

密 级： 公开

学校代码： 10693

# 西藏农牧学院

## 硕士学位论文



### 日喀则市羊链球菌流行病学调查及病原生物学特性研究

姓 名： 马弘财

学 号： 202100200137

领 域： 兽医

研究方向： 高原动物传染病学

指导教师： 吴庆侠

校外导师： 曾江勇

学 院： 动物科学学院

完成日期： 2023年5月

中国 西藏 林芝

Confidentiality level: public

University code:

Thesis for Master's Degree  
Tibet Agricultural and Animal Husbandry University

*EPIDEMIOLOGICAL INVESTIGATION AND PATHOGEN  
BIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF STREPTOCOCCUS  
SHEEP IN SHIGATSE CITY*

Name of Postgraduate :	<u>Ma Hongcai</u>
Postgraduate number :	<u>202100200137</u>
Field :	<u>Veterinarian</u>
Research direction :	<u>Plateau animal infectious disease</u>
Adviser :	<u>Wu Qingxia</u>
Off-campus supervisor:	<u>Zeng Jiangyong</u>
Department(Part) :	<u>College of Animal Science</u>
Date of submission :	<u>May,2023</u>

Linzhi Tibet China

# 资金项目

“西藏自治区重点研发项目”：  
西藏地区牦牛专用抗春季腹泻病益生菌制剂的研发  
(XZ201902NB05)

“十四五重大科技专项”：  
牦牛重要疫病防控技术研究--牦牛主要传染病快速检测方法建立及防  
控技术研究  
(XZ202101ZD0002N-05)

“国家自然科学基金”：  
乳酸杆菌靶向 MAPK/Zonulin 信号轴调节牦牛肠道黏膜屏障及病原菌  
易位的作用机制  
(32160857)

“国家自然科学基金”：  
miR-128 靶向 GAREM 调控 ERK/MAPK 信号通路影响牦牛子宫内膜炎  
症损伤的分子机制  
(32060820)

“西藏自治区自然科学基金项目”：  
牦牛子宫内膜炎差异 miRNAs 表达谱的筛选及其调控机制研究  
(XZ202101ZR0024G)

## 摘要

日喀则市羊的存栏量占全区羊存栏量的 1/3 以上，所以养羊业在日喀则农牧民的生产生活中起着关键作用。而羊链球菌是危害日喀则羊养殖业健康、绿色发展的重要因素之一，也严重影响着当地农牧民的经济收入。为今后更好地防治该病，并为其提供科学的用药方案，本研究从羊链球菌的流行病学调查、病原的分离鉴定及高致病株的全基因组分析了该病的生物学特性，为该病的防控提供科学的理论基础。主要研究内容如下：

### 1 日喀则市羊链球菌病的血清学流行病学调查

为掌握西藏日喀则部分主要养羊县（区）羊链球菌的流行现状，于 2020~2021 在日喀则地区养羊比较集中 5 个县（区）共采集羊血清 1458 份，通过酶联免疫吸附试验（ELISA）进行羊链球菌抗原检测，并用 R 软件对不同年龄、性别、品种、海拔、采样年份及不同饲养模式的羊进行统计学分析。结果显示：日喀则地区羊链球菌的个体阳性率为 6.93%（101/1458），群体阳性率为 84%（42/50）。统计分析结果显示：2020 年的羊链球菌个体阳性率和 2021 年羊链球菌差异显著（OR=2.16,95%CI: 1.39%~3.39%）；海拔较低（<4000m）地区羊的个体阳性率与高海拔地区（>4000m）羊链球菌的个体阳性率差异显著（OR=0.62,95%CI:0.41,0.93）；养殖场羊链球菌的个体阳性率与牧户羊链球菌的个体阳性率差异显著（OR=2.64,95%CI=1.71%~4.10%）。结果表明：羊链球菌病在日喀则地区还是呈现普遍流行，无年龄、性别、品种及海拔的差异。建议当地养殖户应加强对羊的饲养管理和疫苗免疫，提高当地羊的免疫力。

### 2 日喀则市羊链球菌的分离鉴定及生物学特性研究

为探究日喀则地区羊感染链球菌的现状及链球菌的相关生物学特性，通过链球菌分离培养，PCR 鉴定和 16SrRNA 序列扩增测序，对分离的菌株进行药敏试验和分群实验。结果显示，从 42 份鼻拭子分离得到 16 株羊链球菌，分离率为 38.10%（16/42），其中羊源黄体链球菌有 9 株，羊源马链球菌 5 株，1 株为羊源多动物链球菌，1 株为羊源小链球菌，黄体链球菌（56.25%）为优势菌株；另外通过溶血性试验发现 1 株呈 $\beta$ 溶血，其余均呈 $\alpha$ 溶血，血清群分群试验显示：16 株链球菌中 14 株为 C 群链球菌，其余 2 株为 D 群链球菌，C 群为该地区流行的优势群组。 $\beta$ 溶血性链球菌对小鼠的致死率为 100%，其中该菌株的半数致死量

(LD<sub>50</sub>) 为  $4.86 \times 10^6$  CFU/ml,  $\alpha$ 溶血性链球菌能引起小鼠轻度腹泻。分离菌株的药敏试验结果表明: 16 株链球菌对多西环素、氯霉素、克林霉素、氧氟沙星、万古霉素和青霉素等 10 种抗生素的敏感率在 50%~100%, 而对多粘菌素 B、卡那霉素、头孢呋辛、庆大霉素、丁胺卡那耐药率在 50%以上。本研究了日喀则地区羊源链球菌的部分生物学特性, 为今后更好地防控和治疗该病奠定了理论基础。

### 3 1 株羊源马链球菌的全基因组测序及分析

采用 Illumina MiSeq 高通量测序方法对强毒株—羊源马链球菌进行全基因组测序。结果显示, 该马链球菌的全基因总长为 2272497bp, G+C 的含量为 41.1%, 预测含有 2124 个编码基因, 对 RNA 预测结果显示: 5S rRNA、16S rRNA、23S rRNA 的数量均为 5 个, tRNA 数量为 57 个, 4 个前噬菌体, 同时也检测到该菌株有 4 个毒力基因。

**关键词:** 羊链球菌, 生物学特性, 基因组学, 分离鉴定, 日喀则市

## Abstract

The stock of sheep in Shigatse accounts for more than 1 / 3 of the total, so the sheep industry plays a key role in the production and life of farmers and herdsmen in Shigatse. Streptococcus sheep is one of the important factors that endanger the health and green development of Shigatse sheep breeding industry, and it also seriously affects the economic income of local farmers and herdsmen. In order to better prevent and control the disease in the future, and to provide a scientific drug use plan, this study analyzed the biological characteristics of the disease from the epidemiological investigation of Streptococcus sheep, the isolation and identification of pathogens and the whole genome of highly pathogenic strains, so as to provide a scientific theoretical basis for the prevention and control of the disease. The main research contents are as follows:

### 1 Seroepidemiological investigation of Streptococcosis in Sheep in Shigatse City

In order to understand the epidemic situation of Streptococcus sheeps in some main sheep breeding counties (districts) in Shigatse, Tibet, 1458 sheep serum samples were collected from 5 counties (districts) in Shigatse from 2020 to 2021. Streptococcus antigens were detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), and R software was used to analyze the sheep of different age, sex, breed, altitude, sampling year and different feeding mode. The results showed that the individual positive rate of Streptococcus sheeps in Shigatse was 6.93% (101 hand 1458), and the population positive rate was 82% (41). The results of statistical analysis showed that the individual positive rate of Streptococcus in 2020 was significantly different from that in 2021 (OR=2.16,95%CI:1.39%~3.39%), and that of sheep in low altitude (< 4000m) was significantly different from that in high altitude (> 4000m) (OR=0.62,95%CI:0.41,0.93). The individual positive rate of Streptococcus sheep in farms was significantly different from that of sheep streptococci in herdsmen (OR=2.64,95%CI=1.71% ~ 4.10%). The results showed that sheep streptococcosis was still prevalent in Xigaze area, and there was no difference in age, sex, breed and altitude. It is suggested that local farmers

should strengthen the feeding management and vaccine immunity of sheep so as to improve the immunity of local sheep.

## 2 Isolation, Identification and Biological characteristics of Streptococcus from Sheep in Shigatse City

In order to explore the current situation of streptococci infection in sheep in Shigatse area and the related biological characteristics of streptococci, the isolated strains were tested for drug sensitivity and grouping by isolation and culture, PCR identification and 16SrRNA sequence amplification and sequencing. The results showed that 16 strains of *Streptococcus aureus* were isolated from 42 nose swabs, and the isolation rate was 38.10%. Among them, there were 9 strains of *Streptococcus luteinus*, 5 strains of *Streptococcus equi*, 1 strain of *Streptococcus multianimal*, 1 strain of *Streptococcus micrococcus*, and 56.25% of *Streptococcus luteum*. In addition, through the hemolysis test, it was found that 1 strain showed  $\beta$  hemolysis and the others showed  $\alpha$  hemolysis. The serum group grouping test showed that 14 strains of 16 strains of streptococcus were group C streptococci, the other 2 strains were group D streptococci, and group C was the dominant group prevalent in this area. The lethal rate of  $\beta$ -hemolytic streptococcus to mice was 100%, in which the  $LD_{50}$  of the strain was  $4.86 \times 10^6$ CFU/ml.  $\alpha$ -hemolytic streptococcus could cause mild diarrhea in mice. The results of drug sensitivity test of isolated strains showed that the sensitive rate of 16 streptococci to 10 antibiotics such as doxycycline, chloramphenicol, clindamycin, ofloxacin, vancomycin and penicillin was 50% to 100%. The resistance rate to polymyxin B, kanamycin, cefuroxime, gentamicin and amikacin was more than 50%. This study studied some biological characteristics of *Streptococcus* from sheep in Shigatse area, which laid a theoretical foundation for better prevention, control and treatment of the disease in the future.

## 3 Sequencing and Analysis of the whole Genome of *Streptococcus equis* isolated from Sheep

The whole genome of *Streptococcus equis* isolated from sheep was sequenced by IlluminaMiSeq high-throughput sequencing. The results showed that the total length of the whole gene of *Streptococcus equi* was 2272497 BP, the content of Genec was 41.1%, and it was predicted to

contain 2124 coding genes. The prediction results of RNA showed that the number of 5SrRNA, 16SrRNA and 23SrRNA was 5, the number of tRNA was 57, and 4 pre-changes were detected. 4 virulence genes were also detected.

Key words: Streptococcus sheep, Biological characteristics, Genomics, Isolation and identification, Shigatse City



# 目 录

第一章 文献综述 .....	1
1.1 西藏羊传染病的研究现状 .....	1
1.2 链球菌的研究进展 .....	1
1.2.1 病原学 .....	3
1.2.2 链球菌的分类 .....	4
1.2.3 链球菌的抵抗力 .....	5
1.2.4 链球菌病的流行病学 .....	5
1.2.5 临床症状 .....	6
1.2.6 病理变化 .....	7
1.2.7 免疫性 .....	7
1.2.8 链球菌的致病机理 .....	7
1.2.9 链球菌的诊断方法 .....	11
1.3 研究的目的是和意义 .....	12
第二章 日喀则市羊链球菌病的血清学流行病学调查 .....	13
2.1 前言 .....	13
2.2 材料与方法 .....	14
2.2.1 待检血清 .....	14
2.2.2 主要仪器及试剂 .....	14
2.2.3 检测方法 .....	14
2.2.4 结果判定 .....	15
2.2.5 统计学分析 .....	15
2.3 结果 .....	15
2.4 讨论与分析 .....	16
第三章 日喀则羊源链球菌的分离鉴定及生物学特性研究 .....	18
3.1 前言 .....	18
3.2 材料与方法 .....	18
3.2.1 材料 .....	18
3.2.2 方法 .....	20
3.2.9 药敏试验 .....	21
3.3 结果 .....	23
3.3.1 细菌的分离培养与染色镜检 .....	23
3.3.2 分离菌株的生化试验结果 .....	23
3.3.3 分离菌株的 16SrRNA 基因扩增及序列分析 .....	24
3.3.4 分离菌株链球菌特异性片段 PCR 扩增 .....	25

3.3.5 羊链球菌 16SrRNA 系统发生树分析 .....	25
3.3.6 羊链球菌分群实验结果.....	26
3.3.7 溶血实验结果.....	27
3.3.8 羊链球菌分离株的毒力及羊源马链球菌的半数致死量(LD50) 实验结果 .....	27
3.3.9 死亡小鼠的病理切片结果.....	28
3.3.10 羊链球菌的药敏试验结果.....	29
3.4 讨论.....	30
第四章 1 株羊源马链球菌的全基因组测序及分析 .....	32
4.1 前言.....	32
4.2 材料与方法.....	32
4.2.1 待测菌株.....	32
4.2.2 方法.....	32
4.3 羊源马链球菌全基因组测序结果 .....	33
4.3.1 全基因组组装结果.....	33
4.3.2 基因组组分.....	34
4.3.3 专用数据库注释结果.....	36
4.3.4 蛋白亚细胞定位分析结果.....	39
4.3.5 基因组图谱.....	40
4.4 讨论.....	40
第五章 结论.....	41
参考文献.....	42

## 第一章 文献综述

### 1.1 西藏羊传染病的研究现状

西藏是我国五大牧区之一，畜牧业是西藏农牧民赖以生存的重要支柱，羊在牧民的生产生活中有着与牦牛同等重要的地位。随着近几年大力发展集约化养业，养殖规模和养殖密度也随之增大，加之西藏地处高原环境，气候多变、常年枯草期时间长，动物疫病防控力量薄弱，为动物传染病的发生和传播提供了便利。现阶段西藏动物疫病的研究主要集中在牦牛上，对羊病的研究相对较少，所研究的疫病种类也较少，但在农牧区，每年羊腹泻，呼吸道传染病等疫病时有发生。如索朗次旦等<sup>[1]</sup>和 Jian-Gang Ma<sup>[2]</sup>等在 1990 年和 2013~2014 年对西藏日喀则和林芝羊的蓝舌病（Bluetongue,BT）的检出率为 3.00%和 19.1%，刘亚刚等<sup>[3]</sup>和扎西次仁<sup>[4]</sup>等在 1995 年和 2019 年在西藏班戈县对羊布病(Brucellosis)的检出率为 16.41%和 2.86%，Ma Jian-Gang<sup>[5]</sup>等在 2013~2014 年对西藏羊源病毒性腹泻病毒（Bovine Viral Diarrhea Virus,BVDV）的检出率为 36.7%，冯旭飞<sup>[6]</sup>等通过从西藏羊肺脏流行病学研究发现，西藏绵羊肺炎流行呈上升趋势；2018~2020 年，杨晶晶<sup>[7]</sup>等人在拉萨羊巴氏杆菌（*Pasteurella multocida*,Pm）分离鉴定工作中共分离得到 8 株羊源巴氏杆菌，分离率为 22.22%，也有日喀则地区关于衣原体导致羊流产的报道<sup>[8]</sup>。虽然对于西藏羊传染病研究的并不多，但每年均有各种传染病的发生，因此，关于西藏羊传染疾病的研究任重而道远。

### 1.2 链球菌的研究进展

链球菌（*Streptococcus*）是革兰氏阳性菌，且为排列成链状的球菌。链球菌分布于我们生活的方方面面，土壤、水源和空气中等都存在该菌，也能从动物和人的生殖道、呼吸道、产道等器官均可检出<sup>[9]</sup>。链球菌属根据其致病性分为致病性链球菌（Pathogenic *Streptococcus*）和非致病性链球菌（Non pathogenic streptococcus）。在第九版《伯杰氏细菌分类手册》中，链球菌属有 38 个种<sup>[10]</sup>，而在《兽医微生物学》（原书第二版）<sup>[11]</sup>中被识别的有 55 个种，随着对链球菌属的深入研究，该属的种类已发展到超过 100 多种<sup>[12]</sup>。虽然链球菌属种类繁多，但对兽医学研究较为重要的有化脓性链球菌（*Streptococcus pyogenes*）、马链球菌马亚种（*Streptococcus equi* subsp. *equi*）、马链球菌兽疫亚种（*Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*）、无乳链球菌（*Streptococcus agalactiae*）、停乳链球菌停乳亚种（*Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*）、停乳链球菌似马亚种（*Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equimimima*）、乳房链球菌（*Streptococcus uberis*）、猪链球菌（*Streptococcus suis*）、猪肠道链球菌（*Streptococcus hyointestinalis*）和肺炎链球菌（*Streptococcus pneumoniae*）（见表 1-1）。根据抗原特异性不同，链球菌可分为 20 个血清群，A~V（缺 I 和 J），常见

的血清群为 A~G 群<sup>[13]</sup>。根据链球菌在鲜血琼脂培养基上的溶血性特性，链球菌可分为 $\alpha$ 溶血性链球菌、 $\beta$ 溶血性链球菌和 $\gamma$ 溶血性链球菌，目前研究和报道最多的是 $\beta$ 溶血性链球菌<sup>[14]</sup>。

羊链球菌病又称羊败血性链球菌病，是由 C 群马链球菌兽疫亚种或 D 群类马链球菌引起的一种急性、热性、败血性的人畜共患传染病<sup>[15-17]</sup>。1910 年德国的 Weimann 首先报道了绵羊败血性链球菌病，其病原为绵羊链球菌<sup>[18]</sup>，我国最早是由杨圣典<sup>[19]</sup>等在 1952 年从青海分离得到羊链球菌，经鉴定为 C 群兽疫链球菌；1953 年国外也从发病羊群中分离到 C 群兽疫链球菌<sup>[18]</sup>。近年来，随着各学者对羊链球菌研究的深入，发现羊链球菌也有 D 群和 E 群<sup>[20]</sup>兽疫链球菌的成员。羊链球菌病在我国西部地区存在已久，1950 年代初在青海流行，50 年代末传播至四川省，随后在新疆、甘肃、西藏等也开始相继流行该病<sup>[18]</sup>。近年来，随着对感染羊的链球菌的研究深入，感染羊的链球菌又出现其他种类，如多动物链球菌（*Streptococcus pluranimalium*）<sup>[21, 22]</sup>、小链球菌<sup>[23]</sup>（*Streptococcus minor*）等。

