue. The strain was resistant to lincomycin and clindamycin and showcased intermediate resistance to streptomycin. The genome size of the strain was determined to be 2 038 579 bp (2.04 Mb). A total of 1 981 coding genes were annotated, including 100 virulence factors, 28 genes conferring enhanced pathogenicity due to mutations, and 83 antibiotic resistance genes. [Conclusion] We isolated a bovine-derived *S. pluranimalium* strain with strong pathogenicity, constructed the genome framework of the strain, and mined the virulence and antibiotic resistance genes. The findings laid a foundation for further studying the pathogenic genes and antibiotic resistance genes of *S. pluranimalium*.

**Keywords:** cattle; *Streptococcus*; whole genome sequencing; pathogenicity; antibiotic resistance

多动物链球菌(*Streptococcus pluranimalium*, Sp)是一种潜在的人畜共患病原体,与多种宿主传染病相关。自 Devriese 等<sup>[1]</sup>于 1999 年在家畜中首次报道以来,关于其对公共卫生和动物健康影响的研究逐渐增多。研究显示,该菌可感染多种动物引起病理损伤,包括奶牛亚临床乳腺炎、败血症、多种生殖系统疾病、小牛化脓性脑膜炎<sup>[2]</sup>、马脑膜脑炎<sup>[3]</sup>,以及肉鸡败血症和瓣膜

性心内膜炎等<sup>[4]</sup>。在中国也有报道 *S. pluranimalium* 与牦牛<sup>[5]</sup>、猪<sup>[6]</sup>、山羊<sup>[7]</sup>和岩羊<sup>[8]</sup>的感染有关。另外,该菌在人类病例中也已被报道与败血症<sup>[9]</sup>、脑脓肿<sup>[10]</sup>等严重感染有关联。尽管 *S. pluranimalium* 已在多种患病动物组织中和人类病例中被分离,但其确切的致病机制和传播途径研究较少。有研究指出<sup>[11]</sup>,虽然 *S. pluranimalium* 某些菌株在实验动物模型中未表现出明显致病

性,基因组分析却揭示了毒力因子的存在,这可能表明菌株的宿主嗜性和宿主适应性在该病原体致病过程中发挥着重要作用。

本研究通过采集有呼吸道症状的病牛鼻拭子样本,分离纯化多动物链球菌(*S. pluranimalium*),并开展兔致病性试验及药敏试验分析菌株的致病性和药物敏感性。鉴于细菌基因组学高通量测序技术的成熟及其价格低廉、测序周期短等优势,基因组高通量测序技术可快速获取细菌全基因组信息,因而在挖掘和研究耐药基因及毒力基因中发挥重要作用。因此,通过全基因组测序技术分析 *S. pluranimalium* 菌株基因组基本特征,构建毒力因子和耐药基因图谱,以期丰富 *S. pluranimalium* 基因组信息,并为后续深入研究其致病机制、耐药性及公共卫生意义提供参考资料。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

大豆酪蛋白琼脂(Tryptose Soya Agar, TSA)培养基、胰蛋白胨大豆肉汤(Trypticase Soy Broth, TSB)培养基,青岛海博生物技术有限公司; Trans2K DNA Marker, 北京全式金生物技术股份有限公司; BioGold 2×SuperPCR Master Mix, 北京博迈德生物技术有限公司; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒, 北京天根生化科技有限公司; NEBNext® Ultra™ II DNA 文库制备试剂盒, NEB 公司。

电泳仪, 北京六一生物技术有限公司; PCR 仪, Applied Biosystems 公司; 生化培养箱, 天津市泰斯特仪器有限公司; 恒温培养振荡器, 上海智城分析仪器制造有限公司; 电泳仪和凝胶成像系统, 伯乐生命医学产品(上海)有限公司; Qubit 2.0 荧光定量仪, 赛默飞世尔科技公司; Agilent 2100, 安捷伦科技(中国)有限公司; Illumina NovaSeq PE150 测序平台, 北京诺

禾致源科技股份有限公司。

病牛鼻拭子从新疆石河子地区某牛场采样获得。新西兰白兔在石河子大学动物科技学院动物房单独饲养。动物实验经石河子大学动物伦理委员会审查通过(编号 A2023-017)。

### 1.2 菌株分离纯化与 16S rRNA 基因鉴定

将病牛鼻拭子接种于 TSB 培养基中, 37 °C、180 r/min 扩菌培养 12–16 h 后在 TSA 培养基上划线分离, 37 °C 培养 12–16 h, 挑取其中单菌落在 TSB 液体培养基中培养。使用细菌 16S rRNA 基因通用引物 27F (5'-AGAGTTTGA TCCTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-CGGCTACC TTGTTACGACTT-3')对培养菌液 PCR 扩增, 预计扩增产物长度 1 500 bp<sup>[12]</sup>。PCR 反应体系(20 μL): BioGold 2×SuperPCR Master Mix 10 μL, 上、下游引物(10 μmol/L)各 1 μL, 菌液 2 μL, ddH<sub>2</sub>O 6 μL。PCR 反应条件: 95 °C 5.5 min; 95 °C 20 s, 57 °C 30 s, 72 °C 45 s, 30 个循环; 72 °C 7 min。PCR 扩增产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测后送至新疆有康生物科技有限公司测序。将该菌株测序获得的序列切去首尾低质量片段后, 在 NCBI 数据库中进行 BLASTn 比对, 确认菌株种属。

### 1.3 致病性试验

根据培养菌液  $OD_{600}$  与相应倍比稀释后培养的菌落数计算菌液浓度, 无菌 PBS 稀释培养菌液至  $10^4$  CFU/mL, 用于攻毒。选择 6 只雌性 2–3 kg 3 月龄健康新西兰白兔, 每组 3 只, 分为实验组和对照组。实验组用  $10^4$  CFU/mL 菌液通过滴鼻攻毒 100 μL, 左右鼻孔平均滴入。对照组以相同方法滴鼻等量无菌 PBS, 之后连续观察 14 d, 并记录其临床症状及死亡情况。剖检死亡及有明显临床症状者, 取肺组织用 4%多聚甲醛固定 48 h 后 HE 染色, 镜检肺组织病理变化, 并与对照组兔肺组织比较。

## 1.4 药敏试验

采用纸片扩散法(K-B 法)进行药敏试验。菌株使用 TSB 培养基 37 °C 培养 4–6 h 后, 将菌液用无菌生理盐水稀释至 0.5 麦氏浊度, 使用一次性无菌棉签蘸取稀释后的菌液, 均匀涂布于 TSA 培养基上, 平放静置使其自然干燥, 而后用无菌镊子夹取药敏片贴于平板相应位置, 37 °C 培养 16–18 h, 测量各抗生素药敏片的抑菌圈直径。选择的抗生素有阿米卡星、链霉素、阿奇霉素、万古霉素、恩诺沙星、诺氟沙星、复方新诺明、林可霉素、克林霉素、美罗培南、氨苄西林、头孢唑啉、头孢曲松、头孢拉定、米诺环素、氟苯尼考共 16 种。参照美国临床和实验室标准化协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)标准判定敏感性<sup>[13]</sup>。

## 1.5 建库及基因组测序、组装

使用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取分离菌株的基因组 DNA, 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 纯度和完整性, 并利用 Qubit 定量。随后经随机打断, 使用 NEBNext<sup>®</sup> Ultra<sup>™</sup> II DNA 文库制备试剂盒构建 DNA 文库。经 Qubit 2.0 初步定量和 Agilent 2100 检测后使用 qPCR 准确定量。质检合格后, 将不同文库进行 Illumina NovaSeq PE150 测序。测序原始数据经修剪适配接头、过滤低质量读数、去除 duplication 污染得到有效数据, 进而用于从头组装。使用 SOAP denovo v2.04、SPAdes 和 ABySS 软件组装, 并通过 CISA 软件整合, 采用 gapclose v1.12 等软件对初步组装结果进行优化和处理 gap, 从而得到最终组装结果; 过滤 500 bp 以下片段并进行评估和统计分析。

## 1.6 基因组组分分析

通过 GeneMarkS v4.17 软件对编码基因进行预测; 对于重复序列, 运用 RepeatMasker Open-4.0.5 软件进行散在重复序列预测, 采用

Tandem Repeats Finder (TRF) v4.07b 搜寻 DNA 序列中的串联重复序列。对于非编码 RNA 的预测: 通过 tRNAscan-SE v1.3.1 预测 tRNA; 通过与近缘参考序列的 rRNA 库比对和 rRNAmmer v1.2 预测 rRNA; 小 RNA (sRNA) 的预测则首先采用 Rfam 数据库比对注释, 进而使用 CMsearch v1.1rc4 确定最终序列。分别使用软件 IslandPath-DIOMB v0.2、phiSpy v2.3 和 CRISPRdigger v1.0 预测基因组中的基因岛、前噬菌体和 CRISPR。另外, 根据 NCBI 中多动物链球菌其他菌株基因组序列, 通过 BRIG 软件绘制基因组圈图, 并利用 Mauve 软件和 CGView Server 网站中 FastANI 软件进行各菌株基因组间共线性分析。

## 1.7 基因功能的注释

利用 Swiss-Prot、NR、GO、COG、KEGG、CAZY、TCDB、Pfam 数据库, 通过 Diamond 比对( $E \text{ value} \leq 1e-5$ ), 选取比对得分最高的结果(默认 identity  $\geq 40\%$ , coverage  $\geq 40\%$ )进行功能注释。使用 SignalP v4.1、TMHMM v2.0c 工具预测信号肽及跨膜结构, 并进一步综合预测分泌蛋白。另外, 根据蛋白序列功能数据库注释结果, 提取分泌系统相关蛋白进行注释以预测 TNSs 系统, 并使用 antiSMASH v2.0.2 预测次级代谢基因簇。

## 1.8 毒力因子和耐药基因

使用病原与宿主互作数据库(pathogen host interactions database, PHI)、毒力因子数据库(virulence factor database, VFDB)及抗生素耐药基因数据库 comprehensive antibiotic research database (CARD)探索菌株的毒力因子和耐药基因, 经 Diamond 比对, 将分离菌株基因和对应功能注释信息结合从而得到注释结果。使用 CARD 数据库提供的 resistance gene identifier (RGI)软件将目标物种蛋白序列与 CARD 数据

库进行比对, 并统计注释到的抗性基因信息。

### 1.9 系统发育树的构建

使用 barrnap v0.9 软件从分离菌株基因组中提取 16S rRNA 基因序列, 通过 NCBI BLAST 比对, 选取序列一致性最高的序列共 20 个, 采用 MEGA 7.0.26 软件 neighbor-joining 法构建系统发育树。参考文献[11,14]构建单拷贝基因系统发育树。获取 NCBI 中所有链球菌属 (*Streptococcus*) 和乳酸乳球菌乳亚种 (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*)、乳酸乳球菌乳脂亚种 (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*) 参考基因组序列, 以及多动物链球菌 (*Streptococcus pluranimalium*) SP28、Colony612、SP21-2、TH11417、14A0014 这 5 株菌株的基因组序列, 使用 orthofinder 获得以上全部基因组序列以及菌株 Bov5 基因组序列的单拷贝基因。经对齐与合并后使用 iqtree2 确定最优模型并以 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 和 *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* 为外群构建系统发育树, 进一步通过 iTOL 绘制系统发育树。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株的鉴定及系统发育树分析结果

将鼻拭子接种于 TSB 培养基中培养后, 经 TSA 培养基划线分离得到 1 株菌, 命名为 Bov5。该菌株在 TSA 培养基中形成小于 0.5 mm 的光滑、半透明菌落(图 1)。菌株 Bov5 的 16S rRNA 基因 PCR 扩增产物大小约为 1 500 bp (图 2), 胶回收并测序后进行 BLASTn 比对, 确定相似性最高的是多动物链球菌 (*Streptococcus pluranimalium*) (100.00%)。在系统发育树中(图 3, 图 4), 菌株 Bov5 与分离自瑞士牛流产样品的 *S. pluranimalium* strain 14A0014 相似性较高, 其次与分离自中国牛乳腺炎病料中的 *S. pluranimalium* strain TH11417 在同一分支, 与其他的链球菌亲缘关系较远。

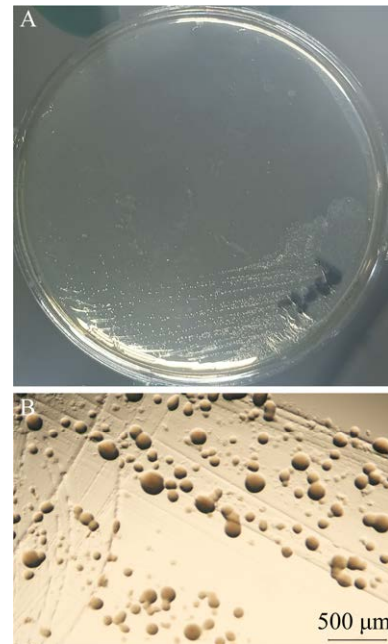


图 1 Bov5 的菌落形态 A: 眼观形态; B: 40 倍光镜下菌落形态

Figure 1 Colony morphology of strain Bov5. A: Eye view morphology; B: Colony morphology under a light microscope at 40 magnification.