表 1-1 对兽医学研究有意义的链球菌

种类	群组	侵害畜种	症状
化脓性链球菌 <i>Streptococcus pyogenes</i>	A	人、啮齿类动物	咽炎、猩红热和脓疱病、坏死性筋膜炎、肾小球肾炎
马链球菌兽疫亚种 <i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i>	C.D	马、禽、狗、反刍动物、人	继发性肺炎、多发性脓疱
马链球菌马亚种 <i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>equi</i>	C	马	上呼吸道黏膜卡他性化脓性炎症、颌下淋巴结急性化脓性炎症
无乳链球菌 <i>Streptococcus agalactiae</i>	B	牛、羊	乳腺炎
停乳链球菌似马亚种 <i>Streptococcus dysgalactiae</i> subsp. <i>equimimima</i>	C.G	所有动物、人	菌血症、心内膜炎、脑膜炎、脓毒性关节炎呼吸道和皮肤感染
停乳链球菌停乳亚种 <i>Streptococcus dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i>	C	猪、牛	关节炎、心内膜炎甚至脑膜炎、跛行
乳房链球菌 <i>Streptococcus uberis</i>	—	牛	乳腺炎
猪链球菌 <i>Streptococcus suis</i>	R (2 型); S (1 型)	猪、人	新生感染、肺炎、败血症(人—关节炎、脑膜炎)
猪肠道链球菌 <i>Streptococcus hyointestinalis</i>	D	所有动物	尿道感染、雏鸡败血症
肺炎链球菌 <i>Streptococcus pneumoniae</i>	—	灵长类动物、牛	败血症、肺炎(人—中耳炎、脑膜炎)

## 1.2.1 病原学

### 1.2.1.1 链球菌的形态与染色

羊链球菌 (*Streptococcus ovis*) 属于链球菌属 (*Streptococcus*) 的马链球菌兽疫亚种 (*Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*)。链球菌为革兰氏阳性、无抗酸性细菌。细菌直径为  $0.5\mu\text{m}\sim 2\mu\text{m}$ ，细菌呈球形或椭圆形，在显微镜下常呈链状或成对排列。链长因物种和生长环境不同而不同，肉汤内对数期的链球菌常呈长链排列<sup>[13]</sup>，且致病性链球菌也成长链排列。链球菌一般没有鞭毛，不运动，但 D 群链球菌的某些菌株有鞭毛<sup>[24]</sup>，但没有孢子形成。A、B、C 群链球菌和大多数幼年链球菌有荚<sup>[13]</sup>，

幼龄链球菌继续培养，则荚膜消失。

### 1.2.1.2 链球菌的培养特性

大多数链球菌是兼性厌氧菌，少数为厌氧菌。生长时需要  $\text{CO}_2$ ，有些种类为严格厌氧菌，最适培养温度为  $37^\circ\text{C}$ ，最适 PH 为 7.4~7.6。链球菌对培养条件要求比较苛刻，在普通培养基上不生长或生长不良，需添加无菌血液、血清或  $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$  等营养物质才能更好地生长，但 pH 酸碱度降低会抑制该菌属的生长。在鲜血琼脂培养基上， $37^\circ\text{C}$  经 18~24h 后，形成直径 0.1~1.0mm 的灰白色小菌落，表面光滑，边缘整齐，呈圆形，中间有突起。除了部分无乳链球菌能产生黄色或红色色素外，其他大部分菌株均没有色素产生。血平板上菌落周围可形成三种不同的溶血菌：草绿色溶血环（ $\alpha$ 溶血）、完全透明溶血环（ $\beta$ 溶血，红细胞完全溶解）、无溶血现象（ $\gamma$ 溶血）。其中， $\beta$ 溶血性链球菌致病性最强，其次是 $\alpha$ 溶血性链球菌， $\gamma$ 溶血性链球菌一般不致病。当链球菌在含血清的肉汤中培养一段时间后，肉汤起初逐渐变浑浊，随后变为颗粒状，并在后期沉淀，沉入管底，上清液透明。

### 1.2.1.3 链球菌的生理生化特性

本菌属能发酵糖类，产酸不产气，对山梨醇、乳糖、覃糖、水杨苷、甘露醇及其他糖类的分解能力因菌株不同而异。不还原硝酸盐，接触酶实验结果为阴性。部分链球菌血清 7 型和 8 型的菌株可以产生透明质酸，但胆汁不能分解该血清型的菌株，明胶穿刺培养会沿着穿刺线形成串珠状，而明胶不液化。不分解菊糖的菌株可作为与肺炎链球菌鉴别时的参考。DNA 中 G+C 的含量在 (34~46) mol% 之间，2014 年白向宁<sup>[25]</sup>测得藏羚羊源链球菌的 G+C 含量为 42mol%。

## 1.2.2 链球菌的分类

### 1.2.2.1 根据抗原结构的不同分类

1、属特异性抗原为核蛋白抗原，也称 P 抗原，无种、属、群、型之间特异性，所有链球菌均相同，但 P 抗原与葡萄球菌属之间有交叉。

2、群特异性抗原 又名 C 抗原，具有特异性，是存在于链球菌细胞壁中的多糖成分，有时被用于链球菌的鉴定。它的抗原决定簇为氨基糖苷类，如 A 群链球菌是鼠李糖-N-乙酰葡萄糖胺，C 群是鼠李糖-N-乙酰半乳糖胺。

动物致病菌也是以该抗原也是兰斯菲尔德（Lance-field）分类的依据，根据 C 物质和特异性抗原的沉淀反应将 $\beta$ 溶血性链球菌分为 20 个血清群，缺乏 C 抗原的链球菌不能按照此方法分类，应按照其生理生化特征列入相对应的血清群，其中动物致病菌大部分为 B 群和 C 群，对人致病的多为 A 群。

3、型特异性抗原 又称表面抗原，是位于多糖抗原之外的蛋白质抗原。A 群链球菌有 M、R、T 等蛋白抗原，这些蛋白可提供各种机制来逃避机体先天性免疫反应<sup>[26, 27]</sup>，其中 M 抗原与该菌的致病性与免疫原性有关，M 蛋白主要存在于粗糙型菌

落以及黏液样菌落表面，具有抗吞噬作用，可保护致病性链球菌不被吞<sup>[28]</sup>。用热盐酸提取的 A 群链球菌的 M 蛋白，可决定型的特异性。非 A 组链球菌具有类 M 蛋白结构。根据 M 蛋白抗原的不同，A 组链球菌可分为 150 多个血清型<sup>[29]</sup>，B 群有 5 种血清型<sup>[30]</sup>，C 群链球菌有 13 个型。

#### 1.2.2.2 根据溶血特征分类

$\alpha$ （甲型）溶血性链球菌（ $\alpha$ -Hemolytic streptococcus），在鲜血琼脂培养基上，菌落周围形成不透明的 1~2mm 草绿色溶血环，血红蛋白变为草绿色，溶血环内镜检下可见未溶解的红细胞，所以这种溶血性链球菌又叫草绿色链球菌（*Streptococcus viridans*, *S. viridans*）。草绿色溶血环是由过氧化氢产生的氧合血红蛋白氧化引起的<sup>[31]</sup>。这种链球菌不产生水溶性溶血素，不产生 C-多糖，不能被胆汁溶解。也不会被 Optohin 压制。有些菌株可在溶血环外产生透明的溶血层。此类致病力不强，大部分为条件致病菌。

$\beta$ （乙型）溶血性链球菌（ $\beta$ -Hemolytic streptococcus），能产生溶血毒素，菌落在血琼脂培养基上形成 2~4mm 宽、边界清晰、完全透明的溶血环。环内的红细胞完全溶解，这种链球菌又称溶血性链球菌。能产生水溶性溶血素，可迅速溶解马尿酸钠，产生橙色色素，对杆菌肽不敏感。

$\gamma$ （丙型）溶血性链球菌（ $\gamma$ -Hemolytic streptococcus），此类链球菌不产生溶血素，严格来说， $\gamma$ 溶血性链球菌不溶血，一般不致病，但也有人因感染  $\gamma$  溶血性链球菌而导致死亡的报道<sup>[32]</sup>。

#### 1.2.3 链球菌的抵抗力

链球菌对外界环境抵抗力很小，对干热非常敏感，60℃ 30min 就能将其杀死，但在室温下该菌能在死羊胸、腹腔积液中存活 100d 以上<sup>[33]</sup>。一般对抗生素的耐药性低，对常用的抗生素青霉素、红霉素、四环素、磺胺等药物都比较敏感，对氨基糖苷类、氟化喹啉酮、四环素有抗性，但随着使用抗生素的普及，抗生素的选择要根据分离菌株的药敏结果而定。 $\beta$ 溶血性链球菌能在脓汁中生存数周，可被 6.5%NaCl、40%胆汁、0.1%甲基蓝、低温（10℃）和高温（45℃）所抑制，而 $\alpha$ 溶血性链球菌对热和胆汁有抗性。

#### 1.2.4 链球菌病的流行病学

链球菌病呈全球性分布，全世界大部分国家均有该病的流行。链球菌可以导致人和多种动物疾病，且能表现出复杂的疾病；牛主要是乳腺炎及子宫炎，则羊为肺炎、败血症等，在人体可造成多种器官的疾病，如：链球菌性肾小球肾炎<sup>[34]</sup>、脑膜炎和败血症<sup>[35]</sup>、坏死性软组织感染<sup>[36]</sup>及各类妇科性疾病<sup>[37]</sup>等等，链球菌在人体涉及各类疾病。



羊链球菌病是由溶血性链球菌引起的一种急性、发热性脓毒性传染病。绵羊最易感染，其次是山羊和其他品种的羊，表现为下颌淋巴结和咽喉高度肿胀，呼吸困难，机体内各脏器均有出血，胆囊肿大，最后导致引发全身性出血性、败血性，甚至纤维素性胸膜肺炎。该病的传染源是患病羊、病死羊及带菌羊，其次被链球菌污染的饲料、水源、圈舍空气以及用具均是该病的传染源。本菌可通过受伤的皮肤和黏膜以及呼吸道进行传染，也可通过吸血昆虫（虱、蝇）叮咬感染。该病的发生具有季节性，主要在冬天和初春季节流行，第一次发生羊链球菌的疫区呈流行性，老疫区为地方流行或散发。羊链球菌的发病率为15%~24%，病死率80%~94%。我国最早关于羊链球菌的记录是在1952年的青海省<sup>[19]</sup>，从病死羊的内脏分离得到羊链球菌。1955年末传播于我国四川地区，随之传向我国大部分地区，而西藏每年都有基层兽医反映关于羊链球菌的疫情，但也只是简单地进行治疗。2017年在西藏山南市部分县区羊链球菌发病46219只，发病率为12.3%，死亡8587只，死亡率为18.6%<sup>[38]</sup>，这也是西藏近年来通过具体数据反映西藏羊链球菌病的情况的报道。

羊链球菌病常年发生，多发生于冬末、初春天气多变、寒冷、牧场枯草的季节，在西藏特殊的高原环境下，该病主要集中在每年3月份中旬和10月底发病。本病潜伏期较短，感染时间为7d，最急性一般不表现出临床特征，24h内迅速死亡，急性病程2~3天，亚急性病程7~14天，慢性在1~30天左右，继而死亡。本病临床表现主要是下颌淋巴结肿胀、咽喉变大，关节炎引起的跛行，体内各脏器均有出血现象，可诱发羊大叶性肺炎及脑膜炎，患该病的羊只在临死前还会伴有神经症<sup>[39]</sup>。

### 1.2.5 临床症状

羊链球菌病自然感染的潜伏期为2~7天，有的可长达10天，人工感染为2~3天。该疾病可分为四种类型：最急性型、急性型、亚急性型和慢性型。

#### 1.2.5.1 最急性型

病羊发病初期不表现任何临床症状或症状不明显，一般在1d内死亡。

#### 1.2.5.2 急性型

多见于新疫区，患羊感染初期体温达到41℃以上，精神不振，反刍停止，目光呆滞，行动缓慢或停滞不前。食欲不佳或不食，眼结膜充血，流泪，眼角常有浆液性分泌物流出。鼻腔流出黄色的浆液性脓性鼻涕，轻者分泌清鼻涕。咽喉、下颌淋巴结肿大，俗称“大胆病”或“嗓喉病<sup>[17]</sup>”呼吸急促，心跳加速，掌灸呼吸、流涎，打喷嚏并伴有喘气声。粪便内有时带有血液或黏液。怀孕母羊阴门红肿，最后大多引发流产。病程一般为2~3d，最后因衰竭而死亡。

#### 1.2.5.3 亚急性型

与急性病例相似，但相对缓和。体温升高，食欲减退，流黏性透明的清鼻涕，呼吸困难，咳嗽，常伴有肺炎的症状。嗜睡，走路时步态不稳，粪便稀软带有黏性



分泌物或血液。病程为 1~2 周，不死的可转为慢性病例。

#### 1.2.5.4 慢性型

一般轻度发热，体重逐渐减轻，食欲不振，腹围减少，步态僵硬。随着病程的发展，大部分羊会伴有关节炎，随之出现跛行，也常见后驱瘫痪的羊<sup>[40]</sup>。病程一般在 30d 左右，最后死亡。

#### 1.2.6 病理变化

羊链球菌病的主要呈全身败血性经过。尸僵不全，突出性病理变化为肺脏、肝脏、心脏、肾脏等脏器广泛性出血、肿胀，特别是大网膜和肠系膜最为严重。鼻腔、喉咙和气管出血。肺增大，流出类似血液的泡沫状液体<sup>[41]</sup>，常见肺水肿或肺气肿。胸腔积液、腹腔积液和心包积液增多。心冠沟和心内外包膜有少量出血。肝脏质地较脆，易碎，肿胀，呈泥色，边缘钝圆，囊下有少量出血；胆囊增大至原来的 2~4 倍，胆汁外渗。肾脏脆而软，表面有大面积的树状充血<sup>[41]</sup>，包膜不易剥离，脾大，呈暗紫色<sup>[42]</sup>。各脏器器官浆膜面附有黏稠的纤维素性渗出液。

#### 1.2.7 免疫性

链球菌感染后，动物机体会表现出一定的免疫力，但链球菌的免疫性具有型特异性，也就是说对同型再感染则不敏感，而其他型感染则更加不敏感。这种抵抗力和抗型特性与链球菌的 M 蛋白有关，这种抗体可阻止吞噬细胞对细菌的吞噬，从而产生免疫力。由于链球菌有很多种，这就伴随着有很多型的出现，所以链球菌会出现反复感染的情况，同时链球菌的疫苗也面临因种类和型的繁多而造成免疫的巨大困扰<sup>[43]</sup>。

#### 1.2.8 链球菌的致病机理

链球菌的致病过程包括感染动物机体、链球菌毒力因子黏附宿主、侵入宿主细胞、损伤宿主细胞和免疫逃逸等过程。链球菌的毒力因子可以附着并侵入动物体细胞。使大量细菌在体内繁殖，通过干扰动物身体的正常免疫功能，进而导致发病<sup>[15]</sup>。

##### 1.2.8.1 感染

链球菌通过家畜的天然孔（如：口、鼻等）及伤口进入动物机体，然后在动物机体内大量繁殖，起初会在自身表面形成一层保护膜，以保护细菌自身的活性。而高致病性链球菌在机体内代谢时会产生分解机体的透明质酸酶，使机体变得更加脆弱，这增加了链球菌进入机体，并在里面大量滋生的概率。

##### 1.2.8.2 链球菌对宿主的黏附

病原微生物对宿主细胞的黏附及相互作用是疾病发生的基础<sup>[44]</sup>。链球菌对宿主细胞的黏附是其定植的生物学基础，主要依靠细菌表面蛋白和真核细胞表面糖基的结合，链球菌可合成特异性蛋白，它会以各种方式与宿主细胞和细胞外基质

(Extracellular matrix) 相互结合, 而细胞外基质是宿主与病原菌相互作用的重要组成部分<sup>[45]</sup>, 可以为病变提供环境和催化剂, 加剧细胞病变<sup>[46]</sup>, 这就促进了链球菌在宿主细胞内的黏附、定植和滋生, 感染机体的防御功能。存在于细胞外基质中的纤连蛋白结合蛋白 (fibronectin-binding protein, FnBP) 是 C 群链球菌的主要附着靶点<sup>[15]</sup>, 同时纤连蛋白结合蛋白也是链球菌致病机理的主要黏附因子之一, 也在内化宿主细胞的过程中起着关键作用<sup>[47]</sup>, 纤连蛋白结合蛋白是通过细胞附着的特性, 将链球菌与宿主细胞连接到特殊的靶位点, 进而进行定植、滋生。除了纤连蛋白结合蛋白外还有其他黏附因子, 如富丝氨酸重复序列 (The serine-rich repeat, SRR) 糖蛋白、荚膜多糖、脂磷壁酸和菌毛<sup>[48]</sup>, 其中, SRR 糖蛋白家族是在革兰氏阳性菌的中发现的黏附蛋白家族<sup>[49]</sup>, SRR 糖蛋白家族介导革兰氏阳性菌与血小板的集合, 使细菌附着在血小板上, 从而引起感染、发病<sup>[50]</sup>。荚膜多糖 (capsular polysaccharide) 是细菌细胞壁外荚膜中的主要成分, 是病原微生物表面的保护成分, 它是通过阻碍机体对病原菌的杀伤和吞噬作用来保护病原菌, 进而为病原菌在宿主内定植、附着, 入侵提供机会<sup>[51]</sup>。脂磷壁酸 (lipoteichoic acid, LTA) 是革兰氏阳性菌细胞壁中的一种特殊成分, 也是细菌表面重要的表面抗原, 它是通过黏液层使病原微生物黏附在宿主细胞而发挥作用<sup>[52]</sup>。

菌毛 (Pilus) 是细菌表面短而直的丝状结构, 由蛋白质组成, 具有抗原性, 与细菌运动无关。它是细菌表面的一种黏附结构, 帮助细菌黏附在宿主细胞的受体上, 形成一种细菌的侵袭性。它是病原菌的重要毒力因子, 同时菌毛也参与细菌感染过程中对生物表面的附着和非生物表面生物膜的形成<sup>[53]</sup>, 生物膜的形成是细菌毒力的据定因素, 同时也有助于链球菌增强对宿主细胞的抵抗力和宿主的防御清除, 从而建立链球菌对机体的入侵过程。

#### 1.2.8.3 链球菌入侵宿主细胞

宿主细胞被穿透是链球菌入侵宿主细胞的第一步, 为细胞内囊泡运转, 即胞吞, 链球菌入侵宿主细胞是通过网格蛋白和小泡介导的内吞作用促进的<sup>[54]</sup>。链球菌进入宿主细胞后, 继而突破免疫屏障, 沿淋巴系统进入血液, 引起动物菌血症。由于链球菌在宿主体内繁殖过程中会产生毒素, 大量红细胞溶解, 血液成分发生改变, 机体血管壁受损, 整个血液循环系统受损。网状内皮系统的吞噬能力降低, 导致动物体内的全身性败血症。研究表明, 链球菌对宿主的入侵是多途径发生的, 而并不是仅仅依赖的通过单一受体介导的内吞作用<sup>[54]</sup>, 链球菌进入内皮细胞, 通过内皮细胞的转移也能入侵宿主细胞, 也有其他研究发现, 链球菌也能摄取、依赖肌动蛋白, 通过网格蛋白—肌动蛋白途径介导了链球菌的入侵宿主细胞<sup>[55]</sup>。

#### 1.2.8.4 损害宿主细胞

链球菌侵入宿主细胞后, 使机体的实质性器官严重受损, 出血, 浆膜腔出现大

量浆液性纤维蛋白。尤其是富含网状内皮细胞的器官组织有明显的病理改变，如肝大、质脆、胆囊增大、胶质浸润、脾肿大、骨髓出血等。

#### 1.2.8.5 链球菌的免疫逃逸

链球菌的 M 蛋白和类 M 蛋白是链球菌的主要的毒力因子，两种蛋白与链球菌的致病性密切相关，两种蛋白均有抵抗宿主免疫系统吞噬的作用，而蛋白 G (protein G) 是链球菌 A、C、G 群链球菌细胞壁内的一种蛋白，由于该蛋白与链球菌 G 群结合力最强，故名蛋白 G<sup>[56]</sup>。

链球菌的 M 蛋白一直是疫苗的主要靶点，但链球菌在 M 蛋白编码了许多其他的毒力因子<sup>[57]</sup>，这对疫苗的研发造成了很大困扰。M 蛋白和类 M 蛋白是广泛存于链球菌的主要毒力因子，这些蛋白质通过将特定的蛋白质到链球菌表面来增强对先天和获得性免疫反应的抵抗力。M 蛋白、类 M 蛋白和免疫球蛋白之间的相互作用是通过保守的 Fc 结构域发生的<sup>[58]</sup>，这些相互作用被认为是在黏膜表面和分泌物的免疫条件下产生的。M 蛋白和类 M 蛋白是链球菌重要的抗吞噬因子，M 蛋白的主要功能之一是提供抵抗天然免疫系统和获得性免疫消除，使链球菌能够逃避专业吞噬细胞带来的杀伤，C4b 结合蛋白和 FH 都是补体启动的下调因子，并与其他补体蛋白相互作用，降低补体蛋白 C3b 的水平，从而保护链球菌自身免受补体的伤害<sup>[59]</sup>。而类 M 蛋白是马链球菌兽疫亚种中的一类基因，是细胞表面的一种锚定蛋白，该蛋白所携带的抗原信息与 A 群链球菌表达的 M 蛋白有相似的抗吞噬作用，所以，称为类 M 蛋白<sup>[60]</sup>。M 蛋白和类 M 蛋白对募集因子 H (FH) 具有亲和力，它们之间的相互作用是 M 和类 M 蛋白发挥抗吞噬作用的机制<sup>[61]</sup>，同时还有研究表明，链球菌利用类 M 蛋白来募集硫氧还蛋白 (Trx)，并调节代替补体途径，以逃避宿主的免疫吞噬<sup>[60]</sup>。

蛋白 G 是 G 群链球菌分离而得的细胞壁蛋白。链球菌蛋白 G 是链球菌表面的一种细胞壁蛋白。蛋白 G 的 N 一端部分为白蛋白结合域，C 一端部分是免疫球蛋白 G (immunoglobulin G, IgG) 结合区域和细胞壁结合域。由于蛋白 G 有结合多种不同抗体的功能，链球菌蛋白 G 因此被称之为一种超级抗原。研究发现，蛋白 G 也具备介导链球菌抗吞噬作用和细胞毒性的能力。

#### 1.2.8.6 其他毒力因子和酶

链球菌除了对宿主细胞的黏附以及免疫逃避机制中所涉及的毒力因子外，还有很多毒力因子与链球菌的致病性息息相关，如：侵袭性酶、溶血素、致热外毒素、谷氨酸脱脂脱氢酶蛋白和双磷吡啶核苷酸酶等。

侵袭性酶 (Invasive enzyme) 是病原性细菌所分泌的、增强细菌在宿主组织内侵袭力的一类酶，这些物质一般不损伤机体组织细胞，但能协助病原菌在机体内的定植、繁殖及扩散。链球菌常见的侵袭性酶主要有透明质酸酶

(Hyaluronidaes,HAase)、链激酶 (Strepto kinase,SK)、链道酶 (Streptodonase) 等。它们的共性是使机体组织结构疏松通透性增强,从而有助于病原菌及其毒素迅速扩散。透明质酸酶是链球菌重要的毒力因子,它能分解细胞外基质透明质酸,也能分解动物机体的结缔组织,为链球菌侵袭动物机体提供条件。链激酶是链球菌的一种毒力因子,作为纤溶酶原启动剂,能产生丝氨酸蛋白酶纤溶酶,促进链球菌的转移<sup>[62]</sup>。它是由 A, C, G 群链球菌中 $\beta$ -溶血性链球菌分泌的胞外非酶蛋白质,能和纤溶酶原结合,将纤溶酶原启动为纤溶酶,所以又称链球菌溶纤维蛋白酶

(Streptococcal fibrinolysin)。链道酶又名脱氧核糖核酸酶 (Streptococcal deoxyribonuclease,DNAase),是从 $\beta$ 溶血性链球菌分离出来的,能促进白细胞和损伤组织细胞的变性 DNA 和脱氧核糖核酸蛋白的解聚,分离成小单位,从而降低化脓性分泌物的黏度,便于清除。

链球菌溶血素 (Streptolysin) 由 $\beta$ -溶血性链球菌产生,具有杀死白细胞和毒害心肌的作用,同时溶解红细胞,释放其细胞内容物,是许多病原微生物的毒素的变性特征。链球菌溶血素分为溶血素 O (Streptolysin O,SLO) 和溶血素 S (Streptolysin S,SLS)。溶血素 O: 属于一大类致孔毒素,又称胆固醇依赖细胞溶血素 (CDCS),该溶血素是链球菌的重要毒力因子,它阻止了链球菌内化到溶酶体中,在溶酶体中将其杀死<sup>[63]</sup>。溶血素 O 遇氧不稳定,遇氧后溶血素 O 的-SH 基被氧化为-SS 基,此时溶血素 O 失去溶血能力,用亚硫酸氢钠或半胱氨酸处理后,恢复其溶血能力。该毒素具有抗原性,其特异性抗原与毒素结合后能阻止该溶血素地想溶血作用。溶血素 S: 是一种多肽毒素,溶血能力较溶血素 O 弱,该溶血素是通过在感染过程中迅速破坏机体组织和细胞发挥主要作用<sup>[64]</sup>。对氧稳定,遇热和酸不稳定,无抗原性或抗原性很低,在痊愈的机体内检测不到,该溶血素能破坏白细胞和血小板,动物静脉注射 溶血素 S 可迅速将其致死。

致热外毒素 (Pyrogenic extoxin) 即红疹毒素 (Erythrotoxin)、猩红热毒素 (Scarletfever toxin),主要是由 A 群链球菌产生的外毒素,是一种蛋白质,分为 A、B、C 三种抗原类型,其抗体无交叉保护作用,能刺激机体产生毒素,有特异性中和作用。小剂量在皮肤注射会引起局部红疹,大剂量注射会引起全身红疹,在抗生素广泛使用前,猩红热被列为最严重的传染病之一<sup>[65]</sup>。该毒素可由噬菌体传递,使原来无毒素的菌株变为产毒素菌株,还可引起内毒素引起发热,损伤细胞组织、淋巴细胞和免疫抑制,提高动物机体对内毒素引起的致死性休克的敏感性。

谷氨酸脱脂脱氢酶 (The glutamate dehydrogenase,GDH) 是一种重要的代谢酶,分为 GDH1 和 GDH2。在猪链球菌中, GDH 用来区分高毒株、中毒株和非毒株<sup>[66]</sup>,在其他毒株中, GDH 作为诊断抗原,与毒力无关。

双磷吡啶核苷酸酶 (Diphosphopyridine nucleotidase) 部分链球菌可产生双磷吡



啶核苷酸酶，此酶可能与杀死白细胞的能力有关。

### 1.2.9 链球菌的诊断方法

#### 1.2.9.1 病原学检测

根据链球菌在不同培养基上生长的菌落形态和生化特征，可以对其进行鉴定。链球菌对培养基要求较高，一般在含有血液、血清和葡萄糖的培养基上生长良好，能在血琼脂平板上生长光滑、圆形、灰白色的菌落。革兰氏染色可见单链、双链或长链排列。链球菌属于发酵型细菌，可以发酵糖，但具体分解能力因菌株而异，包括不分解菊粉的菌株，可作为与肺炎链球菌的区别，该菌属不还原硝酸盐，接触酶试验为阴性。但病原学检测只能进行对链球菌的初步诊断。

#### 1.2.9.2 血清学鉴定

血清学检测主要有荚膜反应 (Capsular Reaction)、沉淀试验 (Precipitation test)、补体结合试验 (Complement fixation test)、中和试验 (Neutralization test)、琼脂扩散法 (Agar diffusion method)、酶联免疫吸附试验 (Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 等，该方法主要是检测抗原或抗体，我们平时最常用的是 ELISA 法，用已知抗原检测未知抗体，该方法由于操作简单，数据易分析而得到广泛地使用，但该方法也存在耗时、费用高、容易出现假阳性等缺点，同时国内羊链球菌 ELISA 检测试剂盒的技术还不够成熟，没有明确的特异性和敏感性等数据，所以所得数据可能与实际的情况有所偏差，但也能反映一定的流行情况。而对研究较多的猪链球菌 (*Streptococcus suis*)，该方法能对猪链球菌的 33 个型进行分型鉴定<sup>[67]</sup>，且猪链球菌的 ELISA 试剂盒的特异性和敏感性可高达 97.5% 和 96.6%<sup>[68]</sup>，可谓技术相当成熟。而对于羊链球菌的血清学诊断也有血涂片的方法进行初步诊断的报道<sup>[69]</sup>。所以，羊链球菌的血清学诊断技术还有待进一步的优化和探索。

#### 1.2.9.3 PCR 技术

聚合酶链式反应 (Polymerase chain reaction, PCR) 是一种在 DNA 聚合酶作用下体外扩增特异 DNA 片段的技术。该方法自 20 世纪 80 年代中期发明以来，由于 PCR 具有操作简单、省时、灵敏度高等优点，在微生物鉴定方面得到了广泛地应用。而该方法在链球菌的诊断方面也相继建立了其他类型的 PCR 技术，如在猪链球菌的纳米 PCR 技术<sup>[70]</sup>、实时荧光定量 PCR (Real-time fluorescence quantification PCR)<sup>[71]</sup>、双重定量 PCR (Double fluorescence quantification PCR) 技术<sup>[72]</sup>等；牛乳房链球菌 (*Streptococcus uberis*)、无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*)、停乳链球菌 (*Streptococcus dysgalactiae*) 的多重 PCR 方法<sup>[73]</sup>，等等。而关于羊链球菌的 PCR 诊断技术上现在使用最多的是通用引物和特异性引物的简单扩增，所以未来针对羊链球菌建立更加快捷、特异性高的 PCR 诊断技术也是亟待解决的问题。

### 1.3 研究的目的和意义

西藏是我国的第三大牧区，也是最大的高寒草甸草原牧区，主要的家畜有牦牛和藏羊，据统计，2020年，西藏牦牛的存栏量为520万头，藏羊有950万余只，所以藏羊在西藏有着与牦牛同等重要的地位。由于西藏独特的饲养环境和饲养方式，导致家畜传染病频发，同时也因存在羊与其他家畜（牛、猪等）混养的情况，使一些共患传染病存在交叉感染的风险。羊链球菌病是西藏每年常发的一类传染病，每年各地区向兽防站有关上级部门反映流行情况，但由于西藏基层兽防力量相对薄弱，且羊链球菌疫苗保护性较差，同时也没有对当地流行的羊链球菌进行深入地了解、研究，导致西藏该病每年各地区在不同的时期、不同频率的流行，严重影响当地羊养殖业的健康、绿色、快速发展。

本研究通过对日喀则地区主要养羊的5个县（区）进行血清和鼻拭子及病死羊的脏器采集，送实验室开展羊链球菌的流行病学研究、潜在风险因素评估和病原分子生物特性的系统研究，同时对致病性链球菌通过全基因组测序，全面解析致病性羊链球菌的生物学特性，研究意义如下：

- （1）通过对羊链球菌病的血清学流行病学研究和风险因素评估，了解日喀则地区羊链球菌病的流行情况、流行特点和流行规律，为今后该病的防控奠定理论基础；
- （2）通过分离鉴定该病的病原，并对病原的生物学特性进行深入研究，掌握该地区流行的优势毒株，同时根据其药敏试验结果，为临床用药提供参考；
- （3）通过对日喀则地区羊链球菌病系统的研究，为今后开展羊链球菌病的防控提供理论支撑。

## 第二章 日喀则市羊链球菌病的血清学流行病学调查

### 2.1 前言

羊链球菌病又称羊败血性链球菌病，是一种急性、热性、败血性的人畜共患传染病，多由 C 群马链球菌兽疫亚种或 D 群类马链球菌引起<sup>[14, 16, 74, 75]</sup>。链球菌分布广泛，土壤、尘埃、饮水、动物和人的粪便、鼻眼黏膜及泌尿生殖道中均被检测到。动物感染该细菌常表现为颌下淋巴结肿大，全身出血性败血症、浆液性肺炎<sup>[76]</sup>以及关节炎和跛行<sup>[77]</sup>为主要特征。羊链球菌病一年四季均有发生，但多发于羊只抵抗力较弱的冬和寒春两季<sup>[74, 75]</sup>。链球菌常以共栖菌或致病菌的形式存在，多寄居于动物体内或体表，根据该菌在血琼脂培养基上的溶血特征，可分为甲型（ $\alpha$ ）溶血性链球菌、乙型（ $\beta$ ）溶血性链球菌和丙型（ $\gamma$ ）溶血性链球菌 3 种。而结合其抗原结构的差异，可将链球菌分为 A、B、C、D 等 18 个群，对人和动物有较大的威胁的大部分都属于 A 群。

藏羊主要生活在青藏高原，也是青藏高原特有的珍稀羊种<sup>[78]</sup>，不仅满足了当地农牧民肉、奶的需求，同时也为当地经济发展做出了巨大的贡献。因此，安全有效地提高藏羊繁育，保证其副产品质量（肉、奶等），对满足当今人们的市场需求和畜牧业的高质量发展具有重要意义<sup>[79]</sup>。羊链球菌病常年困扰着当地畜牧业的健康、绿色发展，而链球菌属有 100 多种被识别的种<sup>[12]</sup>。1910 年德国 Weimann 首次报道了羊链球菌病，而中国最早 1952 年在青海<sup>[19]</sup>流行羊链球菌病，随后传播至全国各地，随着养殖业集约化的快速发展，羊链球菌病呈明显上升趋势，给养羊业造成了极大的危害。

日喀则地处西藏西南部，是西藏地区主要的养羊地区之一，而羊链球菌病威胁当地养羊业健康发展的主要原因之一，本研究对日喀则地区主要养羊的 5 个县（区）开展了羊链球菌的流行病学研究，旨在掌握该地区羊链球菌的流行特点及存在的风险因素，为今后更好地防控该病奠定理论基础。

## 2.2 材料与方法

### 2.2.1 待检血清

本研究于 2020 年 10 月份和 2021 年 4 月份在日喀则市主要的 5 个养羊县（区）——桑珠孜区（E: 89.05° N: 29.35°）、白朗县（E: 89.17° N: 28.95°）、拉孜县（E: 89.31° N: 29.26°）、萨嘎县（E: 84.47° N: 29.54°）、仲巴县（E: 84.02° N: 29.76°）（见图 2-1）共采集血清 1458 份，置-20℃冰箱保存备用。