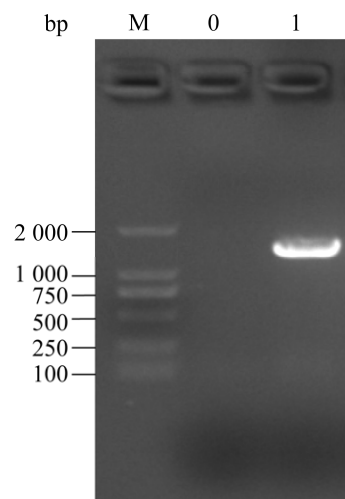


图 2 菌株 Bov5 16S rRNA 基因 PCR 产物电泳条带 M: DL2000 PLUS DNA Marker; 0: 对照; 1: 菌株 BOV5

Figure 2 Electrophoretic bands of 16S rRNA PCR products of strain Bov5. M: DL2000 Plus DNA Marker; 0: Control; 1: Strain Bov5.

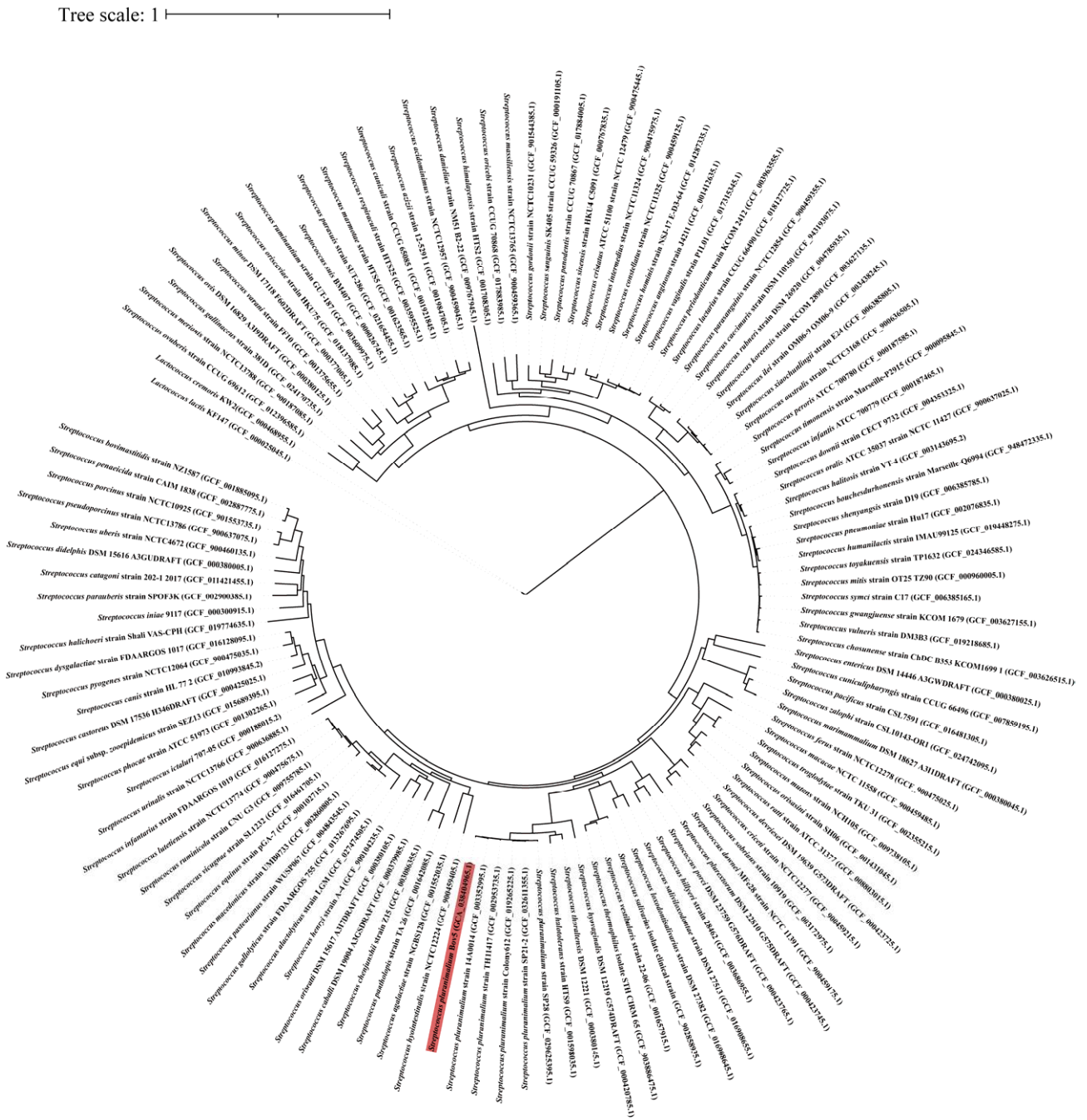


图 3 链球菌属成员单拷贝基因组系统发育树 标尺表示遗传距离的单位

Figure 3 Phylogenetic tree of single-copy genomes of members of the genus streptococcus. The scale represents the unit of genetic distance.

### 2.2 菌株 Bov5 感染可导致新西兰兔肺部病理损伤

攻毒后 1 周内无明显临床症状，偶见喷嚏，

活力降低；第 10 天，一只实验组兔死亡，剖检后腹腔内脏器未见病变，打开胸腔可见肺脏明显充血。实验组与对照组肺组织 HE 染色镜

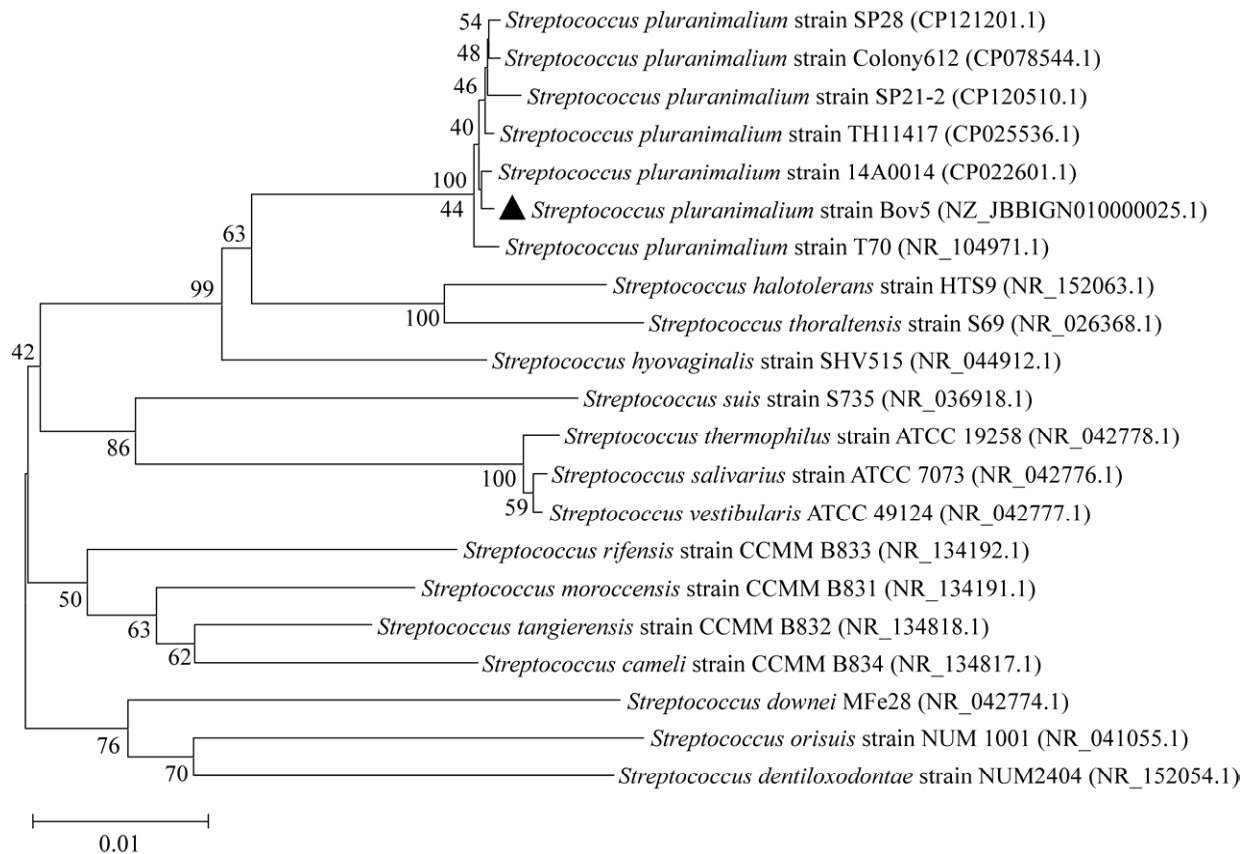


图4 菌株 Bov5 基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树 括号内编号为 GenBank 登录号; 节点处数字代表 1 000 次重复取样 bootstrap 检验置信度值; 标尺 0.01 表示遗传距离的单位

Figure 4 Phylogenetic tree of strain Bov5 constructed based on the 16S rRNA gene sequence. The number in parentheses is the GenBank accession number; The numbers at nodes represent the confidence values of bootstrap test with 1 000 repeated samples. 0.01 in the distance scale indicates units of genetic distance.

检结果见图 5, 相较于对照组, 菌株 Bov5 攻毒后的兔肺组织肺间隔增厚, 肺泡血管充血, 可见炎性细胞浸润, 以中性粒细胞为主(图 5B–5E), 也可见巨噬细胞分布(图 5B 和 5D)。

### 2.3 菌株 Bov5 基因组组装与全基因组组分分析结果

通过从头组装获得菌株 Bov5 基因组 Scaffold (GenBank 登录号: GCA\_038404965.1), 组装序列长度大于 500 bp 的共计 34 个, 总长度 2 038 579 bp (2.04 Mb), 最大长度 2 80 489 bp, 最小长度 1 616 bp, N50 为 101 266 bp, G+C 含量为 38.8%。菌株 Bov5 基因组长度为 2 038 579 bp,

注释到的编码基因共计 1 981 个, 基因总长度占基因组长度的 84.65%。其他基因组组分中, 预测到串联重复序列 202 个, 散在重复序列 182 个, 非编码 RNA 65 个, 以及基因岛 6 个, 前噬菌体 7 个和 CRISPR 序列 1 个, 基因组组分的总体结果见表 1。通过 FastANI 软件计算出 Bov5 与菌株 14A0014 相似度为 98.00%, 与菌株 TH11417 相似度为 97.46%, 与系统发育树结果一致。将该菌基因组序列与 NCBI 多动物链球菌其他菌株(14A0014、TH11417、Colony612、SP28)基因组序列相比较, 绘制基因组圈图(图 6)和共线性分析(图 7)。结果表明, 各菌株整体序

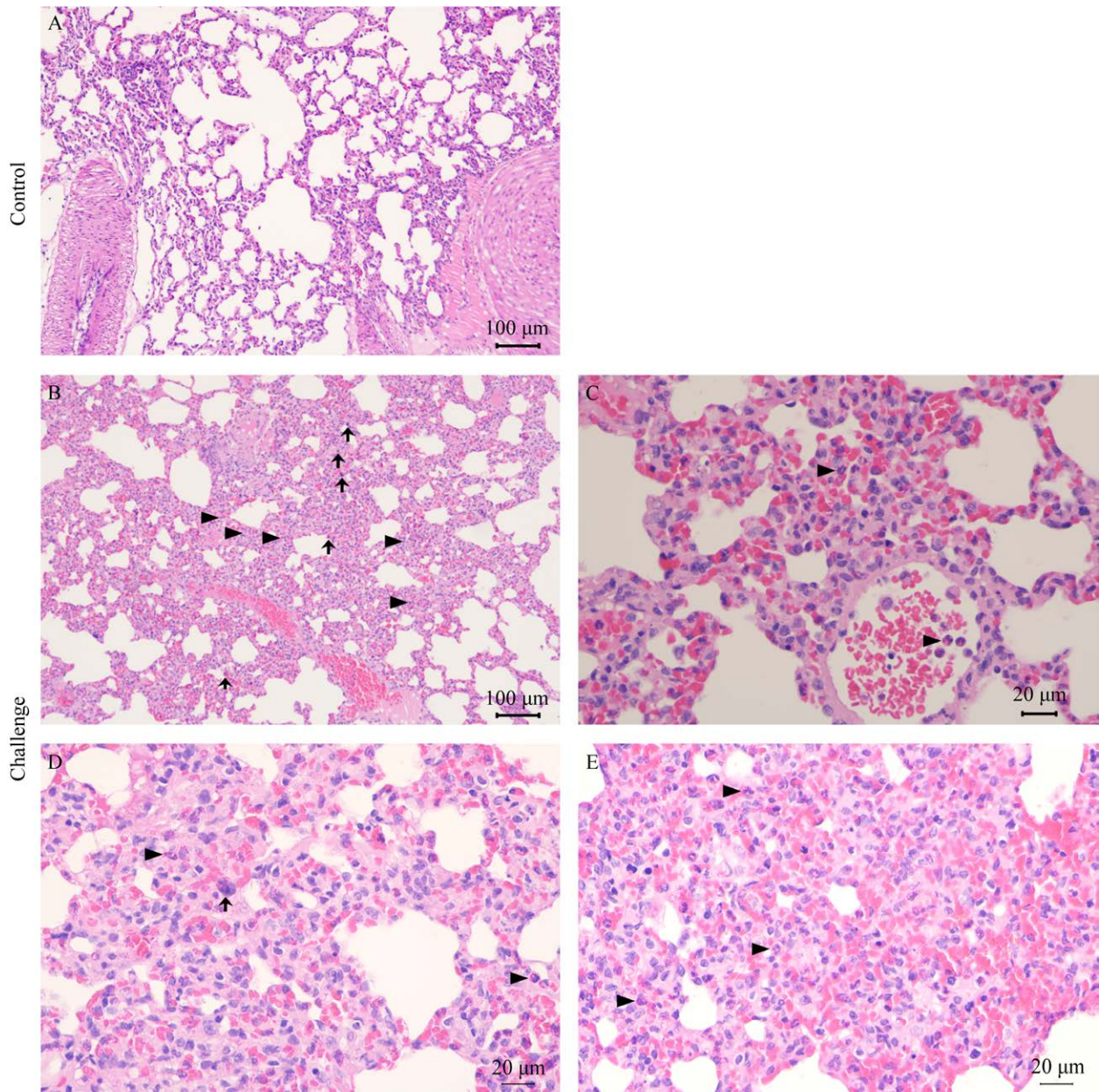


图 5 对照组兔肺组织(A)及菌株 Bov5 攻毒兔肺组织(B-E) 三角形：中性粒细胞；箭头：巨噬细胞  
 Figure 5 Lung tissue of rabbits in the control group (A) and those challenged with the Bov5 strain (B-E). Triangles: Neutrophils; Arrows: Macrophages.

列及结构基本一致，但部分片段存在差异及移位，如在图 6 的起始片段中，菌株 Bov5 的 G+C 含量明显高于平均水平，结合基因组组分信息，该区域属于前噬菌体，这也反映出各菌株在该

处有明显差异的原因。在共线性分析中(图 7)，菌株 Bov5 与其他基因组一致序列的交错，则是由于该菌株仅测序获得基因组草图，但整体序列基本一致。



表 1 菌株 Bov5 基因组组分基本信息

Table 1 Basic information of strain Bov5 genome components

基因组组分 Components of the genome	数量 Number
基因 Gene	1 981
串联重复序列 Tandem repeat sequence	202
小卫星 DNA Minisatellite DNA	176
微卫星 DNA Microsatellite DNA	1
散在重复序列	
长末端重复序列 Long terminal repeat	97
DNA 转座子 DNA transposons	49
长散在重复序列 Long interspersed nuclear elements	22
短散在重复序列 Short interspersed nuclear elements	11
滚环 Rolling circle	2
未知组分 Unknown	1
非编码 RNA ncRNA	
tRNA	57
5S rRNA	3
16S rRNA	2
23S rRNA	2
sRNA	1
基因岛 Genomics island	6
前噬菌体 Prophage	7
CRISPR	1

细菌基因组岛是细菌基因组上的特定区域, 通过水平基因转移可在细菌种属间传播各种功能基因, 在细菌生存和致病等过程中具有重要作用。在菌株 Bov5 基因组中共预测到 6 个基因岛(图 8), 其中有 4 个基因岛预测到转座酶编码基因。其中 GIs001 中存在抗生素抗性基因, 包括氨基糖苷核酸转移酶基因 *ant(6)-Ia*、ANT(9)家族氨基糖苷核酸转移酶基因 *Spw*, 其编码蛋白可通过修饰氨基糖苷类药物从而发挥对该类药物的抗性。GIs002 可编码 DNA 拓扑异构酶 IV 亚基 A、支链氨基酸转移酶、30S 核糖体蛋白 S1。GIs003 中基因编码产物包括应答调节转录因子、含 LytTR 家族 DNA 结合域的蛋白质、糖基转移酶家族 2 蛋白、细菌素免疫蛋白及白细胞素 A/沙星 P 家族 II 类细菌素,

以及参与质粒接合转移的 TraF, 这些蛋白对细菌的生存具有积极作用, 参与对外界环境的感受、防御与入侵。GIs004 中编码蛋白主要是镉外排系统辅助蛋白和 CadD 家族镉抗性转运蛋白, 有助于细菌对重金属镉的耐受。GIs005 编码产物主要参与转录及转录的调节, 如 DnaI、DnaD、NrdR、应答调节转录因子, 以及双组分系统信号感受器组氨酸激酶和锌金属蛋白酶 HtpX。GIs006 则可编码  $\alpha/\beta$  水解酶、果糖-二磷酸醛缩酶、50S 核糖体蛋白 L28、Asp23/GIs24 家族包膜应激反应蛋白及假定的金属稳态蛋白。

## 2.4 菌株 Bov5 基因功能注释与预测结果

分别使用 GO、KEGG、COG、TCDB、CAZy 等数据库对该菌株基因组进行基因功能注释。GO 注释分类结果(图 9)表明, 细胞组分

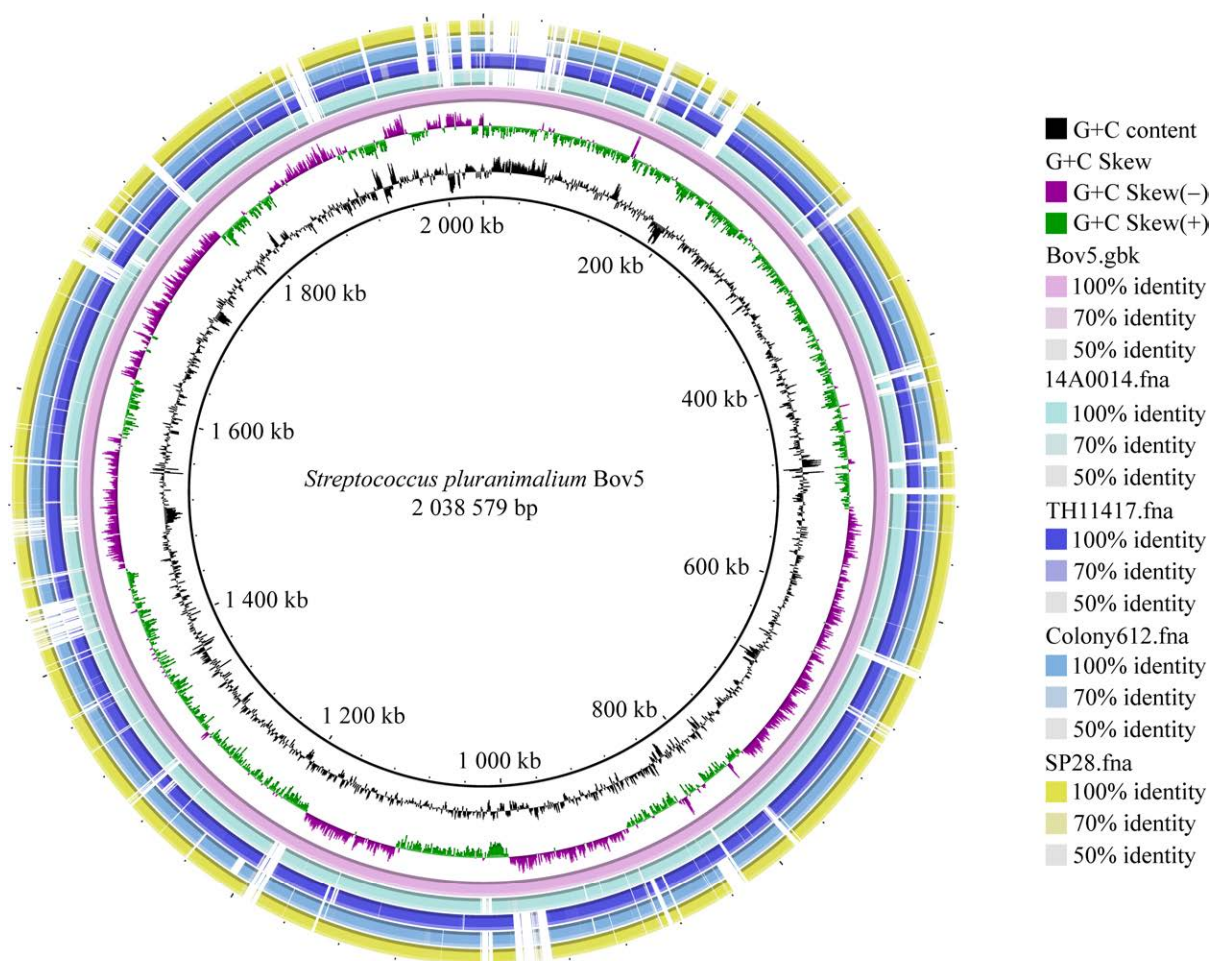


图 6 菌株 Bov5 的基因组圈图 图示由内向外各圈环分别表示序列长度刻度、G+C 含量、G+C Skew、菌株 Bov5 基因组、参考菌株 14A0014、TH11417、Colony612、SP28 的基因组

Figure 6 Genome circle diagram of strain Bov5. The circles from inside to outside represent the sequence length scale, G+C content, G+C Skew, genome of strain Bov5, genome of reference strain 14A0014, TH11417, Colony612 and SP28, respectively.