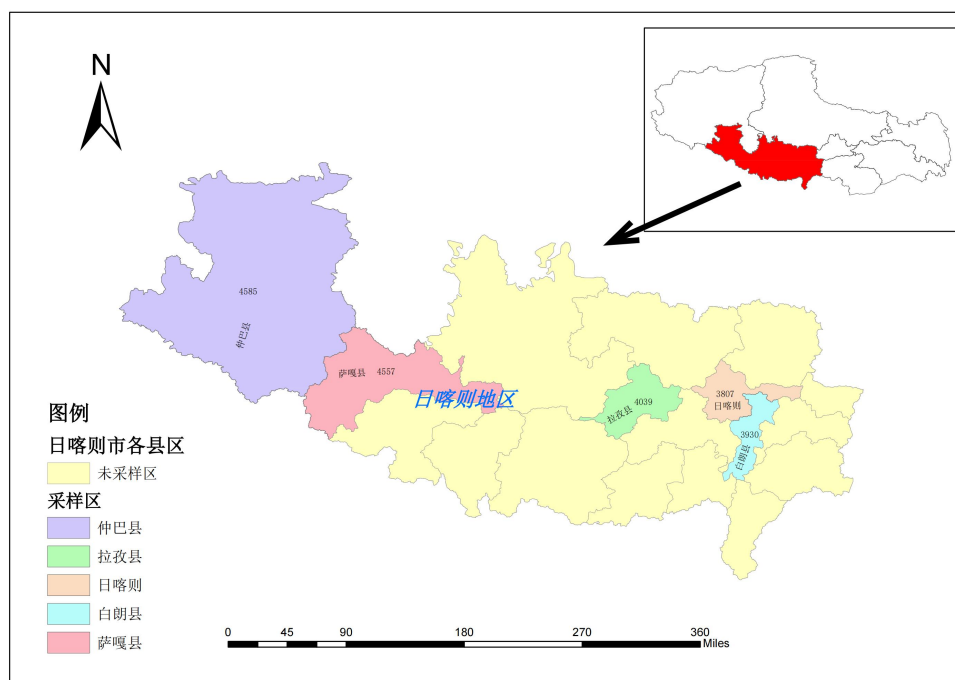


图 2-1 样品采集地域分布图

### 2.2.2 主要仪器及试剂

表 2-1 实验所用仪器和试剂

仪器名称	厂家	型号
酶标仪	Thermo 公司	MK-3
隔水式电热恒温培养箱	上海博讯医疗生物仪器股份有限公司	BG-270
超纯水机	优普超纯科技有限公司	UPC-R-10T
羊链球菌抗原 ELISA 检测试剂盒	上海酶联生物科技有限公司	202107

### 2.2.3 检测方法

严格按照试剂盒操作步骤进行。



### 2.2.4 结果判定

检测效度判定如下：阳性对照孔平均值 $\geq 1.00$ ；阴性对照孔平均值 $\leq 0.20$ 。临界值（CUT OFF）计算：临界值=阴性对照孔平均值+0.15；阴性判定：样品 OD 值 $<$ 临界值（CUT OFF）者为羊链球菌阴性；阳性判定：样品 OD 值 $\geq$ 临界值（CUT OFF）者为羊链球菌者为阳性。

### 2.2.5 统计学分析

使用 R 软件对不同品种、年龄、性别、海拔，采样年份的羊链球菌血清抗体阳性率进行统计分析。判定标准： $P < 0.05$  为有统计学差异， $P \geq 0.05$  为无统计学差异。

## 2.3 结果

从日喀则市主要养羊县（区）共采集血清 1458 份（包括 5 个养殖场和 45 个散养户），其中共检测出 101 份阳性血清，羊链球菌个体阳性率为 6.93%（101/1458），桑珠孜区、白朗县、拉孜县、仲巴县、萨嘎县的阳性率分别为 7.84%、13.99%、4.83%、7.59%、6.47%，在 5 个养殖场和 37 个散养户检出羊链球菌阳性血清，羊链球菌群体阳性率为 84%（42/50）。

表 2-2 样品采集的各县（区）羊链球菌病的阳性率

采样地点	检测样本量	阳性数	阳性率%
桑珠孜区	319	25	7.84
白朗县	193	27	13.99
拉孜县	497	24	4.83
仲巴县	158	12	7.59
萨嘎县	201	13	6.47

通过 R 软件对不同品种、年龄、性别、海拔，采样年份及饲养模式的羊链球菌血清抗体阳性率进行统计分析，结果（见表 2-3）显示：山羊链球菌的阳性率为 5.21%（95%CI: 2.5%~9.4%），绵羊链球菌阳性率为 7.19%（95%CI: 5.8%~8.8%），两个品种的个体阳性差异不显著；年龄 3 岁以下、3 岁~5 岁、5 岁以上羊的个体阳性率分别为 6.26%（95%CI: 4.3%~8.7%）、7.72%（95%CI: 0.4%~1.5%）和 5.10%（95%CI: 2.2%~9.8%），各年龄段的链球菌个体阳性率差异不显著（ $P > 0.05$ ）；母羊的个体阳性率为 6.40%（95%CI: 4.7%~8.5%），公羊的个体阳性率为 7.42%（95%CI: 5.7%~9.5%），不同性别的羊链球菌个体阳性率差异不显著（ $P > 0.05$ ）；海拔 $> 4000\text{m}$ 羊的个体阳性率为 5.61%（95%CI: 4.2%~7.4%），海拔 $< 4000\text{m}$ 羊的个体阳性率为 8.79%（95%CI: 6.7%~11.3%），不同海拔羊链球菌的个体阳性差异显著（OR=0.62,  $P < 0.05$ ）；2020 年所采集的样品的个体阳性率为 5.54%（95%CI:

4.0%~7.5%)，2021年所采集的样品的阳性率为8.29% (95%CI: 6.4%~10.5%)，不同年份所采集样品的个体阳性率差异显著 (OR=1.52,  $P<0.05$ )；牧户羊链球菌的个体阳性率为10% (95%CI: 7.6%~12.9%)，养殖场羊链球菌个体阳性率为5.22% (95%CI: 3.9%~6.8%)，两种饲养模式下的个体阳性率差异极显著 (OR=0.50,  $P<0.01$ )。

表 2-3 通过 R 软件对不同变量的对比结果

组别	影响因子	检测样品	阳性数	阳性率% (95%CI)	OR (95%CI)	P
年龄	<3	511	32	6.26 (4.3,8.7)	1.00	0.379
	3-5	790	61	7.72 (4.4,11.5)	0.69 (0.34,1.39)	
	>5	157	8	5.10 (2.2,9.8)	0.44 (0.17,1.16)	
性别	母	703	45	6.40 (4.7,8.5)	1.00	0.4452
	公	755	56	7.42 (5.7,9.5)	1.08 (0.72,1.63)	
年份	2020	722	40	5.54 (4.0,7.5)	1.00	<0.05
	2021	736	61	8.29 (6.4,10.5)	1.54 (1.02,2.33)	
品种	山羊	192	10	5.21 (2.5,9.4)	1.00	0.3141
	绵羊	1266	91	7.19 (5.8,8.8)	1.41 (0.72,2.76)	
海拔	<4000m	603	53	8.79 (6.7,11.3)	1.00	<0.05
	>4000m	855	48	5.61 (4.2,7.4)	0.62 (0.41,0.93)	
饲养模式	牧户	520	52	10.00 (7.6,12.9)	1.00	<0.01
	养殖场	938	49	5.22 (3.9,6.8)	0.50 (0.33,0.74)	

## 2.4 讨论与分析

中国养羊历史悠久，无论是从数量还是品种多样性来看，中国都是世界上的养羊大国。西藏作为我国五大牧区之一，畜牧业是农牧民赖以生存的支柱产业，羊在农牧民心中与牦牛有同等重要的地位。而羊链球菌病是影响西藏养羊业绿色发展的重要原因之一，而关于羊链球菌各方面的研究又甚少，所以为明确日喀则市羊链球菌病的感染情况和风险因素，我们对日喀则市主要的养羊县（区）—桑珠孜区、白朗县、拉孜县、萨嘎县、仲巴县的1458份羊血清进行羊链球菌抗原的检测，结果101份（6.93%）羊血清中含有羊链球菌抗原，这比西藏邻省的青海省<sup>[69]</sup>（3.13%）略高，虽然同处青藏高原，但这种差异可能是由于放牧环境、羊品种、羊只的营养状况以及所检测的样本量大小造成的。关于羊链球菌流行病学及风险因素分析的报道极少，但对猪链球菌和马链球菌的流行病学研究较多，如：克罗地亚<sup>[80]</sup>和莱索托<sup>[81]</sup>的马链球菌流行率为16.5%和10.1%，西藏林芝<sup>[82]</sup>猪链球菌的流行率为60.13%，这可能与各地区饲养的主要家畜种类以及各种链球菌对不同动物造成的损失大小有

关。

从本研究结果可看出，羊链球菌病属于地方性疾病，随着近几年西藏与区外各省联系的紧密，而且采样地有 318 国道和 219 国道穿过，各县、各地区之间家畜的动物贸易越来越频繁，同时日喀则平均海拔 4000m 以上，常年气候多变，昼夜、夏冬温差大，牧场枯草期时间长，这为羊链球菌的传播和发生提供了方便。由于采样地处于高寒缺氧的环境，而本研究结果显示，该病还是在日喀则普遍存在，所以，链球菌已经适应了这种环境，它的生长和传播基本不受这种高寒缺氧的限制。经调查发现，当地牧民的受教育水平普遍偏低，对家畜疫病防控知识所知甚少，这也可能是该病在本地普遍发生的原因之一。

2021 年所采集样品的血清抗体阳性率（8.29%）显著高于 2020 年样品的抗体阳性率（5.54%， $P < 0.05$ ），2021 年采样时间是 10 月底，而 2020 年采样时间为 4 月份，这说明日喀则地区羊链球菌病在冬季比初春时节更容易流行，同时采样点西藏 9 月份牧草枯黄，羊只能采食的牧草也少之又少，牧民也没有补饲地习惯，这导致羊抵抗力下降，这为羊链球菌在机体内大量滋生提供了条件。牧户羊链球菌的个体阳性率（10%）显著高于养殖场的（5.22%），这是因为牧民的疫病防控意识、管理条件差，不能及时对圈舍进行消毒，清理圈舍卫生，同时牧户对羊只没有合理的补饲，只是单纯地靠放牧来维持羊只的营养状况，所以牧户的羊的营养状况比养殖场的差，导致牧户的羊抗病能力弱，容易引起链球菌大量滋生，所以，牧户的羊更容易发病。

## 第三章 日喀则羊源链球菌的分离鉴定及生物学特性研究

### 3.1 前言

链球菌（*Streptococcus*）能引起多种动物及人的疾病，是一种重要的人畜共患病原菌。该菌属在自然界中广泛存在，属于革兰氏阳性菌，多呈双球形，或由4~6个球菌组成的短链<sup>[83]</sup>，链球菌除了致病性肺炎链球菌和 $\beta$ 溶血性链球菌外，其余均为条件致病菌<sup>[84]</sup>。羊链球菌病是由溶血性链球菌引起的山羊和绵羊的急性、热性传染病，该病在临床上主要表现为下颌淋巴结肿大、关节炎、脑膜炎、心内膜炎、大叶性肺炎、跛行等症状<sup>[17, 69, 83, 85, 86]</sup>，临死伴有神经症状<sup>[39]</sup>，俗称“大胆病”或“嗓喉病”<sup>[17, 69]</sup>。1910年德国的Weimann首先报道了绵羊败血性链球菌病，其病原为绵羊链球菌，1952年我国从青海分离出该菌，经鉴定为C群兽疫链球菌，随着近年来各学者对羊链球菌的深入研究，发现羊链球菌也有D群兽疫链球菌的成员。本病在我国西部地区存在已久，20世纪50年代初在青海流行，50年代末传播至四川省，随后又在新疆、甘肃、西藏等地流行。60年代以后由于广泛接种疫苗，使本病逐渐得到了控制<sup>[18]</sup>。

畜牧业作为西藏的支柱产业，藏羊在农牧民心中同牦牛有着同样的重要地位，近年来，日喀则地区羊感染链球菌的数量日益增多，给当地养羊产业的发展造成了巨大的经济损失，该病多发于冬春两季，主要通过呼吸道和消化道感染，病畜通过分泌物和排泄物向外界大量排出链球菌，且该病的致死率达到80%以上<sup>[18, 74]</sup>。由于农牧民缺乏对该病的防控和治疗经验，导致该地链球菌病常发，同时每年因用药不合理、治疗不及时造成大量的羊只死亡，本研究为解决这一现状，通过病原的分离，部分生物学特性的研究，给当地养羊业防控、治疗该病提供科学依据。

### 3.2 材料与方法

#### 3.2.1 材料

##### 3.2.1.1 样品来源

2021年4月底从日喀则地区采集羊流清鼻涕、咳嗽的鼻拭子42份，置于20%的甘油生理盐水中，用-20℃车载冰箱运送至实验室。

## 3.2.1.2 试验试剂

表 3-1 实验所用试剂信息

产品	生产厂家	型号
无菌脱纤维羊血	上海索莱宝科技有限公司	
四季青胎牛血清	浙江天杭生物科技股份有限公司	
胰蛋白胨大豆琼脂 (TSA)	青岛海博生物科技有限公司	
胰蛋白胨大豆肉汤 (TSB)	青岛海博生物科技有限公司	
成套药敏片	青岛海博生物科技有限公司	
生化鉴定管	青岛海博生物科技有限公司	
PCR 试剂	北京博奥龙免疫技术有限公司	
Prolex™ 链球菌分群乳胶试剂盒	加拿大 Pro-Lab Diagnostics™ 公司	C19454
DL2000 DNA Maker	日本 Takara 公司	
DL1000 DNA Maker	日本 Takara 公司	
2×Taq PCR Mixture	苏州博奥龙免疫技术有限公司	
革兰氏染色液 (快速法)	珠海贝索生物技术有限公司	
细菌组 DNA 提取试剂盒	天根生化科技有限公司	

## 3.2.1.3 实验动物

体重 18~22g 的 SPF 昆明小鼠, 购自西藏自治区兽医生物药品制造厂。

## 3.2.1.4 主要仪器

表 3-2 实验中所需的仪器信息

仪器名称	厂家	型号
立式压力高压灭菌锅	上海三申医疗器械有限公司	YM75L
全自动雪花制冰机	常熟市雪科电器有限公司	IMS-30
隔水式电热恒温培养箱	上海博讯医疗生物仪器股份有限公司	BG-270
组合式恒温摇床	常熟市金坛精达仪器制造有限公司	QHZ-123B
PCR 仪	BIO-RAD 公司	C1000TM
电泳仪	BIO-RAD 公司	041BR
电子天平	上海民桥精密科学仪器有限公司	FA2104N
凝胶成像仪	北京君意东方电泳设备有限公司	JYD4S-3C
正置生物显微镜	Leica 公司	DM3000LED
生物安全柜	上海博讯医疗生物仪器股份有限公司	BSC-1300B2
台式恒温振荡器	上海博讯实业有限公司医疗设备厂	BSD-TF270
高速离心机	湖南湘仪实验室仪器开发有限公司	TG16-W

## 3.2.2 方法

### 3.2.2.1 细菌分离培养

将采集的鼻拭子置于含有 7%胎牛血清的 TSB 肉汤中, 37 °C 恒温培养 18 h 后, 在含 5% 无菌脱纤维羊血的 TSA 培养基上划线, 37 °C 恒温箱内培养 18~24 h; 选取疑似羊链球菌的单菌落划线于含 5% 无菌脱纤维羊血培养基, 37 °C 恒温箱内培养 18~24 h 进行细菌的纯化, 经连续 4 代纯培养。

### 3.2.2.2 细菌的革兰氏染色、镜检

使用革兰氏染色液对分离菌株进行染色鉴定, 具体方法如下:

1、首先对培养好的菌液进行涂片, 涂片时应保持薄而均匀。然后用酒精灯的火焰对载玻片上的菌液进行固定, 此时载玻片的温度不能过高, 载玻片接触手背不烫为准, 固定好后对其进行染色;

2、在固定的载玻片上滴加龙胆紫液染色 10s, 水洗, 甩干;

3、加碘溶液染色 10s, 水洗, 甩干;

4、加脱色液脱色 10~20s, 水洗, 甩干;

5、最后加沙黄染液复染 10s, 水洗;

6、待干, 在显微镜下观察细菌的菌落形态。

### 3.2.2.3 分离菌株的生化试验

将分离菌株分别接种到山梨醇、葡萄糖、麦芽糖、蔗糖、乳糖、甘露醇、硝酸盐、过氧化氢酶、V-P 试验、M-R 试验等生化管中, 37°C 恒温培养 24~48h, 观察并记录实验结果。

### 3.2.2.4 链球菌的 16SrRNA 鉴定

细菌的 DNA 提取: 纯化后单菌落接种于 TSB 液体培养基中, 于 37°C、120r/min 的摇床上过夜培养。培养液中的 DNA 提取参照细菌组 DNA 提取试剂盒说明书进行, 提取的细菌 DNA 作为模板, 根据细菌的通用引物进行 PCR 扩增, 引物信息见表 3-2。PCR 反应体系为 25 $\mu$ L (2 $\times$ Taq PCR Master Mix: 12.5 $\mu$ L, 上下游引物各 1 $\mu$ L, DNA 模板: 2 $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O: 8.5 $\mu$ L)。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳后观察结果, 扩增长度约为 1500 bp。PCR 扩增产物送至成都擎科生物技术有限公司进行测序, 测序结果用 DNASTar11.0 做分离菌株的系统发生树。