(cellular component)中主要有细胞解剖实体和细胞内成分及含蛋白复合物，也存在病毒粒子，这可能与注释到的前噬菌体有关；分子功能(molecular function)中主要有催化活性和结合，以及运输和转录调节活性；生物过程(biological process)中以细胞过程和代谢过程为主，其次是定位、生物调节和生物过程调控，其中也包含免疫系统过程和生物黏附。

KEGG 注释分类结果(图 10)表明，注释基

因数量最多的是新陈代谢相关通路，尤其是碳水化合物代谢、氨基酸代谢和核苷酸代谢等这类细菌生长繁殖中的关键通路。具体而言，注释到相关基因最多的是属于膜转运的 ABC transporters (map02010)，之后依次是属于翻译分类的核糖体(map03010)，在信号转导分类下的 two-component system (map02020)，以及在细胞群落-原核生物分类之下的群体感应(map02024)。除一些生物基本代谢通路外，注

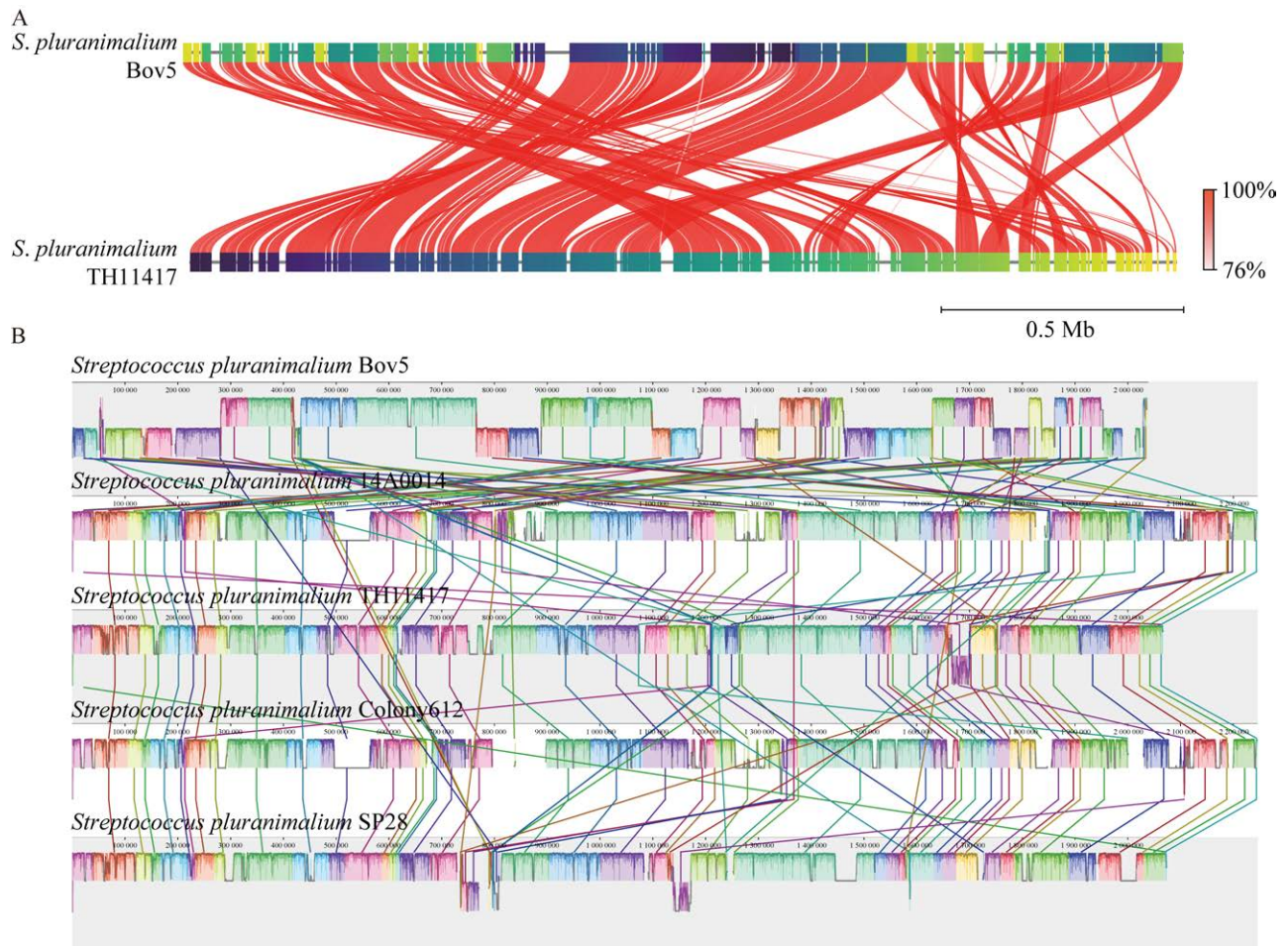


图7 菌株 Bov5 与其他参考菌株的基因组共线性分析 A: 菌株 Bov5 与 TH11417 共线性分析. B: 菌株 Bov5 与 14A0014、TH11417、Colony612、SP28 的共线性分析

Figure 7 Genomic collinearity analysis of Bov5 and other *Sp* reference strains. A: Collinearity analysis of strain Bov5 and TH11417. B: Collinearity analysis of strain Bov5 with strains 14A0014, TH11417, Colony612, and SP28.

释结果也涉及病毒的信息处理, 以及与人类疾病有关的传染病、耐药性、免疫疾病、心血管病等。

COG 数据库注释结果(图 11)中匹配基因数最多的是翻译、核糖体结构和生物发生, 氨基酸转运和代谢, 碳水化合物运输和代谢。另外, 也注释到移动基因组前噬菌体、转座子及防御机制。

转运蛋白分类数据库 TCDB 是膜转运蛋白,

包括离子通道的分类系统。TCDB 数据库注释结果表明该菌超过半数的膜转运蛋白为原发性主动转运蛋白, 其次是电化学电位驱动的转运子及基团转运蛋白(图 12)。

CAZy 是碳水化合物酶相关的数据库, 内容包括能催化碳水化合物降解、修饰及生物合成的相关酶系家族, CAZy 注释结果(图 13)说明, 相关基因主要集中在糖苷水解酶(glycoside hydrolases, GH)和糖基转移酶(glycosyl transferases, GT)分类

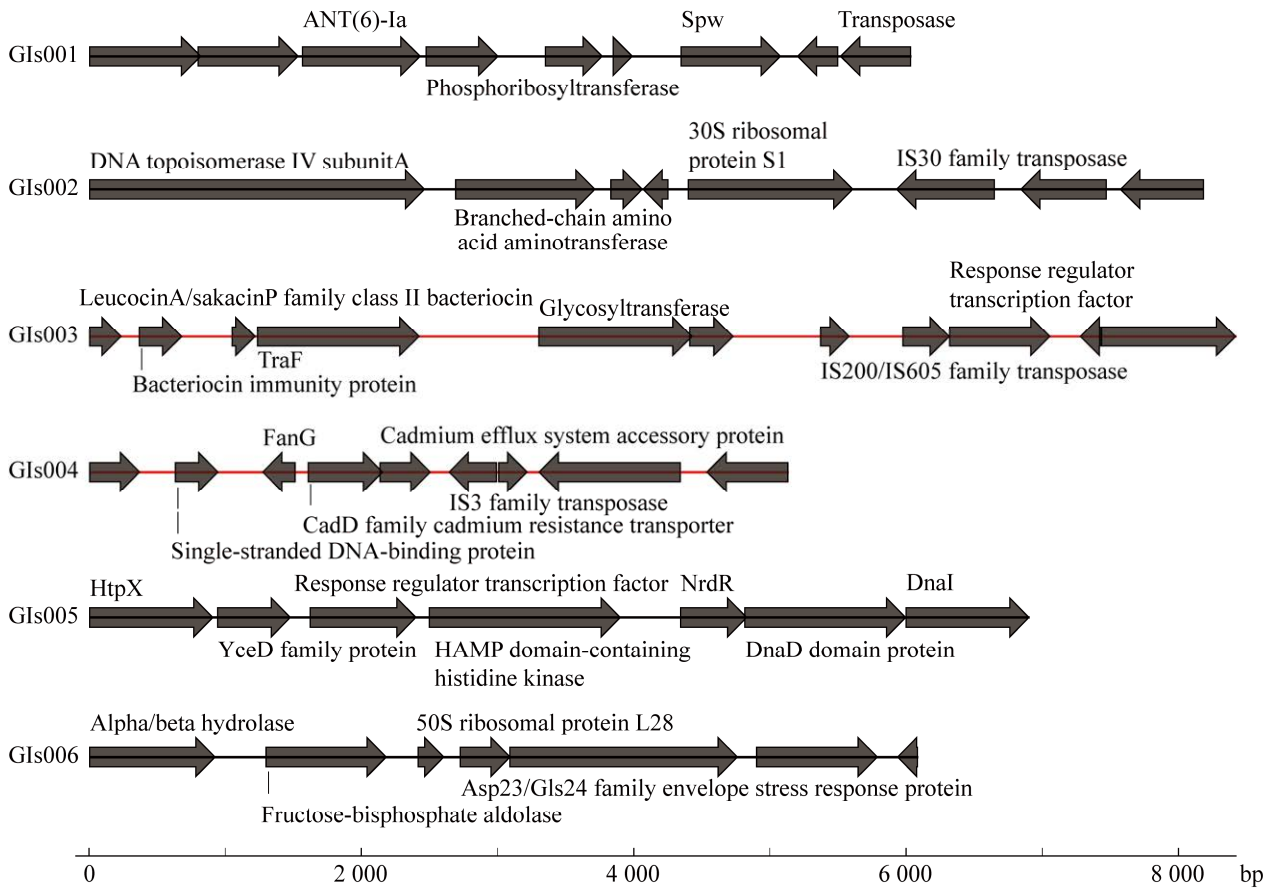


图 8 Bov5 基因岛结构 未标注名称者多为功能未知的假定蛋白，部分则是无注释结果

Figure 8 Bov5 gene island structure. Most of the unlabeled results are putative proteins with unknown functions, and some are results without annotation.

中，并且未注释到多糖裂解酶(polysaccharide lyase, PL)和氧化还原酶(auxiliary activities, AA)。关于效应子，预测到分泌蛋白 45 个，并未预测到任何类型的分泌系统，但预测到 T3SS 效应蛋白 26 个。对次级代谢基因簇分析结果显示(图 14)，该菌含有 T3PKS 基因簇 1 个和 bacteriocin 基因簇 2 个。

### 2.5 毒力和耐药性分析结果

该菌株基因组在 VFDB 中共注释到 100 个毒力因子(表 2)，其类别包括：黏附、生物膜、效应分泌系统、外泌酶、外毒素、免疫调节、运动性、营养/代谢因子、翻译后修饰、调控、压力生存及其他。毒力因子主要分布于黏

附、免疫调节和营养/代谢因子这 3 个分类中，包括荚膜、LPS、链球菌脂蛋白轮状酶 A 等，另外也有外毒素如溶细胞素、溶血素，以及胞外酶如分选酶 A、链球菌烯醇化酶、C3 降解蛋白酶。这些毒力因子可能在细菌黏附、侵入机体，导致宿主发病的过程中发挥重要作用。

在病原与宿主互作数据库(PHI)<sup>[15]</sup>的注释结果(图 15)中，突变导致病原菌致病能力减弱的基因 169 个，突变导致病原致病能力增强的基因 28 个，突变对病原菌致病性没有影响的基因 54 个，突变导致病原菌致病能力丧失的基因 8 个，致死因子 12 个，另有抗药基因和耐药基因各 1 个。导致病原菌致病能力增强的基

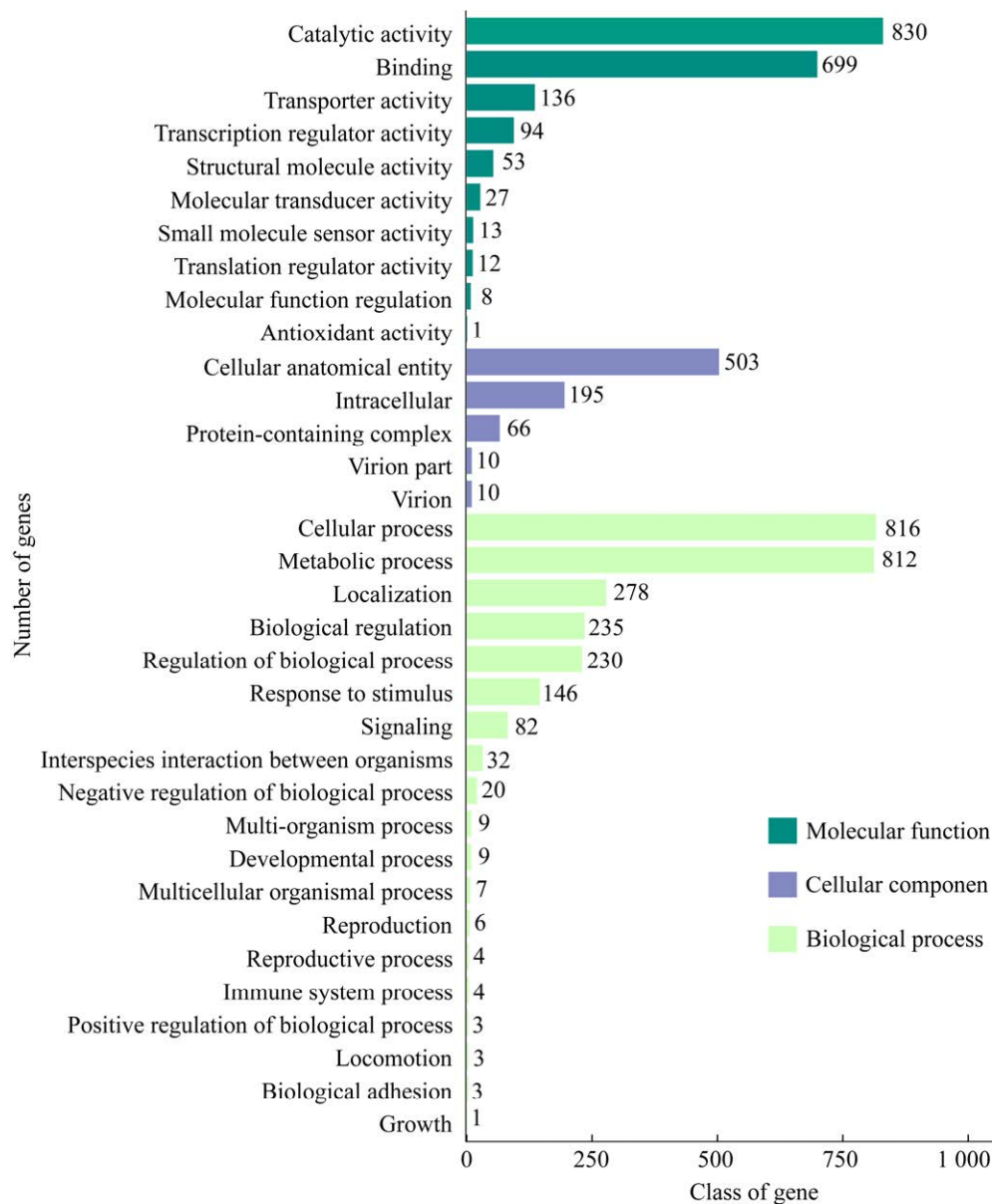


图9 菌株 Bov5 基因组的 GO 功能分类图

Figure 9 GO functional classification of strain Bov5 genome.

因功能较为多样，如转运蛋白、荚膜多糖生物合成、DNA 修复，以及涉及多种成分的物质代谢与能量代谢。在导致病原致病能力增强的基因中，有多种属于双组分系统，包括组氨酸激酶和反应调控蛋白基因 *rgfC*、*rgfA*。另外也有 IS200 的调控 RNA/转座酶基因 *mpA*、抑制 GAS 毒力因子编码基因 *covR*、UDP-N-乙酰葡萄糖

胺 1-羧乙烯基转移酶基因 *murA*，以及有机抗过氧化氢蛋白基因 *ohr* 等。

CARD 数据库注释结果(表3)显示，该菌共有 47 个抗生素抗性基因，其中多数通过构成外排泵系统发挥作用，部分耐药基因具有多种抗生素的耐药性。其中预测一致性最高 (identities>0.9)的是以下 6 个基因：介导氨基糖

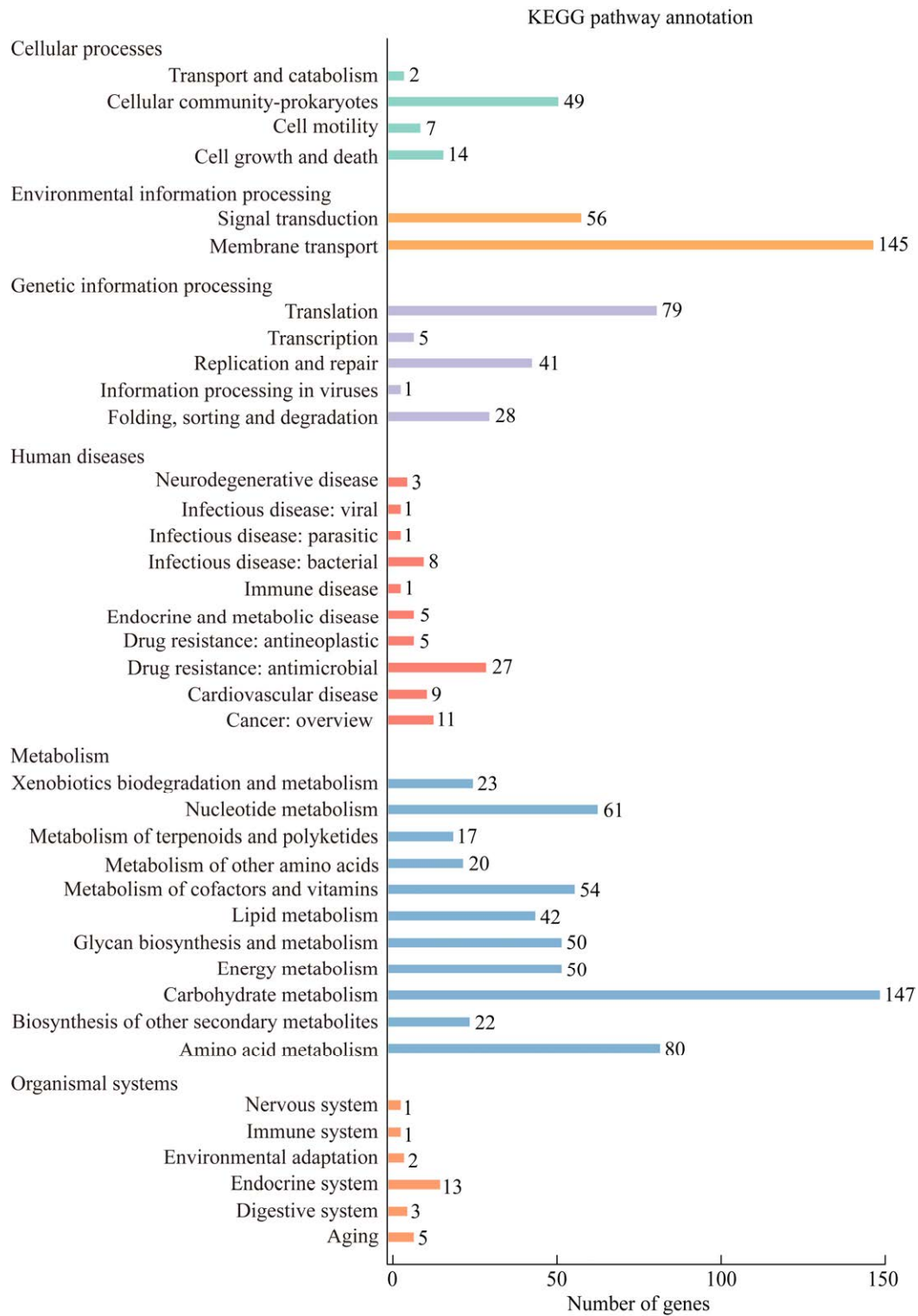


图 10 菌株 Bov5 基因组的 KEGG 代谢通路分类图

Figure 10 KEGG metabolic pathway classification of strain Bov5 genome.

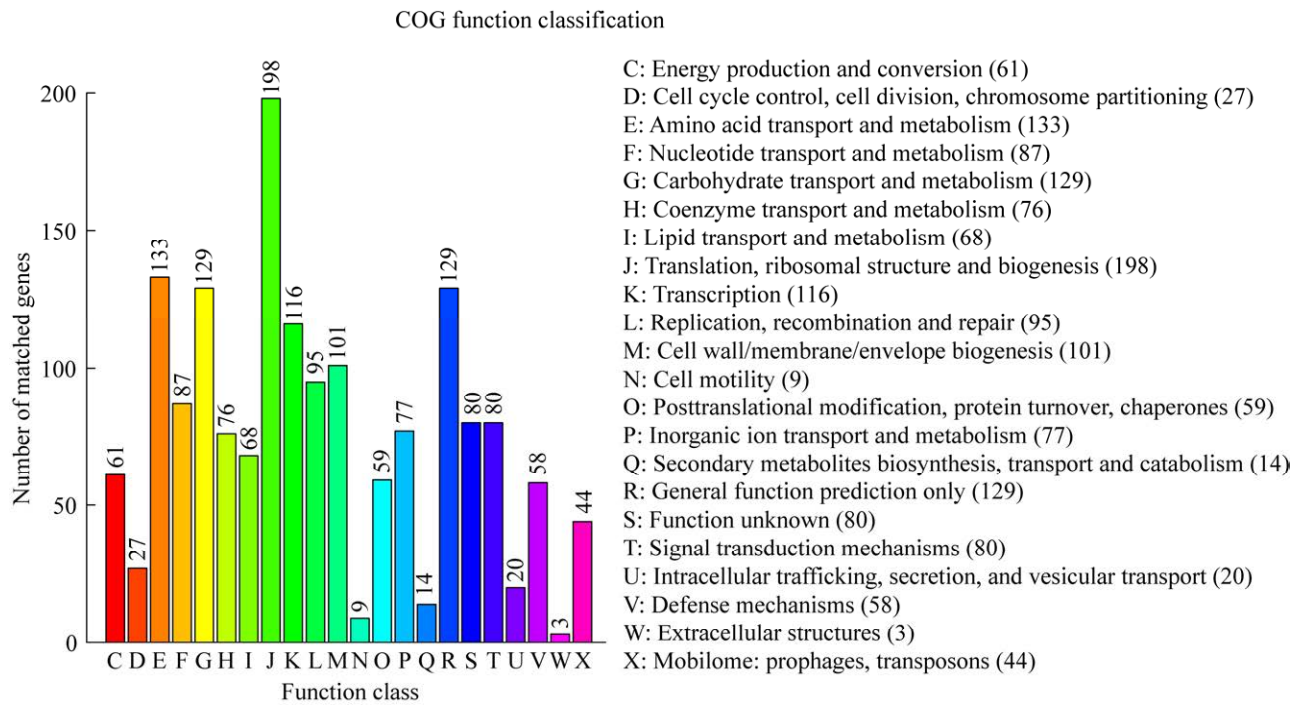


图 11 菌株 Bov5 基因组的 COG 功能分类图

Figure 11 COG functional classification of strain Bov5 genome.