### 3.2.2.5 链球菌特异性引物的鉴定

符合上述结果的菌株, 用链球菌特异性引物再次 PCR 扩增, 引物信息见表 3-3。PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳观察结果, 扩增长度约为 561 bp。

表 3-3 验所用引物信息

引物名称	序列 (5'→3')	扩增大小	文献来源
Primers name	Sequence	Product length	references
1492R	R:TACGGCTACCTTGTTACGACTT	1500bp	
27F	F:AGAGTTTGATCCTGGCTCAG		
链球菌	R:AGGGCCTACACCTAGCACT	561bp	[87]
	F:GATACATAGCCGACCTGAGA		

### 3.2.2.6 链球菌分群实验

按照 Prolex<sup>TM</sup> 链球菌分群乳胶试剂盒说明书对链球菌进行分群。将纯化好的链球菌分别与链球菌分群诊断液 (A、B、C、D、F、G 试剂) 发生反应, 同时建立阴性对照和阳性对照。

### 3.2.2.7 链球菌溶血性实验

将纯化好的菌株接种于含 5% 无菌脱纤维羊血的胰蛋白胨大豆琼脂培养基 (TSA) 上, 37 °C 恒温培养 24 h, 观察并记录细菌生长情况及溶血特征。

### 3.2.2.8 致病性试验及半数致死量 (LD<sub>50</sub>) 的测定

致病性试验: 取  $\alpha$  溶血性链球菌 1 株和 1 株  $\beta$  溶血性链球菌培养后, 用  $\beta$  溶血性链球菌原液 ( $1.3 \times 10^9$  CFU/mL), 15 只 18~22 g 小鼠随机分为 3 组, 每组 5 只, 1 组为对照组, 其余为实验组, 实验组每只小鼠体内注射 0.5 mL 菌液, 对照组注射 0.5 mL 生理盐水;  $\alpha$  溶血性链球菌原液 ( $6 \times 10^7$  CFU/mL), 15 只 18~22 g 实验小鼠, 随机分为 3 组, 1 组为对照组, 其余两组为实验组, 分别将 0.5 mL 原液和 10 倍稀释液注射到实验组小鼠体内, 对照组每只小鼠体内注射 0.5 mL 生理盐水, 观察小鼠临床表现, 若有死亡小鼠, 剖检观察小鼠病理变化情况。

$\beta$  溶血性链球菌的半数致死量 (LD<sub>50</sub>) 测定: 参照文献<sup>[86, 88]</sup>来测定  $\beta$  溶血性链球菌的半数致死量, 取 40 只健康小白鼠, 随机分成 8 组, 接种菌液的剂量分别为  $1.3 \times 10^9$  CFU/mL、 $1.3 \times 10^8$  CFU/mL、 $1.3 \times 10^7$  CFU/mL、 $7.31 \times 10^6$  CFU/mL、 $4.11 \times 10^6$  CFU/mL、 $2.31 \times 10^6$  CFU/mL、 $1.3 \times 10^6$  CFU/mL 和 1 组对照组, 实验组小鼠腹腔内注射 0.5 mL 菌悬液, 对照组注射 0.5 mL 生理盐水。持续记录小鼠的发病和死亡情况一周。根据记录结果, 计算细菌的半数致死量 (LD<sub>50</sub>)。

### 3.2.9 药敏试验

采用常规纸片法<sup>[89]</sup>, 检测本试验所分离菌株对氨苄西林、多粘菌素 B、头孢曲松、四环素、新霉素、卡那霉素、庆大霉素、青霉素、头孢他啶、头孢呋辛、环丙沙星、氧氟沙星、恩诺沙星、万古霉素、复方磺胺甲唑、氯霉素、克林霉素、红霉

素、多西环素、丁胺卡那的药敏敏感性。链球菌药敏试验结果判定标准见表 3-4。

表 3-4 所用抗生素结果判定标准

抗生素 Antibiotic	纸片含量 (ug/片) Paper content	抑菌范围 Antibacterial range		
		耐药 (R) Resistance	中介 (I) intermediary	敏感 (S) sensitive
氨苄西林 Ampicillin	10	≤18	19~25	≥26
多黏菌素 B Polymyxin B	30	≤8	9~11	≥12
头孢曲松 Ceftriaxone	30	≤13	15~22	≥23
四环素 Tetracycline	30	≤18	19~22	≥23
新霉素 Neocycline	30	≤12	13~16	≥17
卡那霉素 kanamycin	30	≤13	14~17	≥18
庆大霉素 Gentamicin	10	≤12	13~14	≥15
青霉素 Penicillin	10	≤19	20~27	≥28
头孢他啶 Ceftazidime	30	≤14	15~17	≥18
头孢呋辛 Cefuroxime	30	≤14	15~22	≥23
环丙沙星 Ciprofloxacin	5	≤15	16~20	≥21
氧氟沙星 Ofloxacin	5	≤12	13~15	≥16
诺氟沙星 Norfloxacin	10	≤12	13~16	≥17
万古霉素 Vancomycin	30	≤14	15~16	≥17
氯霉素	30	≤17	18~20	≥21



Chloramphenicol				
克林霉素	2	≤15	16~18	≥19
Clindamycin				
红霉素	15	≤15	16~20	≥21
Erythromycin				
多西环素	30	≤12	13~15	≥16
Doxycycline				
丁胺卡那	30	≤14	15~16	≥17
Amikacin				

### 3.3 结果

#### 3.3.1 细菌的分离培养与染色镜检

将采集的羊鼻拭子增菌后接种在含 5% 无菌脱纤维养血的 TSA 上，经连续 4 代纯化后可见白色，中间隆起，边缘整齐的圆形菌落。对分离菌株涂片染色、镜检，可见革兰氏染色结果呈紫色、排列成长链状，见图 3-1。

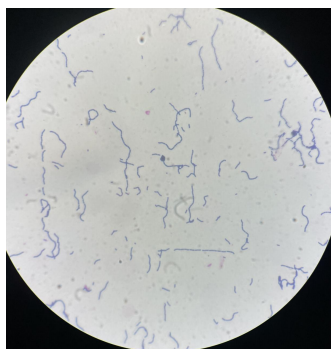


图 3-1 链球菌革兰氏染色结果 (40×)

#### 3.3.2 分离菌株的生化试验结果

分离菌株的生化试验结果见表 3-5，所分离地不同种的链球菌大部分均能分解糖类，而黄体链球菌不分解麦芽糖，除了多动物链球菌，其余 3 种链球菌均能分解山梨醇，而分离菌株对硝酸盐、过氧化氢、V-P 试验、M-R 试验的生化试验结果均为阴性。

表 3-5 分离菌株的生化试验结果

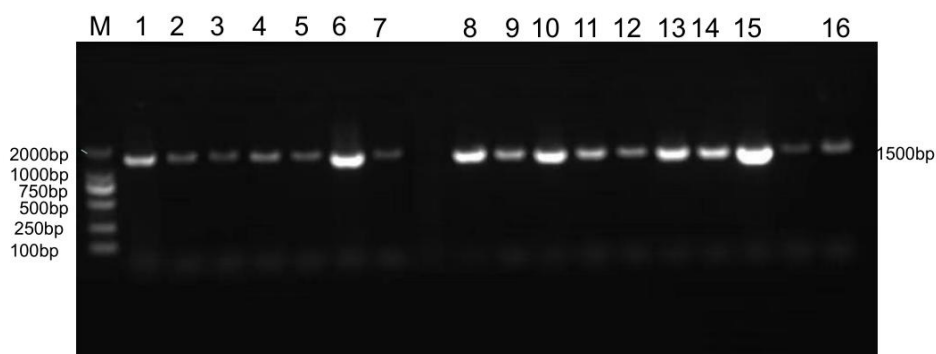
项目 Items	葡萄糖 Glucose	麦芽糖 Maltose	乳糖 Lactose	山梨醇 Sorbitol	蔗糖 sucrose	甘露醇 Mannitol	硝酸	过氧化	V-P	M-R
							盐 Nitrate	氢酶 catalase	试 V-P	验 M-R
									test	test
黄体链球菌 <i>Streptococcus luteus</i>	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-
马链球菌 <i>Streptococcus equi</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
多动物链球菌 <i>Streptococcus pluranimalium</i>	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-
小链球菌 <i>Streptococcus minor</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-

注：+：阳性；-：阴性

Note: +: positive; -: negative

### 3.3.3 分离菌株的 16SrRNA 基因扩增及序列分析

以分离菌株的 DNA 为模板，用细菌 16SrRNA 基因通用引物进行 PCR 扩增。通过琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物，目标带出现在约 1500bp 处，这与目标片段的预期大小一致（见图 3-2）。测序结果将在 GenBank 中与其他链球菌对比结果显示：9 株为黄体链球菌（*Streptococcus luteus*），5 株为马链球菌（*Streptococcus equi*）1 株为多动物链球菌（*Streptococcus pluranimalium*），1 株为小链球菌（*Streptococcus minor*）。

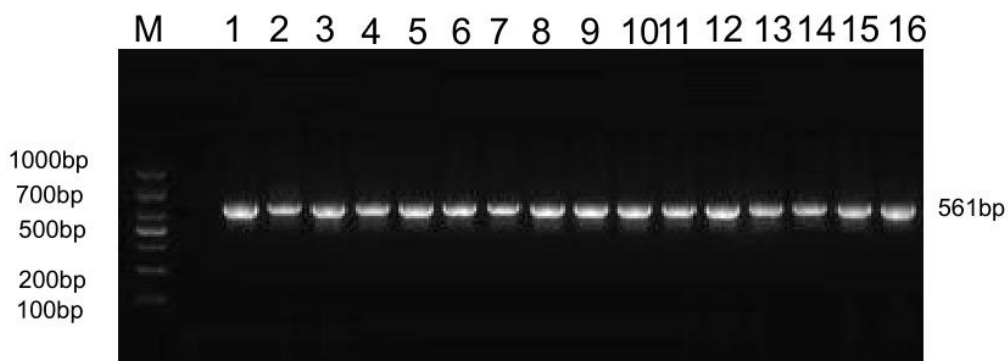


M:DL2000 DNA Maker; 1~16 为分离菌株的 PCR 扩增产物

图 3-2 16 株分离菌株的 16S rRNA 基因扩增结果

### 3.3.4 分离菌株链球菌特异性片段 PCR 扩增

将分离到的链球菌用链球菌特异性引物扩增，扩增产物经 1.5%凝胶电泳，约在 600 bp 的位置出现目的条带（见图 3-3），与预期的目的条带大小相一致。



M: DL1000 DNA Maker;1~16 为分离菌株扩增结果

图 3-3 链球菌特异性片段 PCR 扩增结果

### 3.3.5 羊链球菌 16S rRNA 系统发生树分析

本试验鉴定出的 16 株羊源链球菌的 16S rRNA 序列构建的系统发生树见图 3-4，参考菌株信息见表 3-6。分离得到的 5 株马链球菌与 GenBank 登录的其他马链球菌的亲缘性高达 99.86%，黄体链球菌与 GenBank 登录的其他黄体链球菌的亲缘性为 100%，分离得到的小链球菌与其他小链球菌的亲缘性为 100%，同时与其他羊链球菌（*Streptococcus ovis*）的亲缘性也高达 99%以上，多动物链球菌与其他多动物链球菌的亲缘性高达 99%以上。

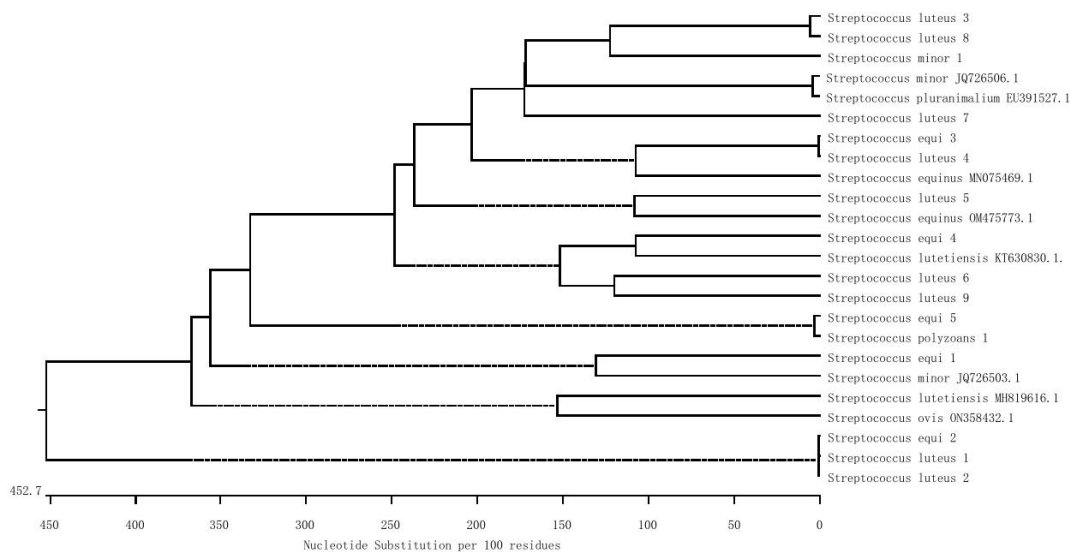


图 3-4 羊链球菌分离菌株与 GenBank 相关菌株的 16SrRNA 序列系统发生数

表 3-6 参考菌株信息

菌株名称 Strain names	来源 Source	GenBank 登录号 GenBank accession No.
多动物链球菌 <i>Streptococcus pluranimalium</i>	鸡	EU391527.1
绵羊链球菌 <i>Streptococcus ovis</i>	绵羊	ON358432.1
马链球菌 <i>Streptococcus equinus</i>	牛	OM475773.1
马链球菌 <i>Streptococcus equinus</i>	牛	MN075469.1
小链球菌 <i>Streptococcus minor</i>	绵羊	JQ726506.1
小链球菌 <i>Streptococcus minor</i>	绵羊	JQ726503.1
黄体链球菌 <i>Streptococcus lutetiensis</i>	牛	KT630830.1
黄体链球菌 <i>Streptococcus lutetiensis</i>	人	MH819616.1

### 3.3.6 羊链球菌分群实验结果

用链球菌分群乳胶试剂盒对所分离的链球菌进行分群实验，结果显示：14 株为 C 群，2 株为 D 群，其中，2 株 D 群均为黄体链球菌，其余链球菌均为 C 群。

### 3.3.7 溶血实验结果

被鉴定为 16 株羊链球菌中 1 株呈 $\beta$ 溶血，可见完全透明的溶血环（见图 3-5），该 $\beta$ 溶血性链球菌为羊源马链球菌，15 株呈 $\alpha$ 溶血，可见草绿色溶血环（见图 3-6）



图 3-5  $\beta$ 溶血性链球菌

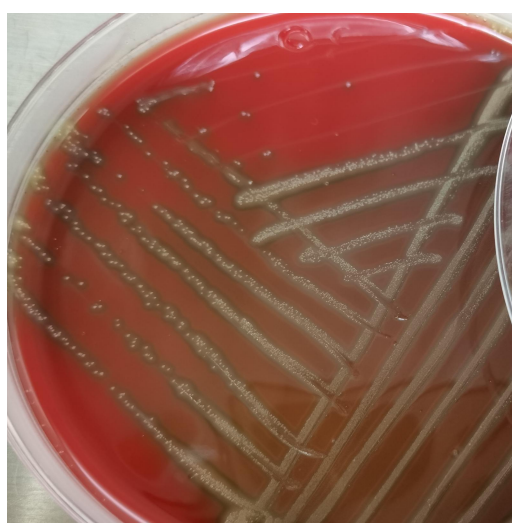


图 3-6  $\alpha$ 溶血性链球菌

### 3.3.8 羊链球菌分离株的毒力及羊源马链球菌的半数致死量（LD50）实验结果

#### 3.3.8.1 分离菌株的毒力实验结果

小鼠注射 $\beta$ 溶血性链球菌 4 h 后出现精神委顿，同笼小鼠蜷缩在一起，被毛耸立，8 h 后死亡 3 只，24 h 后全部死亡，死亡率为 100%，剖检发现，腹腔和胸腔积血，肝脏肿大，质地易碎，脾脏、肝脏肿大，脏器样品经 10%的福尔马林溶液保存送邦众医疗器械检验检测中心做病理切片。而注射 $\alpha$ 溶血性链球菌的小鼠 6 h 后出现精神萎靡，24 h 后出现轻微腹泻，7 d 后，仍然没有死亡，剖检发现，脏器没有明显的

病变，小鼠肠道内带有黄色的黏液，从肺脏、肝脏分离得到链球菌。

### 3.3.8.2 羊源马链球菌的半数致死量 (LD<sub>50</sub>) 测定结果

当羊源马链球菌感染浓度为  $1.3 \times 10^9$  CFU/mL、 $1.3 \times 10^8$  CFU/mL、 $1.3 \times 10^7$  CFU/mL 时，感染小鼠的死亡率均为 100%，而感染浓度为  $1.3 \times 10^6$  CFU/mL 时，感染小鼠的死亡率为 0 (见表 3-7)，经 SPSS21.0 软件计算，羊源马链球菌的半数致死量 (LD<sub>50</sub>) 为  $4.86 \times 10^6$  CFU/mL。