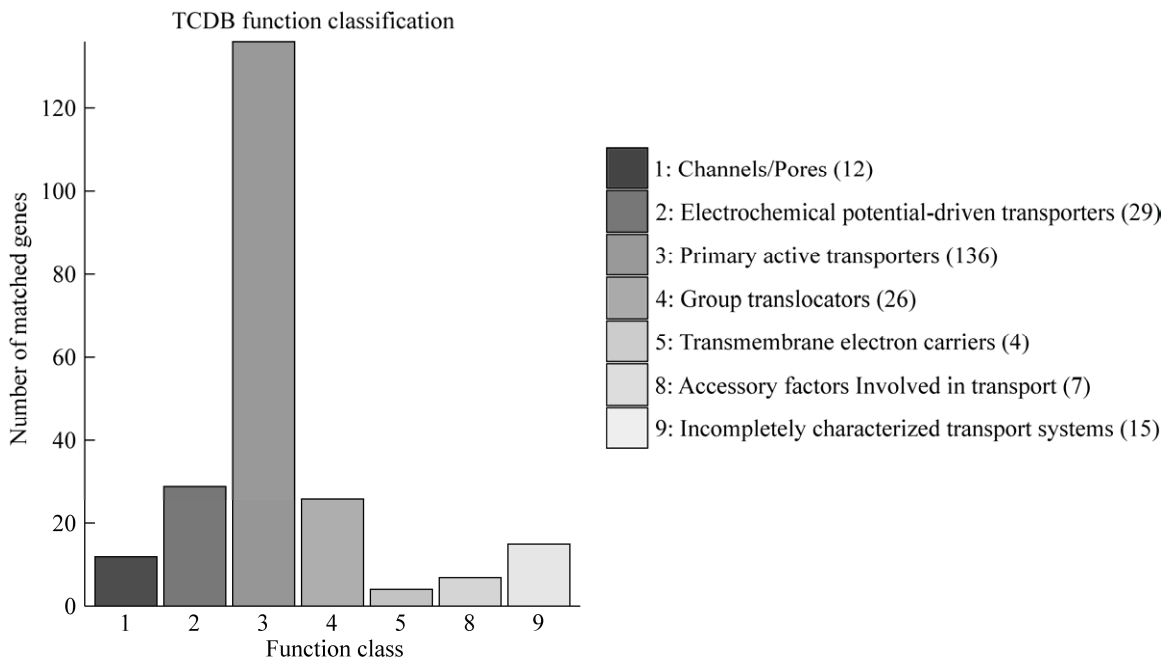


图 12 菌株 Bov5 基因组的 TCDB 功能分类图

Figure 12 TCDB functional classification of strain Bov5 genome.

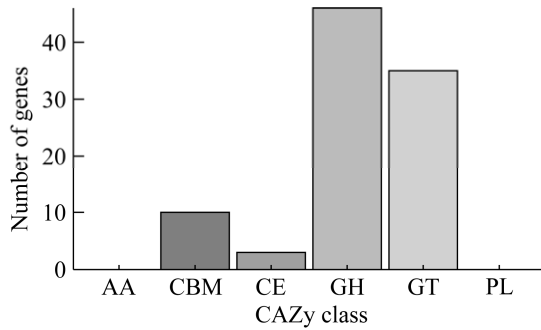


图 13 菌株 Bov5 基因组的 CAZy 功能分类及相应基因数量统计图 AA: 氧化还原酶; CBM: 碳水化合物结合模块; CE: 糖类脂解酶; GH: 糖苷水解酶; GT: 糖基转移酶; PL: 多糖裂解酶

Figure 13 CAZy functional classification of strain Bov5 genome and corresponding gene number statistics. AA: auxiliary activitie; CBM: carbohydrate-binding module; CE: carbohydrate esterase; GH: glycoside hydrolase; GT: glycosyltransferase; PL: polysaccharide lyase.

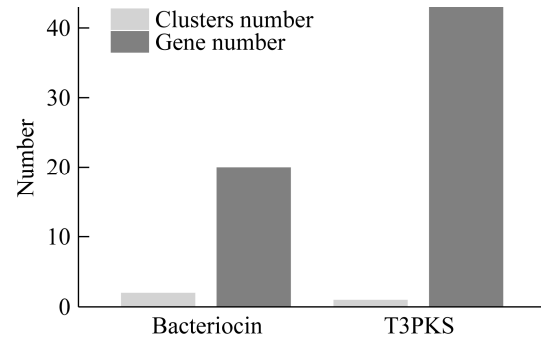


图 14 菌株 Bov5 基因组的次级代谢基因簇及基因数量统计图

Figure 14 Statistical diagram of secondary metabolic gene cluster and gene number of strain Bov5 genome.

昔耐药的编码具有抗生素钝化酶活性蛋白的基因 *ant(6)-Ia*、*ant(9)-Ia*，介导林可酰胺类耐药的基因 *lnuB*，以及参与构建外排泵复合体或亚基的基因 *lsaE*、*mel*、*mefA*。另外，预测到的

表 2 毒力因子注释结果

Table 2 Results of annotation of virulence factors

VF category	Virulence factors	Number of genes	Related genes
Adherence	Adherence	1	<i>dnaK</i>
	CD0873	4	<i>CD0873</i>
	EF-Tu	1	<i>tuf</i>
	FBPs	1	<i>fbp54</i>
	GroEL	1	<i>groEL</i>
	Lap	1	<i>lap</i>
	ML1683	1	<i>ML_RS08565</i>
	PDH-B	1	<i>pdhB</i>
	PEB1	1	<i>pebA</i>
	Streptococcal lipoprotein rotamase A	2	<i>slrA</i>
	Streptococcal plasmin receptor/GAPDH	1	<i>plr/gapA</i>
Biofilm	AI-2	1	<i>luxS</i>
	BopD	1	<i>bopD</i>
	Glucan-binding proteins	1	<i>SMUNN2025_RS00190</i>
Effector delivery system	T4SS	1	<i>CBU_1566</i>
Exoenzyme	Autolysin	1	<i>cbpD</i>
	C3-degrading protease	1	<i>cppA</i>
	Serine protease	1	<i>htrA/degP</i>
	Sortase A	1	<i>srtA</i>
	Streptococcal enolase	1	<i>eno</i>

(待续)



(续表 2)

VF category	Virulence factors	Number of genes	Related genes	
Exotoxin	Cytolysin	2	<i>cylR2</i>	
	Hemolysin	1	<i>hlyA</i>	
	Hemolysin III	1	<i>hlyIII</i>	
	MARTX	1	<i>rtxB</i>	
	Phytotoxin phaseolotoxin	2	<i>argK</i>	
Immune modulation	Capsular polysaccharide	1	<i>wbfV/wcvB</i>	
	Capsule	28	<i>cap8J, cpsA/uppS, cpsB/cdsA, galU, hasA, oppF, rfbA, rfbB, rfbD, SAK_RS06335, SGO_RS04955, SGO_RS05030, SGO_RS09900, SGO_RS09905, SMU_RS01255, SMU_RS03825, SMU_RS03835, SMU_RS03845, SPD, SSA_RS07390, SSA_RS10870, SSA_RS10875, STER_RS05315, STER_RS07060, STU_RS14640, STU_RS14650</i>	
	Exopolysaccharide	1	<i>mrsA/glmM</i>	
	LOS	1	<i>orfM</i>	
	LPS	3	<i>fabZ, flmF2, lpxA/glmU</i>	
	MymA operon	1	<i>adhD</i>	
	PgdA	1	<i>pdgA</i>	
	Polysaccharide capsule	3	<i>BCE_RS25810, galE, manA</i>	
	Motility	Polar flagella	1	<i>flmH</i>
	Nutritional/Metabolic factor	ABC transporter	1	<i>fagC</i>
		Copper exporter	1	<i>ctpV</i>
FbpABC		1	<i>fbpC</i>	
Ferrous iron transport		1	<i>sitB</i>	
Glutamine synthesis		1	<i>glnA1</i>	
LplA		1	<i>lplA1</i>	
Purine biosynthesis		1	<i>purM</i>	
Pyrimidine biosynthesis		2	<i>carA, carB</i>	
Trehalose-recycling ABC transporter		4	<i>sugC</i>	
Post-translational modification		Lipoprotein diacylglyceryl transferase lgt	1	<i>lgt</i>
	Lsp	1	<i>lspA</i>	
	Serine-threonine phosphatase stp	1	<i>stp</i>	
Regulation	LisR/LisK	1	<i>lisR</i>	
	RegX3	2	<i>regX3</i>	
	RelA	1	<i>relA</i>	
	SenX3	1	<i>senX3</i>	
	SigA	1	<i>sigA/rpoV</i>	
Stress survival	ClpC	1	<i>clpC</i>	
	ClpE	1	<i>clpE</i>	
	ClpP	1	<i>clpP</i>	
	SodB	1	<i>sodB</i>	
	Trigger factor	1	<i>tig/ropA</i>	
Others	Dispersin	2	<i>aatC</i>	
Total		100		

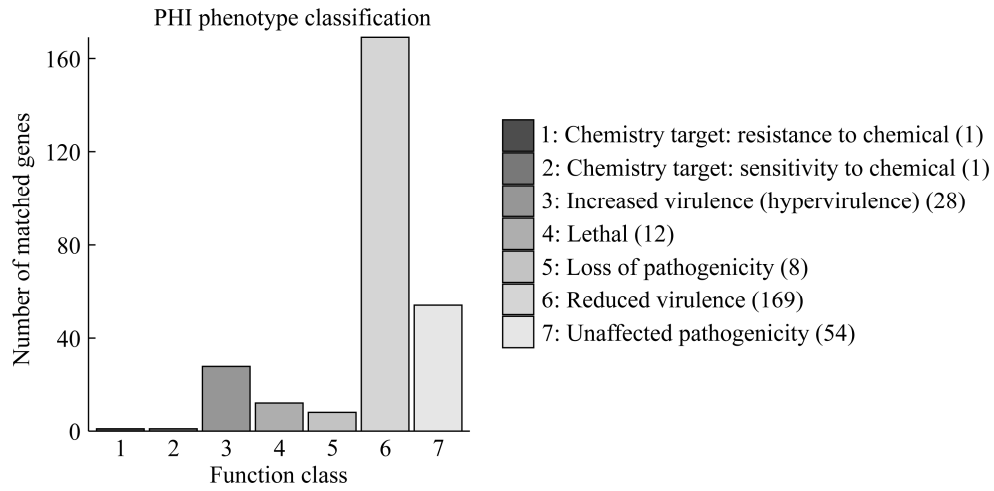


图 15 菌株 Bov5 基因组的 PHI 注释结果统计图

Figure 15 Statistical map of PHI annotation results of strain Bov5 genome.

表 3 耐药基因注释结果

Table 3 Results of drug resistance gene annotation

Classification of drug resistance	Antibiotic resistance genes	Number of gene species
Fluoroquinolone antibiotic	<i>arlR; arlS; cdeA; efrA; efrB; mfd; patB; PmpM; pmrA</i>	9
Macrolide antibiotic	<i>efrA; efrB; lmrP; macB; mel; mefA; msrB; RlmA(II)</i>	8
Peptide antibiotic	<i>arnA; bacA; bcrA; Efac_cls_DAP; PmrF; tsnR; ugd</i>	7
Glycopeptide antibiotic	<i>vanE; vanH_in_vanO_cl; vanR_in_vanB_cl; vanR_in_vanF_cl; vanS_in_vanB_cl; vanT_in_vanG_cl</i>	6
Lincosamide antibiotic	<i>lmrD; lmrP; lnuB; lsaE; RlmA(II); salA</i>	6
Streptogramin antibiotic	<i>lmrP; lsaE; mel; mefA; msrB; salA</i>	6
Disinfecting agents and antiseptics	<i>arlR; arlS; cdeA; PmpM; sav1866</i>	5
Tetracycline antibiotic	<i>lmrP; tet(T); tetA(60); tetB(60); tetB(P)</i>	5
Aminoglycoside antibiotic	<i>ant(6)-Ia; ant(9)-Ia; baeS; PmpM</i>	4
Pleuromutilin antibiotic	<i>lsaE; salA; TaeA</i>	3
Aminocoumarin antibiotic	<i>baeS; Sris_pary_AMU;</i>	2
Rifamycin antibiotic	<i>efrA; efrB</i>	2
Streptogramin A antibiotic	<i>lmrP; salA</i>	2
Carbapenem	<i>Spne_PBP2x_AMX</i>	1
Cephalosporin	<i>Spne_PBP2x_AMX</i>	1
Cephamycin	<i>Spne_PBP2x_AMX</i>	1
Diaminopyrimidine antibiotic	<i>dfrA3</i>	1
Monobactam	<i>Spne_PBP2x_AMX</i>	1
Mupirocin-like antibiotic	<i>Bbif_ileS_MUP</i>	1
Penam	<i>Spne_PBP2x_AMX</i>	1
Phosphonic acid antibiotic	<i>Mtub_murA_FOF</i>	1
Streptogramin B antibiotic	<i>msrB</i>	1
Sulfonamide antibiotic	<i>sul3</i>	1
Sulfone antibiotic	<i>sul3</i>	1

最多的基因是 *macB*、其次是 *arlR* 和 *TaeA*，这 3 个基因都属于外排泵基因。而药敏试验结果 (表 4) 显示该菌株对林可霉素类的林可霉素和克林霉素耐药，对氨基糖苷类的链霉素显示为中介，而对阿米卡星敏感，对其余测试的抗生素均敏感。

### 3 讨论与结论

自 1999 年 Devriese 等<sup>[1]</sup>首次报道多动物链球菌及其在多种宿主中的致病性以来，研究表明，该菌可感染多种动物导致多种临床症状，在人类患者中也有分离，显示其较强的宿主适应能力。本研究通过菌株 Bov5 对兔子进行攻毒实验，确认该菌可定殖于呼吸道，引起炎症和肺部病变，说明该菌株对兔具有一定的致病

性，与前人研究结果一致。然而也有研究指出，该菌能与其他致病菌相拮抗，对机体有益。如多动物链球菌 2N12 通过过氧化氢对抗胸膜肺炎不动杆菌<sup>[16]</sup>，具有潜在保护作用。这可能与该菌和其他种属菌株之间对生态位的种群竞争有关，如注释到的细菌素基因有利于细菌在生存竞争中占据有利位置。总而言之，不同菌株、不同宿主以及宿主抵抗力的差异都可能影响该菌与宿主的相互作用，从而有不同表现，因而其与宿主之间潜在复杂相互作用仍需深入研究。

细菌与宿主细胞的相互作用起始于黏附过程，这是细菌定殖和进一步侵袭的关键前提。在这一过程中，菌株 Bov5 基因组中的 FBPs、EF-Tu、GroEL、SlrA、GAPDH 等黏附相关毒力因子可能具有重要作用。纤连蛋白结合蛋白 (FBPs) 可与纤连蛋白结合，促进胶原募集，导致链球菌与宿主细胞表面基质的沉积，诱导细菌聚团以及进一步定植。研究表明，纤连蛋白结合蛋白 Fbp54 在化脓性链球菌 (*Streptococcus pyogenes*) 中普遍表达<sup>[17]</sup>，并可能与肝腹脓肿有关<sup>[18]</sup>。EF-Tu 除参与细菌翻译延伸过程外，在多种致病微生物<sup>[19-20]</sup>中还可作为纤连蛋白/层粘连蛋白结合蛋白与宿主细胞相黏附。分子伴侣 GroEL 可响应热休克，在阪崎克洛诺斯杆菌 (*Cronobacter sakazakii*) 中，GroEL 可增强细菌对细胞的黏附和侵袭能力，促进炎性细胞浸润，并有助于生物膜形成<sup>[21]</sup>。链球菌脂蛋白轮状酶 A (SlrA) 则可作为分子伴侣帮助分泌蛋白正确折叠，有利于细菌定殖和致病性的表现<sup>[22]</sup>。在链球菌中，甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 不仅参与糖酵解途径，也可与多种宿主成分相互作用影响细菌定殖<sup>[23]</sup>，结合血红蛋白和血红素<sup>[24]</sup>，并参与细菌的免疫逃逸<sup>[25]</sup>，从而有助于细菌在宿主体内的生存和繁殖。总而言之，这些黏附相

表 4 药敏试验结果

Table 4 Results of drug susceptibility test

药物 Drug	含量 Content ( $\mu\text{g}/\text{tablet}$ )	抑菌圈直径 IZD/mm	结果 Result
阿米卡星 Amikacin	30	23	S
链霉素 Streptomycin	10	13	I
阿奇霉素 Azithromycin	15	18	S
万古霉素 Vancomycin	30	18	S
恩诺沙星 Enrofloxacin	10	26	S
诺氟沙星 Norfloxacin	10	17	S
复方新诺明 Cotrimoxazole	23.75/1.25	19	S
林可霉素 Lincomycin	2	-	R
克林霉素 Clinomycin	2	13	R
美罗培南 Meropenem	10	36	S
氨苄西林 Ampicillin	10	31	S
头孢唑林 Cefazolin	30	22	S
头孢曲松 Ceftriaxone	30	27	S
头孢拉定 Cefradine	30	31	S
米诺环素 Minocycline	30	24	S
氟苯尼考 Florfenicol	30	29	S

-: No inhibition zone. S: Highly susceptible; I: Intermediately susceptible; R: Resistant.

关毒力因子可能有助于菌株 Bov5 与宿主细胞之间的黏附。

除黏附相关毒力因子外,该菌株也可产生多种外泌酶,包括 CppA、HtrA、SrtA 和烯醇化酶等。研究表明,C3 降解蛋白酶 CppA 有助于肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)在鼻咽的传播<sup>[26]</sup>,并降低血链球菌对 C3b 沉积的敏感性<sup>[27]</sup>。细菌丝氨酸蛋白酶 HtrA 作为热休克蛋白酶,参与维持细菌周质中蛋白质稳态,并能切割细胞 E-钙黏蛋白,破坏上皮屏障完整性<sup>[28]</sup>,有利于肺炎链球菌的鼻咽定殖<sup>[29]</sup>,并能在多种病原体中诱导促炎免疫反应<sup>[30-31]</sup>。此外,链球菌中分选酶 A (SrtA)可通过识别特定基序介导毒力因子锚定,从而参与致病性<sup>[32]</sup>。猪链球菌中的烯醇化酶可促进人脑微血管内皮细胞凋亡,血脑屏障通透性增加,促进链球菌的易位,从而促进脑膜炎疾病进展<sup>[33-34]</sup>。另外,外毒素中的溶细胞素和溶血素可损伤宿主细胞,对链球菌致病性也有贡献。在免疫调节方面,主要的毒力因子是荚膜多糖,具有抵抗补体沉积的功能,避免细菌被吞噬细胞上的补体受体识别,有助于细菌免疫逃逸。

另有研究表明<sup>[35-36]</sup>,HtrA、CbpD 和 SlrA 均参与细菌鼻咽定殖,ClpP 与上皮黏附有关,明确参与宿主肺部炎症反应的毒力因子则有 HtrA、ClpP 和 CbpD。综上所述,结合对兔肺感染的组织病理分析,菌株 Bov5 感染引起的肺部炎性细胞浸润、肺间隔增厚、功能受损以及机体死亡,可能与这些毒力因子的综合作用有关,但仍需进一步验证。

CARD 数据库注释结果表明,菌株 Bov5 中耐药基因共 47 种,涵盖氟喹诺酮类、大环内酯类、糖肽类、林可酰胺类、链霉素、四环素、氨基糖苷类、碳青霉烯类、头孢菌素、磺胺类等多种抗生素的抗性,其中,*ant(6)-Ia*、

*ant(9)-Ia*、*lsaE*、*lnuB*、*mel*、*mefA* 基因序列一致性值超过 0.9,显示对氨基糖苷类、林可酰胺类、大环内酯类抗生素的耐药潜力。然而,药敏试验结果显示该菌株仅对林可酰胺类耐药,对链霉素中介,而对其他测试的抗生素敏感,这种差异有必要深入探究。其中,万古霉素耐药基因簇中其他必需基因的缺失可能导致细菌不表现对万古霉素的耐药性。*ant(6)-Ia* 位于该菌株基因岛中,在该基因岛中还存在 ANT(9)家族氨基糖苷核酸转移酶 *Spw* 基因以及转座酶基因,说明该耐药基因存在水平基因转移。研究表明该基因可导致链霉素的耐药<sup>[37]</sup>,这在药敏试验结果中得到验证。*ant(9)-Ia* 可介导四环素类的大观霉素耐药<sup>[38]</sup>,但在药敏试验中并未检验。此外,*lsaE* 作为多药耐药基因,可编码 ABC-F 蛋白<sup>[39]</sup>,可外排抗生素,具有林可酰胺类、截短侧耳素、链阳菌素耐药性;*lnuB* 同样具有林可酰胺类耐药性,可编码林可酰胺核苷酸转移酶<sup>[39]</sup>从而灭活此类抗生素,这在药敏试验中有所体现。*mel* 也称 *msrD*,可编码 *msr*-type ABC-F 类蛋白,具有大环内酯类和链阳菌素类抗生素耐药性。研究表明,*mefA* 和 *mel* 可作为外排泵系统协同实现对 14 元与 15 元环大环内酯类药物的外排,并负责大环内酯类耐药的 M 表型<sup>[40]</sup>,但其耐药水平较低,并且文献中记录为红霉素耐药<sup>[41]</sup>,这可能是药敏试验中未显示耐药性的部分原因。另外,对于菌株 Bov5 基因组中注释到的部分耐药基因,可能基因突变等因素导致基因不表达,显示出基因与具体耐药表型不一致。尽管如此,该菌株中耐药基因的耐药范围之广泛,仍值得关注。

综上所述,本研究分离获得一株多动物链球菌 Bov5,该菌株对新西兰兔具有致病性,可引起肺组织以中性粒细胞为主的炎性细胞浸润及肺间隔增厚。菌株 Bov5 仅对林可酰胺类抗

生素耐药。经二代测序组装,得到菌株基因组草图,基因组总长度 2.04 Mb, G+C 含量 38.8%, 编码基因共计 1 981 个, 非编码 RNA 65 个, 注释到毒力因子 100 个, 抗生素抗性基因 83 个, 显示其致病和耐药潜力。这些结果为后续深入研究多动物链球菌的致病机制以及耐药性特征等提供了参考资料。