表 3-7 致病性实验结果

组别	剂量	n	不同时间死亡数							死亡率%
			24h	48h	72h	96h	120h	144h	168h	
1	$1.3 \times 10^9$ CFU/mL	5	5	0	0	0	0	0	0	100
2	$1.3 \times 10^8$ CFU/mL	5	4	1	0	0	0	0	0	100
3	$1.3 \times 10^7$ CFU/mL	5	3	0	1	1	0	0	0	100
4	$7.31 \times 10^6$ CFU/mL	5	2	0	0	1	0	0	0	60
5	$4.11 \times 10^6$ CFU/mL	5	1	0	0	0	1	0	0	40
6	$2.31 \times 10^6$ CFU/mL	5	0	0	0	0	1	0	0	20
7	$1.3 \times 10^6$ CFU/mL	5	0	0	0	0	0	0	0	0

### 3.3.9 死亡小鼠的病理切片结果

通过死亡小鼠的肺脏、肝脏、脾脏、肾脏、心脏的病理切片可知，肺组织呈弥漫性出血，血管充血，可见炎性细胞，渗出液，部分肺泡囊融合形成腔体 (见图 3-7)；肝细胞结构排列无明显异常，汇管区小叶间动脉充血，小叶间静脉淤血，胆小管内充满血液，中央静脉淤血 (见图 3-8)；脾脏红髓白髓分布无明显异常，血管充血，脾索结构无明显异常 (见图 3-9)；肾脏的部分肾近曲小管内充满血液，肾小管上皮细胞轻度空泡变性，刷毛边缘脱落，细胞扁平，管腔扩张 (见图 3-10) 心肌细胞排列整齐，细胞核大小正常，心肌出血 (见图 3-11)。

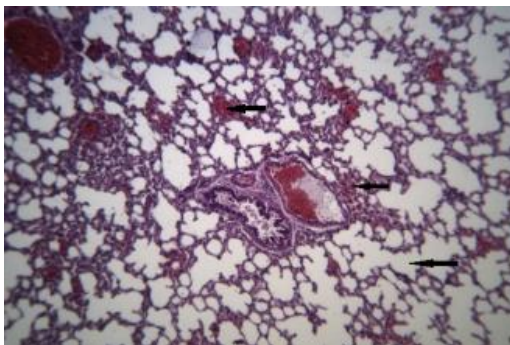


图 3-7 肺脏病理切片 (100×)

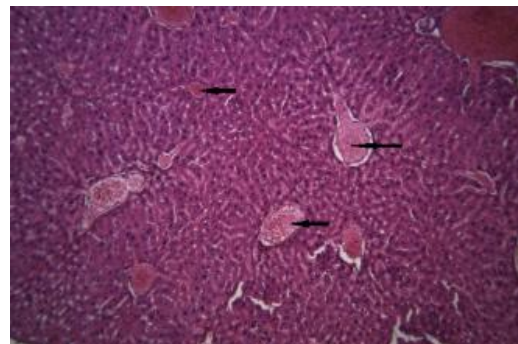


图 3-8 肝脏病理切片 (100×)



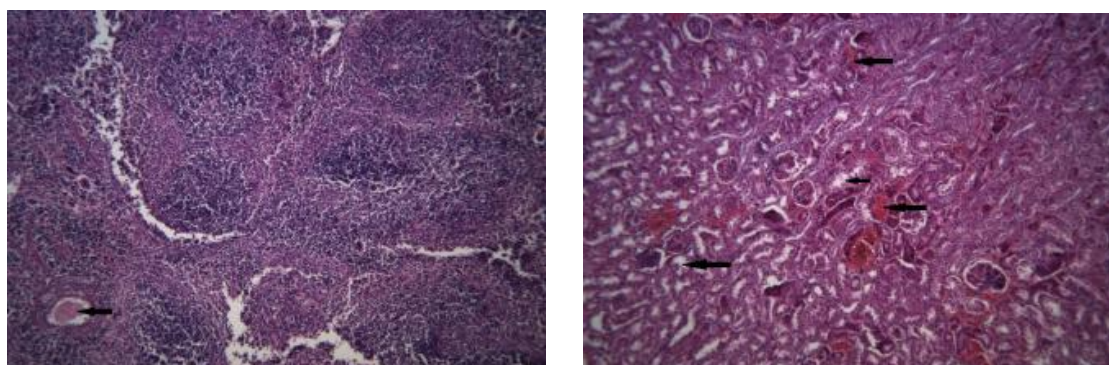


图 3-9 脾脏病理切片 (100×) 图 3-10 肾脏病理切片 (100×)

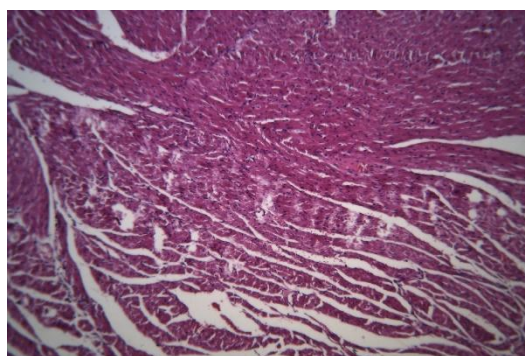


图 3-11 肾脏病理切片 (100×)

### 3.3.10 羊链球菌的药敏试验结果

16 株分离菌株对氧氟沙星、头孢他啶、氨苄西林、万古霉素、四环素、克林霉素、青霉素、氯霉素、红霉素和多西环素等 10 种抗生素的敏感率为 50%以上，而对多粘菌素 B、卡那霉素、头孢呋辛、丁胺卡那的耐药率为 50%以上（见表 3-8）。

表 3-8 分离菌株的药敏试验结果

抗生素	敏感菌株 Number of sensitive strain	敏感率% Percent of sensitive strain	中介菌株 Number of intermediary resistance	中介率% Percent of intermediary resistance	耐药菌株 Number of resistant strain	耐药率% Percent of resistant strain
氨苄西林 Ampicillin	10	62.5	2	12.5	4	25
多粘菌素 B Polymyxin B	5	31.25	2	12.5	9	56.25
头孢曲松 Ceftriaxone	5	31.25	4	25	7	43.75
四环素	11	68.75	2	12.5	3	18.75

Tetracycline						
新霉素	3	18.75	6	37.5	7	43.75
Neocycline						
卡那霉素	2	12.5	3	18.75	11	68.75
kanamycin						
庆大霉素	5	31.25	1	6.25	10	62.5
Gentamicin						
青霉素	12	75	1	6.25	3	18.75
Penicillin						
头孢他啶	9	56.25	0	0	7	43.25
Ceftazidime						
头孢呋辛	5	31.25	2	12.5	9	56.25
Cefuroxime						
环丙沙星	7	43.75	5	31.25	4	25
Ciprofloxacin						
氧氟沙星	13	81.25	0	0	3	18.75
Ofloxacin						
诺氟沙星	6	37.5	6	37.5	4	25
Norfloxacin						
万古霉素	14	87.5	1	6.25	1	6.25
Vancomycin						
氯霉素	13	81.25	1	6.25	2	12.5
Chloramphenic						
ol						
克林霉素	13	81.25	0	0	3	18.75
Clindamycin						
红霉素	8	50	3	18.75	5	31.25
Erythromycin						
多西环素	16	100	0	0	0	0
Doxycycline						
丁胺卡那	3	18.75	3	18.75	10	62.5
Amikacin						

### 3.4 讨论

链球菌在自然界分布非常广泛，目前链球菌由 100 多个种组成<sup>[12]</sup>。而本试验从



羊鼻拭子分离得到 16 株链球菌，分离率为 38.10%（16/42），比谢珊珊<sup>[90]</sup>等和段龙川等<sup>[16]</sup>60%和 100%的分离率有不小的差距，这可能与所采集样品的种类、采样时间及样品保存时间长短有关。本试验分离得到 4 种链球菌，在国外 Karen F. Steward<sup>[91]</sup>和 Alfonso Las Heras<sup>[92]</sup>分别从绵羊和羊奶样中分离得到马链球菌，在国内，也有董文龙<sup>[21]</sup>、张总超<sup>[93]</sup>、王丽扬<sup>[94]</sup>等分别从山羊、岩羊和猪分离得到多动物链球菌的报道，而从大熊猫体内同时分离得到多动物链球菌和马链球菌的报道，而黄体链球菌多感染于牛和人，并造成牛的菌血症和直肠癌<sup>[95, 96]</sup>，Chen, Pen<sup>[96]</sup>等 2016 年从牛奶中分离得到黄体链球菌，小动物链球菌研究相对较少，在 GenBank 上有登录羊源的相关序列，但没有相对应的文献。随机选取 1 株 $\beta$ 溶血性链球菌和 1 株 $\alpha$ 溶血性链球菌进行小鼠攻毒实验后， $\beta$ 溶血性链球菌的致死率为 100%，而 $\alpha$ 溶血性链球菌攻毒后只出现腹泻症状，并没有致死，这也验证了 $\beta$ 溶血性链球菌的强致病性。

本研究对所分离得到的链球菌进行血清群分群实验显示，16 株羊源链球菌中 14 株属于 C 群，2 株属于 D 群，说明日喀则地区流行的链球菌血清群主要为 C 群，与温州地区<sup>[16]</sup>流行的链球菌主要血清群一致，而上海地区<sup>[24]</sup>仅流行 D 群，安阳地区<sup>[20]</sup>流行的链球菌血清群为 C 群和 D 群，C 群和 D 群是国内报道最多的血清型，是否存在其他地方血清型有待进一步研究。

本试验药敏结果与国内其他研究者的结果差别较大，其中本试验分离菌株对万古霉素、克林霉素表现出的高敏感率与付明哲<sup>[97]</sup>等的研究结果相一致，同时分离菌株对青霉素、万古霉素、氨苄西林高敏，这与张兴民<sup>[87]</sup>等分离的牦牛源链球菌的药敏结果一致，而其他抗生素对分离菌株的药敏结果均与国内其他研究者的结果有很大差别，这可能与不同地方针对当地流行的疫病种类而使用不同抗生素的种类有关。链球菌在冬春季多发的时节，可能与其他病原菌混合感染而增加其死亡率<sup>[97]</sup>，因此，在临床上使用抗生素治疗该病时，因考虑与其他病原的混合感染，抗生素的使用必须慎重，以免造成对更多抗生素产生耐药性。

## 第四章 1 株羊源马链球菌的全基因组测序及分析

### 4.1 前言

马链球菌 (*Streptococcus equi*) 在兰氏分群中属于 C 群, 主要包括马链球菌兽疫亚种 (*Streptococcus equi subspecies zooepidemicus*, SEZ)、马链球菌马亚种 (*Streptococcus equi subspecies equi*, SEE) 和马链球菌类马亚种 (*Streptococcus equi subspecies ruminatorum*, SER)<sup>[98]</sup> 三种不同的亚种。其中马链球菌马亚种具有很强的宿主特异性, 只感染马属动物<sup>[99]</sup>, 同时该菌也是马腺疫 (Equine strangles) 的主要病原。对于马链球菌的研究较少, 在国内现有的研究中, 马链球菌感染大部分动物是马属动物, 但也有部分感染猪<sup>[100]</sup>、猕猴<sup>[101]</sup>、骆驼<sup>[102]</sup>、牦牛<sup>[103]</sup>等动物的报道, 而关于羊感染马链球菌的研究基本处于空白。

为更好地了解羊源马链球菌的所携带的毒力因子和耐药基因等, 对该细菌进行全基因组测序, 全面解析羊源马链球菌的生物信息。

### 4.2 材料与方法

#### 4.2.1 待测菌株

待测菌株—羊源马链球菌保存于省部共建青稞和牦牛种质资源与遗传改良国家重点实验室。

#### 4.2.2 方法

##### 4.2.2.1 细菌基因组 DNA 的提取

根据 Wizard 基因组 DNA 纯化试剂盒 (Promega) 的说明提取基因组 DNA。纯化的基因组 DNA 通过 TBS-380 荧光计 (Turner BioSystems Inc., Sunnyvale, CA) 定量。

##### 4.2.2.2 文库构建

基因组测序使用 PacBio RS II 单分子实时测序 (SMRT) 和 Illumina 测序平台的相组合。Illumina 数据用于评估基因组杂合性、重复以及质粒和污染的存在, 以帮助选择后续的装配策略。同时, 由于第三代测序存在较高的错误率, 所以要用第二代测序数据对第三代数据进行修正, 以保证装配结果的高精度。

##### 4.2.2.3 Illumina 文库构建

取至少 1  $\mu$ g 的细菌基因组 DNA, 并通过 Covaris 对基因组 DNA 进行分段。DNA 样本被切割成 400bp 的片段。通过琼脂糖凝胶鉴定片段的大小分布, 并富集 300-500bp 范围内的基因组片段。文库由 NEXTFlexure 快速 DNA-Seq 试剂盒制备。

#### 4.2.2.4 单分子文库建库

通过 G-tubes (Covaris, MA) 将至少 15  $\mu$ g 的基因组 DNA 加工成 10kb 片段, 然后根据 PacBio 规范 (Pacific Biosciences, CA) 纯化片段, 使末端变平, 并将两端分别连接到 SMRT 贝尔测序接头。

#### 4.2.2.5 Illumina 测序

在 IlluminaHiSeq XTen 仪器上通过双末端测序 (2 $\times$ 150bp) 对制备的文库进行测序。

#### 4.2.2.6 单分子测序

测序文库用 0.45 倍体积的 AgencourtAMPureXPbeads (BeckmanCoulterGenomics,MA) 试剂进行三次纯化, 文库单链退火并与固定 ZMW (零模波导, 零模波导孔) 底部的聚合酶结合。加入测序反应试剂后, 每个碱基对都会发出相应的光并被检测, 每个合成的碱基对都会显示为脉冲峰, 再加上高分辨率的光学检测系统。

用于实时检测。

#### 4.2.2.7 基因组组装、基因预测与注释

PacBioRSII 和 Illumina 平台生成的数据用于生物信息学分析。所有分析均在上海明治生物的 I-Sanger 云平台 (www.i-sanger.com) 上进行。具体程序如下:

##### (1) 基因组组装

第二代测序数据原始数据 (raw data) 以 fastq 格式存储。为了使后续的组装更加准确, 会对原始数据进行质量切割, 去除剪枝后测序质量低、N 含量高、长度小的 reads, 从而获得高质量的 cleandata。用 canu<sup>[104]</sup> 及 HGAP 软件组装 PacBio 数据, 将读数组装成重叠群, 然后判断成环, 得到完整的染色体和质粒基因组。最后, 利用 illumina 测序数据对组装结果进行校正, 确定环状基因组的起始位点。

##### (2) 基因预测与注释

利用 Glimmer<sup>[105]</sup> 对基因组中的编码序列 (CDS) 进行预测, 质粒基因采用 GeneMarkS 软件预测, tRNAscan-SE<sup>[106]</sup> 进行 tRNA 预测, Barnap 进行 rRNA 预测。利用 BLAST、Diamond、HMMER 等序列比对工具, 从 NR、Swiss-Prot、Pfam、GO、COG、KEGG 数据库中对预测到的 CDS 进行蛋白功能注释。

### 4.3 羊源马链球菌全基因组测序结果

#### 4.3.1 全基因组组装结果

羊源马链球菌的全基因组测序结果显示: 该菌株的全基因组大小为 2272497bp, GC 含量为 41.1%, Contig 数量为 1, Gap 数量为 0, 具体数据统计见表 4-1。

表 4-1 基因组组装结果统计

统计项目	结果
Scaffold Length (bp)	2,272,497
Scaffold Number	1
Scaffold N50 (bp)	2,272,497
Scaffold N90 (bp)	2,272,497
Contig Length (bp)	2,272,497
Contig Number	1
Contig N50 (bp)	2,272,497
Contig N90 (bp)	2,272,497
GC Content (%)	41.1
Gaps Number	0

### 4.3.2 基因组组分

#### 4.3.2.1 编码基因预测

该菌株预测基因数量为 2124 个，预测基因总长度为 1924911bp，预测基因的平均长度为 906bp，预测基因的最大长度为 6819bp，预测基因的最小长度为 90bp。（见表 4-2）

表 4-2 编码基因预测结果

预测基因	结果
预测基因数量 Gene number	2124 个
预测基因序列总长度 Total Gene size (bp)	1924911
预测基因的平均长度 Average Gene Length (bp)	906
最大长度 Max Length (bp)	6819
最小长度 Min Length (bp)	90

#### 4.3.2.2 重复序列预测

相比于真核生物，细菌具有更紧凑的基因组。编码蛋白或者 RNA 分子的区域一般会占到基因组的 85%-90%。而剩余的基因组区域中的绝大多数被各种调控性区域所占据，所以细菌基因组中重复序列含量极少。而在该菌株中预测出的重复序列总长度为 3898bp，基因组中重复序列含量为 0.17%。

#### 4.3.2.3 非编码 RNA 预测

非编码 RNA 从基因组转录而来，但不像 mRNA 一样翻译成蛋白质 RNA 分子。而该株羊源马链球菌全基因组测序结果显示，rRNA 有 15 个，非编码 RNA 家族数量为 3 个，其中 5S rRNA、16S rRNA、23S rRNA 的数量均为 5 个；tRNA 数量为

57 个, 非编码 RNA 家族数量为 31 个。

#### 4.3.2.4 GRISPR 序列预测

CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats) 是基因组中一个连续的 DNA 区域。在这个区域是一个碱基序列, 包含许多短而重复的序列, 在重复序列之间有一些“spacer DNA”, 长度约为 30 bp。

用 CRT V1.2<sup>[107]</sup> 软件对基因组进行 CRISPR 预测, 结果统计见表 4-3

表 4-3 CRISPR 预测结果统计

CRISPR ID	Cotig ID	Start	End	Repeat number	Average repeat length (bp)	Spacer number	Average spacer length (bp)
CRISPR.1	Contig00001	149527	149804	5	35	4	25
CRISPR.2	Contig00001	213125	213222	2	32	1	34
CRISPR.3	Contig00001	233879	234161	6	19	5	33
CRISPR.4	Contig00001	241230	241381	3	38	2	19

#### 4.3.2.5 基因岛预测结果

通过 IslandPath-DIMOB v0.2<sup>[108]</sup> 软件, 对马链球菌的毒力岛进行预测, 预测结果见表 4-4, 共预测基因岛 4 个, 基因岛序列长度从 8076bp~74874bp 不等。

表 4-4 基因岛预测结果

GI-ID	Scaffold-ID	Start	End	Length (bp)
GI1	Contig00001	418063	426138	8076
GI2	Contig00001	427368	502241	74874
GI3	Contig00001	694220	720223	26004
GI4	Contig00001	1012888	1027367	14480

#### 4.3.2.6 前噬菌体预测结果

从表 4-5 可知, 该马链球菌中共预测出 4 个前噬菌体, 前噬菌体的序列长度从 42693bp~70059bp 不等。

表 4-5 前噬菌体预测结果

Prophage_ID	Scaffold-ID	Start	End	Length (bp)
Prophage_1	Contig00001	397986	440678	42693
Prophage_2	Contig00001	837895	907953	70059
Prophage_3	Contig00001	1014320	1059873	45554
Prophage_4	Contig00001	2048262	2104288	56027

#### 4.3.2.7 基因簇预测结果

通过软件 antiSMASH v5.0.0<sup>[109]</sup>对该马连翘球菌的基因簇进行预测、分析,结果见表 4-6,共有 4 个基因簇。

Gene_Cluster	Scaffold-ID	Start	End	Length (bp)
r1c1	Contig00001	395538	405454	9917
r1c2	Contig00001	1145897	1164987	19091
r1c3	Contig00001	1541033	1561959	20927
r1c4	Contig00001	2131204	2154586	23383

表 4-6 基因簇预测结果

#### 4.3.3 专用数据库注释结果

##### 4.3.3.1 通用数据库注释

表 4-7 通用数据库注释统计

Database	Number	100≤Length<300	Length≥300
eggNOG_Annotation	1716	788	804
GO_Annotation	1706	784	777
kegg_Annotation	1118	504	548
nr_Annotation	2121	983	865
Pfam_Annotation	1754	809	829
Swissprot_Annotation	1242	536	642
TrEMBL_Annotation	2116	981	865
All_Annotated	2121	983	865

### 4.3.3.2 Nr 数据库注释

Nr (Non-Redundant Protein Database) 数据库实质是一个非冗余的蛋白质数据库, 该数据库将比对到的序列的物种分布情况, 共分为 11 个不同的物种, 其中马链球菌占总注释的 86.80%。见图 4-1。

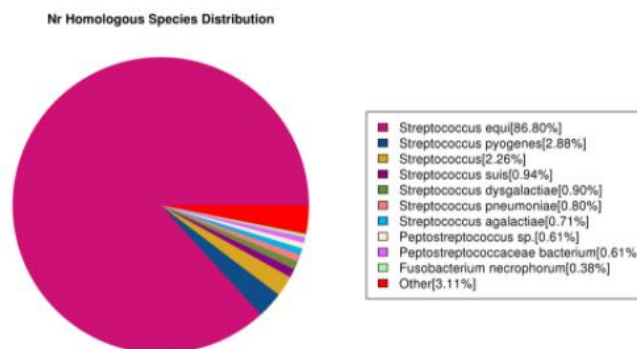


图 4-1 Nr 数据库比对到序列的物种分布图

### 4.3.3.3 GO 数据库注释

GO (geneontology) 数据库包括三个基因功能节点, 即: 细胞组分 (Cellular Component)、分子功能 (Molecular Function) 和生物过程 (Biological Process)。该菌株包括 37 个功能条目, 其中细胞组分注释条目约占总注释条目的 29.73%, 主要包括细胞膜、细胞。分子功能注释约占总注释条目的 32.43%, 主要包括催化活性、结合位点、运输活动等。生物过程注释条目约占总注释条目的 37.84%, 该过程主要与代谢过程、细胞转化、单有组织过程。

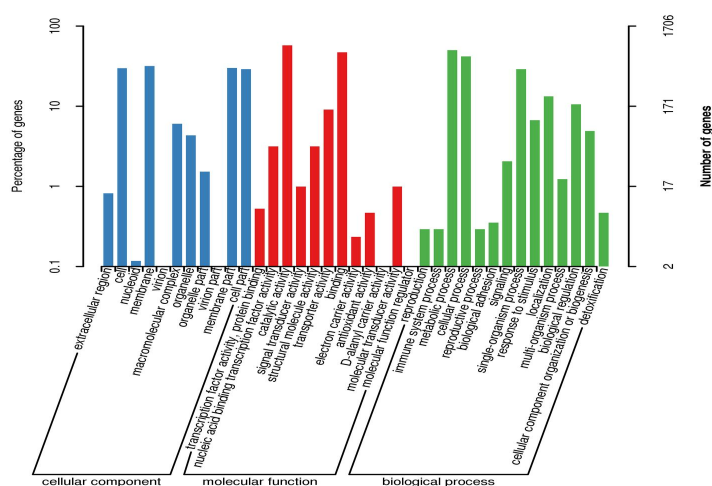


图 4-2 GO 功能注释分类统计图



#### 4.3.3.4 Kegg 功能注释结果

Kegg (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 是收集了生物的基因组、通路和化合物信息的综合性的数据库。该数据库将 Shigatse-1 菌株分成了 3 大类和 48 个小类，其中所占百分比最高的是环境信息处理 (Environmental Information Processing) 中的 ABC 转运蛋白 (ABC Transporters)，占比高达 90%。图 4-3 为该马链球菌的 Kegg 注释图。

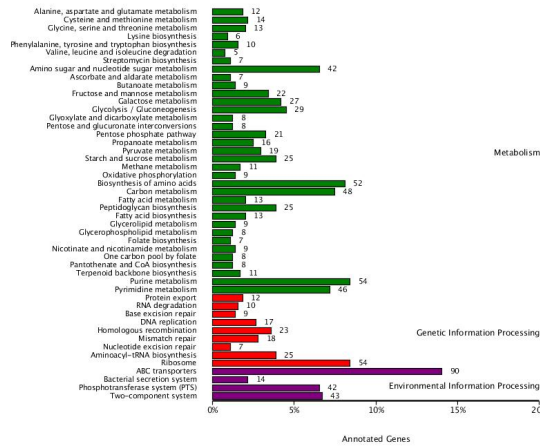
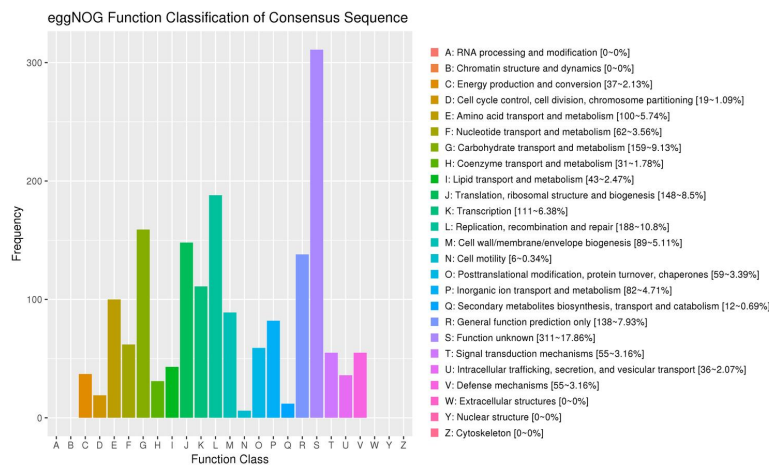


图 4-3 马链球菌的 Kegg 注释分类图

#### 4.3.3.5 eggNOG 数据库注释结果

eggNOG 是收录生物直系同源基因簇的数据库，是在 COG 数据库的基础上的持续更新。该数据库将该菌株基因组分成 25 类，其中功能基因数量最多和所占相对含量最高的前 3 位依次是未知功能 (Function unknown) 含有 311 个基因、复制、重组和修复 (Replication, recombination and repair) 含有 188 个基因、碳水化合物运输和代谢 (Carbohydrate transport and metabolism) 含有 159 个基因。图 4-4 为该马链球菌的 eggNOG 功能基因功能分类统计图。



注：横坐标为 eggNOG 各分类内容，纵坐标为相应功能基因数目所占相对含量

图 4-4 eggNOG 功能基因功能分类统计图



## 4.3.3.6 VFDB 数据结果

VFDB (virulence factor database) 是收集了已经充分描述的细菌致病菌的绝大多数的致病因子, 这些致病因子帮助致病菌建立对宿主的感染、应对宿主的免疫系统在宿主中存活并引起宿主的疾病。该数据库主要包括两种毒力因子序列数据集, 一个是已经实验确证的核心数据集 sets A, 另一个是既包含 sets A 中的已实验确认的毒力因子也包含预测出的毒力因子的全数据集 set B。这个数据库可以帮助预测尚未详细研究的细菌基因组中可能的毒力因子。

表 4-8 VFDB 数据库统计结果

gene_ID	GE000012	GE000014	GE000029	GE000031
VFDB_gene_name	pce	sodB	prsA2	pdgA
VFDB_gene_function	choline binding protein E	uperoxide dismutase	post translocation chaperone PrsA2	Peptidoglycan N-deacetylase
Virulence_factor_name	CBPs	SodB	PrsA2	PgdA
Virulence_factor_id	VF0145	VF0169	VF0449	VF0442
VFDB_target_id	VFG001354(gb NP_345414)	VFG001867(gb YP_096960)	VFG032878(gb NP_465743)	VFG033025(gb NP_463944)
E-value	2.17115e-06	9.24999e-57	1.69699e-23	2.76048e-49
Percent-identity	24.29	45.64	32.41	40.27
Quary-cover	27.84	96.02	84.68	52.57
score	47	178	95	173

## 4.3.4 蛋白亚细胞定位分析结果

蛋白亚细胞主要包括信号肽预测、跨膜蛋白预测以及分泌蛋白的预测, 其中信号肽预测蛋白为 Signal peptide, 数量为 156 个; 跨膜蛋白的预测类型 Transmembrane protein, 数量为 541 个; 分泌蛋白的预测蛋白为 Secreted protein, 数量为 156 个。

### 4.3.5 基因组图谱

图 4-5 为羊源马链球菌的基因组图谱

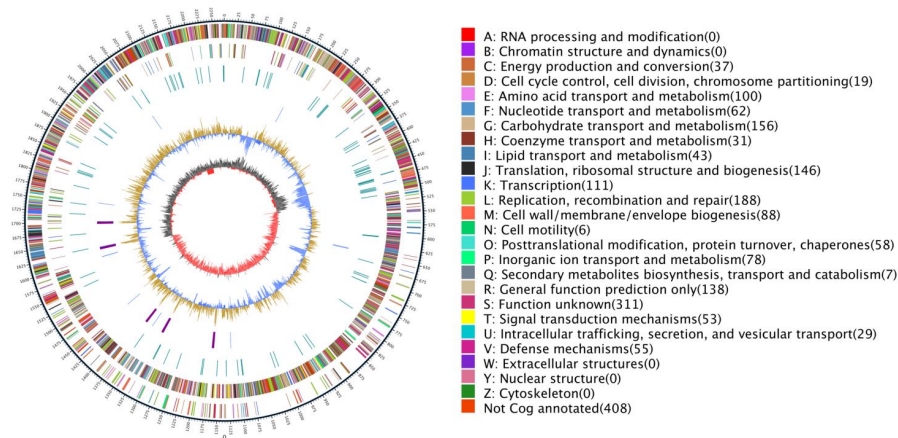


图 4-5 基因组圈图

## 4.4 讨论

马链球菌 (*Streptococcus equi*) 马链球菌病的病原体, 但该菌也能引起其他动物以及人的传染, 而马链球菌与感染人类最重要的化脓性链球菌有很高的同源性, 且两种链球菌表面具有相同的表面蛋白、超抗原等<sup>[110]</sup>。马链球菌被认为是从兽疫链球菌的祖先菌株中进化而来, 而兽疫链球菌对于动物属于一种机会致病菌, 通过基因对比发现, 马链球菌的基因组中由于缺失了 CRISPR 基因, 导致马链球菌更容易获得新的遗传物质, 并将其整合到自身的基因组中<sup>[111]</sup>, 这也为马链球菌与其他链球菌之间的遗传物质跨物种的交换提供了佐证。

本研究通过对羊源马链球菌的全基因组测序结果可知, 该菌株的总长为 2272497bp, G+C 的含量为 41.1%, 这与链球菌的生化特性相一致。但韩国牛源马链球菌<sup>[112]</sup> (从牛瘤胃分离得到) 的基因的总长为 1997664bp, G+C 的含量为 37.4%, 该结果与本次实验的结果有较大出入, 这可能与马链球菌的宿主以及寄生位置有关, 因为胃肠道的细菌容易发生重组可能导致这一结果, 其次可能与该细菌的进化有关。在此次测序结果中显示, 共检测到 4 个毒力基因, 但未检测到耐药基因, 这也与 GenBank 登录的其他马链球菌的结果。

## 第五章 结论

本研究通过对日喀则市部分县（区）羊链球菌病的血清学流行病学调查发现，该地区羊链球菌病的个体阳性率为 6.93%(101/1458)，群体阳性率高达 84%(42/50)，说明羊链球菌病在日喀则地区市普遍流行的，同时通过对不同年龄、性别、季节、海拔、饲养方式进行统计学分析发现：羊链球菌病更容易在春季发病，低海拔地区（<4000m）比高海拔（>4000m）发病率更高，且牧户的羊比养殖场的羊更容易患该病。

对日喀则市羊链球菌进行病原分离时显示，在所分离的 16 株羊源链球菌中，有 4 种不同的链球菌，即黄体链球菌（9 株）、马链球菌（5 株）、多动物链球菌（1 株）、小链球菌（1 株），其中流行的优势株为黄体链球菌，其次为马链球菌。对所分离菌株开展溶血试验、分群实验、动物试验，结果显示：1 株为 $\beta$ 溶血性链球菌，该菌株为羊源马链球菌，其余为 $\alpha$ 溶血性链球菌；16 株链球菌中有 2 株为 D 群链球菌，且均为黄体链球菌，其余为 C 群链球菌，说明日喀则流行的链球菌主要以 C 群为主；动物试验结果显示， $\alpha$ 溶血性链球菌能对小鼠造成腹泻，但不致死，而 $\beta$ 溶血链球菌对小鼠有很强的致死性，测得该株 $\beta$ 溶血性链球菌的半数致死量为（LD<sub>50</sub>）为  $4.86 \times 10^6$ CFU/mL。同时药敏结果显示：16 株链球菌对多西环素、氯霉素、克林霉素、氧氟沙星、万古霉素和青霉素等 10 种抗生素的敏感率在 50%~100%，而对多粘菌素 B、卡那霉素、头孢呋辛、庆大霉素、丁胺卡那耐药率在 50%以上。

最后对高致病性病毒株—羊源马链球菌进行了全基因组测序，结果显示：该马链球菌的全基因总长为 2272497bp，G+C 的含量为 41.1%，预测含有 2124 个编码基因，对 RNA 预测结果显示：5S rRNA、16S rRNA、23S rRNA 的数量均为 5 个，tRNA 数量为 57 个，4 个前噬菌体，同时也检测到该菌株有 4 个毒力基因。

通过本研究内容，希望能为今后该病的防治提供一定的理论支持，也为今后羊链球菌病的研究奠定基础。

## 参考文献

- [1] 索朗次旦, 蔡立安, 普布仓决, 等. 西藏日喀则地区牛羊蓝舌病的血清学调查[J]. 中国兽医科技, 1990(09): 25-26.
- [2] MA J G, ZHANG X X, ZHENG W B, et al. Seroprevalence and Risk Factors of Bluetongue Virus Infection in Tibetan Sheep and Yaks in Tibetan Plateau, China[J]. Biomed Res Int, 2017,2017: 5139703.
- [3] 刘亚刚, 马蓉拉尼, 邓晓莹. 西藏布氏杆菌病的流行及防制[J]. 四川畜牧兽医, 1995(01): 62-63.
- [4] 扎西次仁, 苏中华, 格桑卓玛, 等. 西藏班戈县牦牛、羊布病抗体血清学检测[J]. 甘肃畜牧兽医, 2020,50(10): 71-73.
- [5] MA J G, TIAN A L, ZHENG W B, et al. First report of bovine viral diarrhea virus and Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis infection in Tibetan sheep (*Ovis aries*) in Tibetan Plateau, China[J]. Trop Anim Health Prod, 2019,51(3): 719-722.
- [6] 冯旭飞, 王志敏, 吴禹熹, 等. 藏绵羊肺脏中链球菌的分离鉴定及耐药性分析[J]. 中国畜牧兽医, 2014,41(04): 232-235.
- [7] 杨晶晶, 顾庆云, 王俊书, 等. 拉萨地区羊多杀性巴氏杆菌的分离鉴定及基因型分析[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2022(03): 80-85.
- [8] 杨学礼张永欣许登艇尹世兴帅永玉. 羊衣原体性流产的研究——流行病学调查[J]. 兽医科技杂志, 1981(07): 15-16.
- [9] 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所. 兽医微生物学(第2版)(精)[M]. 兽医微生物学(第2版)(精), 2013.
- [10] 娄永新. 伯杰氏细菌分类学手册新1版(9版)1卷,2卷概要介绍[J]. 中华医学检验杂志, 1991,14(6): 3.
- [11] 赫什 DC, 麦克劳克伦 NJ, 沃克 RL, 等. 兽医微生物学[J]. 科学出版社, 2007.
- [12] FOSTER G, KIRCHNER M, MUCHOWSKI J, et al. *Streptococcus caledonicus* sp. nov., isolated from sheep[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2020,70(4): 2611-2615.
- [13] 陆承平. 兽医微生物学.第4版[M]. 兽医微生物学.第4版, 2007.
- [14] 齐亚银, 剡根强, 王静梅. 绵羊链球菌病研究进展[J]. 中国兽医杂志, 2007(09): 50-52.
- [15] 王明琼, 李超, 刘学通, 等. 羊链球菌致病机制研究进展[J]. 动物医学进展, 2021,42(10): 71-75.
- [16] 段龙川, 胡浩, 吴波, 等. 羊源链球菌的分离鉴定及防治[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2018(17): 116-119.
- [17] 张博, 姚学萍, 王印, 等. 一株羊源链球菌的分离鉴定及溶血素(SLS)基因序列分析[J].