## REFERENCES

- [1] DEVRIESE LA, VANDAMME P, COLLINS MD, ALVAREZ N, POT B, HOMMEZ J, BUTAYE P, HAESBROUCK F. *Streptococcus pluranimalium* sp. nov., from cattle and other animals[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 1999, 49(3): 1221-1226.
- [2] de OLIVEIRA RP, ARAGÃO BB, de MELO RPB, da SILVA DMS, de CARVALHO RG, JULIANO MA, FARIAS MPO, de LIRA NSC, MOTA RA. Bovine mastitis in northeastern Brazil: occurrence of emergent bacteria and their phenotypic and genotypic profile of antimicrobial resistance[J]. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases, 2022, 85: 101802.
- [3] FU DJ, RAMACHANDRAN A, MILLER C. *Streptococcus pluranimalium* meningoencephalitis in a horse[J]. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc, 2021, 33(5): 956-960.
- [4] CRISPO M, SHIVAPRASAD HL, COOPER GL, BICKFORD AA, STOUTE ST. Streptococcosis in commercial and noncommercial avian species in California: 95 cases (2000–2017)[J]. Avian Diseases, 2018, 62(2): 152-162.
- [5] 王冰艺, 马弘财, 邹明昊, 樊世杰, 元振杰, 拉巴次仁, 董海龙, 曾江勇. 牦牛源链球菌的分离鉴定及耐药性分析[J]. 中国畜牧兽医, 2023, 50(2): 745-753. WANG BY, MA HC, ZOU MH, FAN SJ, YUAN ZJ, LABACIREN, DONG HL, ZENG JY. Isolation, identification and drug resistance analysis of *Streptococcus* from yak[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2023, 50(2): 745-753 (in Chinese).
- [6] 王丽扬, 王铎皓, 许倩倩, 高尚, 王鹏勇, 王彦红. 3 株猪源多动物链球菌的分离与鉴定[J]. 中国兽医杂志, 2020, 56(3): 109-111, 116, 138. WANG LY, WANG XH, XU QQ, GAO S, WANG PY, WANG YH. Isolation and identification of three strains of *Streptococcus pluranimalium*[J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2020, 56(3): 109-111, 116, 138 (in Chinese).
- [7] 董文龙, 王巍, 耿昕颖, 勾长龙, 盛宇轩, 王雪, 马红霞, 高云航. 山羊源多动物链球菌的分离与鉴定[J]. 上海交通大学学报(农业科学版), 2016, 34(5): 23-26, 40. DONG WL, WANG W, GENG XY, GOU CL, SHENG YX, WANG X, MA HX, GAO YH. Isolation and identification of *Streptococcus pluranimalium* from goat[J]. Journal of Shanghai Jiao Tong University (Agricultural Science), 2016, 34(5): 23-26, 40 (in Chinese).
- [8] 张总超, 阚威, 林元清, 王云平. 岩羊多动物链球菌分离鉴定及药酶试验研究[J]. 现代畜牧兽医, 2021(4): 49-53. ZHANG ZC, KAN W, LIN YQ, WANG YP. Isolation, identification and drug sensitive test of *Streptococcus pluranimalium* from *Pseudois nayaur*[J]. Modern Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2021(4): 49-53 (in Chinese).
- [9] GHAZVINI K, KARBALAEI M, KIANIFAR H, KEIKHA M. The first report of *Streptococcus pluranimalium* infection from Iran: a case report and literature review[J]. Clinical Case Reports, 2019, 7(10): 1858-1862.
- [10] MAHER G, BENIWAL M, BAHUBALI V, BISWAS S, BEVINAHALLI N, SRINIVAS D, SIDDAIAH N. *Streptococcus pluranimalium*: emerging animal streptococcal species as causative agent of human brain abscess[J]. World Neurosurgery, 2018, 115: 208-212.
- [11] PAN YS, AN HR, FU T, ZHAO SY, ZHANG CW, XIAO GH, ZHANG JR, ZHAO XF, HU GZ. Characterization of *Streptococcus pluranimalium* from a cattle with mastitis by whole genome sequencing and functional validation[J]. BMC Microbiology, 2018, 18(1): 182.
- [12] VAILLANCOURT K, LeBEL G, FITTIPALDI N, FRENETTE M, GOTTSCHALK M, GRENIER D. Identification and characterization of a two-peptide class IIb bacteriocin in *Streptococcus pluranimalium* isolated from the nasal cavity of a healthy pig[J]. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 2022, 14(1): 204-215.

- [13] HUMPHRIES R, BOBENCHIK AM, HINDLER JA, SCHUETZ AN. Overview of changes to the clinical and laboratory standards institute *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing*, M100, 31st edition[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2021, 59(12): e0021321.
- [14] PÓNTIGO F, MORAGA M, FLORES SV. Molecular phylogeny and a taxonomic proposal for the genus *Streptococcus*[J]. *Genetics and Molecular Research*, 2015, 14(3): 10905-10918.
- [15] URBAN M, CUZICK A, SEAGER J, WOOD V, RUTHERFORD K, VENKATESH SY, SAHU J, IYER SV, KHAMARI L, de SILVA N, MARTINEZ MC, PEDRO H, YATES AD, HAMMOND-KOSACK KE. PHI-base in 2022: a multi-species phenotype database for Pathogen-Host Interactions[J]. *Nucleic Acids Research*, 2022, 50(D1): D837-D847.
- [16] VAILLANCOURT K, FRENETTE M, GOTTSCHALK M, GRENIER D. *Streptococcus pluranimalium* 2N12 exerts an antagonistic effect against the swine pathogen *Actinobacillus pleuropneumoniae* by producing hydrogen peroxide[J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2021, 8: 787241.
- [17] WALKER MJ, BARNETT TC, McARTHUR JD, COLE JN, GILLEN CM, HENNINGHAM A, SRIPRAKASH KS, SANDERSON-SMITH ML, NIZET V. Disease manifestations and pathogenic mechanisms of Group A *Streptococcus*[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2014, 27(2): 264-301.
- [18] SINHA D, SUN XF, KHARE M, DRANCOURT M, RAOULT D, FOURNIER PE. Pangenome analysis and virulence profiling of *Streptococcus intermedius*[J]. *BMC Genomics*, 2021, 22(1): 522.
- [19] SU YC, MATTSSON E, SINGH B, JALALVAND F, MURPHY TF, RIESBECK K. The laminin interactome: a multifactorial laminin-binding strategy by nontypeable *Haemophilus influenzae* for effective adherence and colonization[J]. *The Journal of Infectious Diseases*, 2019, 220(6): 1049-1060.
- [20] YU YF, WANG HE, WANG J, FENG ZX, WU M, LIU BB, XIN JQ, XIONG QY, LIU MJ, SHAO GQ. Elongation factor thermo unstable (EF-tu) moonlights as an adhesin on the surface of *Mycoplasma hyopneumoniae* by binding to fibronectin[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 974.
- [21] ZHU DD, FAN YF, WANG XY, LI P, HUANG YP, JIAO JB, ZHAO CM, LI Y, WANG S, DU XJ. Characterization of molecular chaperone GroEL as a potential virulence factor in *Cronobacter sakazakii*[J]. *Foods*, 2023, 12(18): 3404.
- [22] GEORGE JL, AGBAVOR C, CABO LF, CAHOON LA. *Streptococcus pneumoniae* secretion chaperones PrsA, SlrA, and HtrA are required for competence, antibiotic resistance, colonization, and invasive disease[J]. *Infection and Immunity*, 2024, 92(2): e0049023.
- [23] KAINULAINEN V, KORHONEN TK. Dancing to another tune-adhesive moonlighting proteins in bacteria[J]. *Biology*, 2014, 3(1): 178-204.
- [24] VÁZQUEZ-ZAMORANO ZE, GONZÁLEZ-LÓPEZ MA, ROMERO-ESPEJEL ME, AZUARA-LICEAGA EI, LÓPEZ-CASAMICHANA M, de JESÚS OLIVARES-TREJO J. *Streptococcus pneumoniae* secretes a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, which binds haemoglobin and haem[J]. *Biometals: an International Journal on the Role of Metal Ions in Biology, Biochemistry, and Medicine*, 2014, 27(4): 683-693.
- [25] OLIVEIRA L, MADUREIRA P, ANDRADE EB, BOUABOUD A, MORELLO E, FERREIRA P, POYART C, TRIEU-CUOT P, DRAMSI S. Group B streptococcus GAPDH is released upon cell lysis, associates with bacterial surface, and induces apoptosis in murine macrophages[J]. *PLoS One*, 2012, 7(1): e29963.
- [26] ROWE HM, KARLSSON E, ECHLIN H, CHANG TC, WANG L, van OPIJNEN T, POUNDS SB, SCHULTZ-CHERRY S, ROSCH JW. Bacterial factors required for transmission of *Streptococcus pneumoniae* in mammalian hosts[J]. *Cell Host & Microbe*, 2019, 25(6): 884-891.e6.
- [27] ALVES LA, NAVEED H, FRANCO EM, GARCIA MT, FREITAS VA, JUNQUEIRA JC, BASTOS DC, ARAUJO TLS, CHEN T, MATTOS-GRANER RO. PepO and CppA modulate *Streptococcus sanguinis* susceptibility to complement immunity and virulence[J]. *Virulence*, 2023, 14(1): 2239519.
- [28] ABFALTER CM, SCHUBERT M, GÖTZ C, SCHMIDT TP, POSSELT G, WESSLER S. HtrA-mediated E-cadherin cleavage is limited to DegP and DegQ homologs expressed by gram-negative pathogens[J]. *Cell Communication and Signaling*, 2016, 14(1): 30.
- [29] ALI MQ, KOHLER TP, BURCHHARDT G, WÜST A, HENCK N, BOLSMANN R, VOß F, HAMMERSCHMIDT S. Extracellular pneumococcal serine proteases affect nasopharyngeal colonization[J].

- Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2021, 10: 613467.
- [30] XU K, ZHAO Q, JIANG HZ, MOU XR, CHANG YF, CAO YQ, MIAO C, WU R, WEN YP, HUANG XB, YAN QG, DU SY, CAO SJ. Molecular and functional characterization of HtrA protein in *Actinobacillus pleuropneumoniae*[J]. Veterinary Microbiology, 2021, 257: 109058.
- [31] de STOPPELAAR SF, BOOTSMA HJ, ZOMER A, ROELOFS JJTH, HERMANS PWM, van 'T VEER C, van der POLL T. *Streptococcus pneumoniae* serine protease HtrA, but not SFP or PrtA, is a major virulence factor in pneumonia[J]. PLoS One, 2013, 8(11): e80062.
- [32] KATSUMATA T, LE MNT, KAWADA-MATSUO M, TANIGUCHI Y, OUHARA K, OOGAI Y, NAKATA M, MIZUNO N, NISHITANI Y, KOMATSUZAWA H. Comprehensive characterization of sortase A-dependent surface proteins in *Streptococcus mutans*[J]. Microbiology and Immunology, 2022, 66(3): 145-156.
- [33] JIANG HX, SUN Y, LI FY, YU XB, LEI SY, DU SL, WU T, JIANG X, ZHU JH, WANG J, JI YL, LI N, FENG X, GU JM, HAN WY, ZENG L, LEI LC. Enolase of *Streptococcus suis* serotype 2 promotes biomolecular condensation of ribosomal protein SA for HBMECs apoptosis[J]. BMC Biology, 2024, 22(1): 33.
- [34] WU T, JIA L, LEI SY, JIANG HX, LIU JN, LI N, LANGFORD PR, LIU HT, LEI LC. Host HSPD1 translocation from mitochondria to the cytoplasm induced by *Streptococcus suis* serovar 2 enolase mediates apoptosis and loss of blood-brain barrier integrity[J]. Cells, 2022, 11(13): 2071.
- [35] LOUGHRAN AJ, ORIHUELA CJ, TUOMANEN EI. *Streptococcus pneumoniae*: invasion and inflammation[J]. Microbiology Spectrum, 2019, 7(2): 10.
- [36] KWON HY, OGUNNIYI AD, CHOI MH, PYO SN, RHEE DK, PATON JC. The ClpP protease of *Streptococcus pneumoniae* modulates virulence gene expression and protects against fatal pneumococcal challenge[J]. Infection and Immunity, 2004, 72(10): 5646-5653.
- [37] HORMEÑO L, UGARTE-RUIZ M, PALOMO G, BORGE C, FLOREZ-CUADRADO D, VADILLO S, PÍRIZ S, DOMÍNGUEZ L, CAMPOS MJ, QUESADA A. *ant(6)-I* genes encoding aminoglycoside O-nucleotidyltransferases are widely spread among streptomycin resistant strains of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 2515.
- [38] AZUCENA E, MOBASHERY S. Aminoglycoside-modifying enzymes: mechanisms of catalytic processes and inhibition[J]. Drug Resistance Updates: Reviews and Commentaries in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy, 2001, 4(2): 106-117.
- [39] FEBLER AT, WANG Y, WU CM, SCHWARZ S. Mobile lincosamide resistance genes in staphylococci[J]. Plasmid, 2018, 99: 22-31.
- [40] VILLALÓN P, BÁRCENA M, MEDINA-PASCUAL MJ, GARRIDO N, PINO-ROSA S, CARRASCO G, VALDEZATE S. National surveillance of tetracycline, erythromycin, and clindamycin resistance in invasive *Streptococcus pyogenes*: a retrospective study of the situation in Spain, 2007–2020[J]. Antibiotics, 2023, 12(1): 99.
- [41] POWELL LM, CHOI SJ, CHIPMAN CE, GRUND ME, LaSALA PR, LUKOMSKI S. Emergence of erythromycin-resistant invasive group A *Streptococcus*, west Virginia, USA, 2020–2021[J]. Emerging Infectious Diseases, 2023, 29(5): 898-908.