- 中国预防兽医学报, 2017,39(12): 1030-1033.
- [18] 郑世军. 现代动物传染病学[M]. 现代动物传染病学, 2013.
- [19] 杨圣典, 畚效曾, 赵宏烈. 青海绵羊溶血性链球菌病研究初步报告[J]. 中国兽医杂志, 1953(04): 112-114.
- [20] 王双山, 欧阳素贞, 刘书梅, 等. 羊链球菌的分离鉴定及药敏试验[J]. 中国兽医杂志, 2007(09): 43-44.
- [21] 董文龙, 王巍, 耿昕颖, 等. 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(05): 23-26.
- [22] 许国洋, 付利芝, 徐登峰, 等. 重庆地区羊传染性脓疱与病原菌混合感染的检测与分析[J]. 中国兽医学报, 2018,38(08): 1543-1547.
- [23] 张素辉, 付利芝, 黄勇富, 等. 简阳大耳羊链球菌的分离鉴定及药敏特性研究[J]. 中国草食动物科学, 2014(S1): 326-328.
- [24] 陈炎. 上海地区发病山羊中 D 群链球菌的分离与鉴定[D]. 上海交通大学, 2010.
- [25] 白向宁. 藏羚羊链球菌新种的发现及我国动物源性产志贺毒素大肠埃希菌的分析[D]. 中国疾病预防控制中心, 2016.
- [26] RUSSO B T, AYINUOLA Y A, SINGH D, et al. The M Protein of *Streptococcus pyogenes* Strain AP53 Retains Cell Surface Functional Plasminogen Binding after Inactivation of the Sortase A Gene[J]. *J Bacteriol*, 2020,202(10).
- [27] WALKER M J, BARNETT T C, MCARTHUR J D, et al. Disease manifestations and pathogenic mechanisms of Group A *Streptococcus*[J]. *Clin Microbiol Rev*, 2014,27(2): 264-301.
- [28] HIROSE Y, KOLESINSKI P, HIRAOKA M, et al. Contribution of *Streptococcus pyogenes* M87 protein to innate immune resistance and virulence[J]. *Microb Pathog*, 2022,169: 105636.
- [29] STEER A C, LAW I, MATATOLU L, et al. Global emm type distribution of group A streptococci: systematic review and implications for vaccine development[J]. *Lancet Infect Dis*, 2009,9(10): 611-616.
- [30] AWWAD E, SROUR M, HASAN S, et al. Molecular determination, serotyping, antibiotic profile and virulence factors of group B *Streptococcus* isolated from invasive patients at Arabcare Hospital Laboratory, Palestine.[J]. *American journal of infection control*, 2021,50(8).
- [31] MCDEVITT E, KHAN F, SCASNAY A, et al. Hydrogen Peroxide Production by *Streptococcus pneumoniae* Results in Alpha-hemolysis by Oxidation of Oxy-hemoglobin to Met-hemoglobin[J]. *mSphere*, 2020,5(6).

- [32] SHIN D, GROSS P A. Acute bacterial meningitis secondary to gamma hemolytic streptococcus. Case report and review of the literature[J]. *Neurology*, 1976,26(12): 1180-1181.
- [33] 古丽先木·艾克木. 羊链球菌病的诊断与治疗[J]. *畜牧与饲料科学*, 2010,31(05): 148.
- [34] BRANT P S, de FREITAS V B, de CASTRO G V, et al. Acute Post-Streptococcal Glomerulonephritis in Children: A Comprehensive Review[J]. *Curr Med Chem*, 2022,29(34): 5543-5559.
- [35] van KASSEL M N, de BOER G, TEERI S, et al. Molecular epidemiology and mortality of group B streptococcal meningitis and infant sepsis in the Netherlands: a 30-year nationwide surveillance study[J]. *Lancet Microbe*, 2021,2(1): e32-e40.
- [36] BRUUN T, RATH E, MADSEN M B, et al. Risk Factors and Predictors of Mortality in Streptococcal Necrotizing Soft-tissue Infections: A Multicenter Prospective Study[J]. *Clin Infect Dis*, 2021,72(2): 293-300.
- [37] ROTTENSTREICH A, BENENSON S, LEVIN G, et al. Risk factors, clinical course and outcomes of pregnancy-related group A streptococcal infections: retrospective 13-year cohort study[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2019,25(2): 251.
- [38] 边巴卓玛, 黄涛. 西藏山南市春季羊链球菌病[J]. *中国畜牧兽医文摘*, 2017,33(08): 124.
- [39] 倪宏波, 曲进, 邵红, 等. 羊链球菌病原部分生物学特性的研究[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2006(11): 92-93.
- [40] 王新民, 晁旭东, 韩猛立, 等. 羊链球菌的分离鉴定及药敏试验[J]. *新疆农垦科技*, 2016,39(09): 31-32.
- [41] 张桦, 魏勇, 王利. 一例湖羊纤维素性肺炎的病理组织学观察[J]. *中国农业大学学报*, 2020,25(05): 86-93.
- [42] 薛宝君. 羊链球菌病的病原分离鉴定及药敏试验[J]. *贵州畜牧兽医*, 2017,41(01): 13-14.
- [43] RADCLIFF F J, FRASER J D, PROFT T. Vaccination with *Streptococcus pyogenes* nuclease A stimulates a high antibody response but no protective immunity in a mouse model of infection[J]. *Med Microbiol Immunol*, 2015,204(2): 185-191.
- [44] 高俊, 陈慧, 詹轶群, 等. 病原微生物毒力因子与宿主细胞信号通路相互作用研究进展[J]. *生物技术通讯*, 2016,27(05): 705-710.
- [45] GUO G, QIN S, KONG X, et al. Identification of novel fibronectin-binding proteins by 2D-far Western blot in atypical enteropathogenic *Escherichia coli* serotype O55:H7[J]. *Microb Pathog*, 2021,150: 104682.
- [46] GHORBANI S, YONG V W. The extracellular matrix as modifier of neuroinflammation

- and remyelination in multiple sclerosis[J]. *Brain*, 2021,144(7): 1958-1973.
- [47] 范皓天, 周梦曦, 蒋子奇, 等. 马链球菌兽疫亚种纤连蛋白结合蛋白的原核表达及其免疫原性的检测[J]. *中国兽医科学*, 2015,45(02): 167-171.
- [48] JANS C, BOLEIJ A. The Road to Infection: Host-Microbe Interactions Defining the Pathogenicity of *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* Complex Members[J]. *Front Microbiol*, 2018,9: 603.
- [49] SEEPERSAUD R, SYCHANATHA D, BENSING B A, et al. O-acetylation of the serine-rich repeat glycoprotein GspB is coordinated with accessory Sec transport[J]. *PLoS Pathog*, 2017,13(8): e1006558.
- [50] PYBURN T M, BENSING B A, XIONG Y Q, et al. A structural model for binding of the serine-rich repeat adhesin GspB to host carbohydrate receptors[J]. *PLoS Pathog*, 2011,7(7): e1002112.
- [51] 谢黎卿, 杨洋, 彭远义, 等. 病原微生物荚膜多糖的生物学功能[J]. *畜牧兽医学报*, 2021,52(03): 576-587.
- [52] LIMA B P, DAVIES J R, WICKSTROM C, et al. *Streptococcus gordonii* Poised for Glycan Feeding through a MUC5B-Discriminating, Lipoteichoic Acid-Mediated Outside-In Signaling Circuit[J]. *J Bacteriol*, 2022,204(6): e11822.
- [53] LANNES-COSTA P S, de OLIVEIRA J, DA S S G, et al. A current review of pathogenicity determinants of *Streptococcus* sp[J]. *J Appl Microbiol*, 2021,131(4): 1600-1620.
- [54] GRADSTEDT H, IOVINO F, BIJLSMA J J. *Streptococcus pneumoniae* invades endothelial host cells via multiple pathways and is killed in a lysosome dependent manner[J]. *PLoS One*, 2013,8(6): e65626.
- [55] RING A, WEISER J N, TUOMANEN E I. Pneumococcal trafficking across the blood-brain barrier. Molecular analysis of a novel bidirectional pathway[J]. *J Clin Invest*, 1998,102(2): 347-360.
- [56] 刘一平. 一种新的 IgG 结合物——链球菌蛋白 G[J]. *中国兽医科技*, 1991(01): 65-66.
- [57] FROST H R, DAVIES M R, DELFORGE V, et al. Analysis of Global Collection of Group A *Streptococcus* Genomes Reveals that the Majority Encode a Trio of M and M-Like Proteins[J]. *mSphere*, 2020,5(1).
- [58] BERGMANN S, EICHHORN I, KOHLER T P, et al. SCM, the M Protein of *Streptococcus canis* Binds Immunoglobulin G[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2017,7: 80.
- [59] MILLS J O, GHOSH P. Nonimmune antibody interactions of Group A *Streptococcus* M and M-like proteins[J]. *PLoS Pathog*, 2021,17(2): e1009248.
- [60] MA Z, ZHANG H, YI L, et al. Microarray analysis of the effect of *Streptococcus equi* subsp.



- zooepidemicus M-like protein in infecting porcine pulmonary alveolar macrophage[J]. PLoS One, 2012,7(5): e36452.
- [61] CARLSSON F, BERGGARD K, STALHAMMAR-CARLEMALM M, et al. Evasion of phagocytosis through cooperation between two ligand-binding regions in *Streptococcus pyogenes* M protein[J]. J Exp Med, 2003,198(7): 1057-1068.
- [62] HUIH S, THELWELL C, LONGSTAFF C. Activity Regulation by Fibrinogen and Fibrin of Streptokinase from *Streptococcus Pyogenes*[J]. PLoS One, 2017,12(1): e170936.
- [63] FEIL S C, ASCHER D B, KUIPER M J, et al. Structural studies of *Streptococcus pyogenes* streptolysin O provide insights into the early steps of membrane penetration[J]. J Mol Biol, 2014,426(4): 785-792.
- [64] FLAHERTY R A, DONAHUE D L, CAROTHERS K E, et al. Neutralization of Streptolysin S-Dependent and Independent Inflammatory Cytokine IL-1beta Activity Reduces Pathology During Early Group A Streptococcal Skin Infection[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2018,8: 211.
- [65] HURST J R, BROUWER S, WALKER M J, et al. Streptococcal superantigens and the return of scarlet fever[J]. PLoS Pathog, 2021,17(12): e1010097.
- [66] KUTZ R, OKWUMABUA O. Differentiation of highly virulent strains of *Streptococcus suis* serotype 2 according to glutamate dehydrogenase electrophoretic and sequence type[J]. J Clin Microbiol, 2008,46(10): 3201-3207.
- [67] 李雅静, 高志清, 赵宝华. 猪链球菌检测及猪链球菌病防治的研究进展[J]. 中国兽药杂志, 2007(10): 39-43.
- [68] XIA X J, WANG L, SHEN Z Q, et al. Development of an Indirect Dot-PPA-ELISA using glutamate dehydrogenase as a diagnostic antigen for the rapid and specific detection of *Streptococcus suis* and its application to clinical specimens[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2017,110(4): 585-592.
- [69] 李秀英, 马睿麟, 王云平, 等. 青海高原地区羊链球菌病流行病学调查与综合防治[J]. 中国兽医杂志, 2014,50(07): 45-46.
- [70] 张昆丽, 林本夫, 席振军, 等. 猪链球菌纳米 PCR 检测方法的建立和应用[J]. 华北农学报, 2021,36(04): 212-217.
- [71] 雷宇平, 王仲兵, 杨治平, 等. 猪链球菌荧光定量 PCR 检测方法的建立及临床应用[J]. 中国动物检疫, 2017,34(12): 84-87.
- [72] 吴静波, 南文金, 黄健强, 等. 猪链球菌通用型和 2 型双重荧光定量 PCR 快速检测技术的建立和应用[J]. 畜牧兽医学报, 2018,49(02): 368-377.
- [73] 郑添予, 于龙政, 徐晓琪, 等. 牛源乳房链球菌、无乳链球菌、停乳链球菌三重实时荧

- 光定量 PCR 法的建立及初步应用[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2022(12): 69-73.
- [74] 肖树萍. 山羊链球菌病的防治[J]. 中兽医学杂志, 2019(04): 70.
- [75] 沈艳丽, 蔡金山, 马睿麟, 等. 青海同仁藏系绵羊链球菌病诊断及防治[J]. 中国兽医杂志, 2012,48(08): 36-37.
- [76] 张丹. 新疆北屯垦区羊细菌性传染病流行病学调查[D]. 石河子大学, 2019.
- [77] ZAMORA L, PEREZ-SANCHO M, FERNANDEZ-GARAYZABAL J F, et al. *Streptococcus ovuberis* sp. nov., isolated from a subcutaneous abscess in the udder of a sheep[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2017,67(11): 4340-4344.
- [78] SU Y, SUN X, ZHAO S, et al. Dietary alfalfa powder supplementation improves growth and development, body health, and meat quality of Tibetan sheep[J]. Food Chem, 2022,396: 133709.
- [79] ZHANG X, HAN L, HOU S, et al. Effects of different feeding regimes on muscle metabolism and its association with meat quality of Tibetan sheep[J]. Food Chem, 2022,374: 131611.
- [80] STRITOF Z, MITCHELL C, TURK N, et al. Seroprevalence of *Streptococcus equi* subspecies *equi* in Croatia - Short communication[J]. Acta Vet Hung, 2021,68(4): 361-363.
- [81] LING A S, UPJOHN M M, WEBB K, et al. Seroprevalence of *Streptococcus equi* in working horses in Lesotho[J]. Vet Rec, 2011,169(3): 72.
- [82] LAN L. Serological investigation of *Streptococcus suis* type 2 and drug resistance of enterococcus Sp[D]. Huazhong Agricultural University, 2017.
- [83] 陈鑫焯, 李军朝, 吕文新, 等. 一株羊链球菌的分离与鉴定[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2017(02): 110-112.
- [84] YU J, ZHOU T, ZHU B, et al. Species-Specific Identification of *Streptococcus* based on DNA Marker in 16S-23S rDNA Internal Transcribed Spacer[J]. Curr Microbiol, 2020,77(8): 1569-1579.
- [85] ZAMORA L, PEREZ-SANCHO M, FERNANDEZ-GARAYZABAL J F, et al. *Streptococcus ovuberis* sp. nov., isolated from a subcutaneous abscess in the udder of a sheep[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2017,67(11): 4340-4344.
- [86] 朱相儒, 吴白, 易成功, 等. 羊属链球菌的分离鉴定及其致病性的初步研究[J]. 中国兽医科学, 2016,46(01): 26-30.
- [87] 张兴民, 张焕容, 汤承, 等. 牦牛源牛链球菌的分离鉴定及部分生物学特性研究[J]. 中国畜牧兽医, 2016,43(12): 3314-3321.
- [88] 胡钱东, 林强, 石存斌, 等. 草鱼致病性类志贺邻单胞菌的分离与鉴定[J]. 微生物学报,

- 2014,54(02): 229-235.
- [89] 胡继红高振翔尹铭芳. 美国 NCCLS2002 年版抗生素药敏试验操作标准更新内容[J]. 中华检验医学杂志, 2002(06): 46-48.
- [90] 谢珊珊, 刀筱芳, 祝存录, 等. 山羊源链球菌的分离鉴定及其药物敏感性分析[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2015(15): 171-173.
- [91] STEWARD K F, ROBINSON C, HOLDEN M, et al. Diversity of *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* strains isolated from the Spanish sheep and goat population and the identification, function and prevalence of a novel arbutin utilisation system[J]. *Vet Microbiol*, 2017,207: 231-238.
- [92] LAS H A, VELA A I, FERNANDEZ E, et al. Unusual outbreak of clinical mastitis in dairy sheep caused by *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*[J]. *J Clin Microbiol*, 2002,40(3): 1106-1108.
- [93] 张总超, 阚威, 林元清, 等. 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(04): 49-53.
- [94] 王丽扬, 王铨皓, 许倩倩, 等. 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(03): 109-111.
- [95] NG S C, WONG H K, SO C K, et al. *Streptococcus bovis* bacteraemia should be investigated for early detection of colorectal pathology[J]. *Hong Kong Med J*, 2019,25(5): 414.
- [96] CHEN P, QIU Y, LIU G, et al. Characterization of *Streptococcus lutetiensis* isolated from clinical mastitis of dairy cows[J]. *J Dairy Sci*, 2021,104(1): 702-714.
- [97] 付明哲, 李长安, 白涛, 等. 羊链球菌的自动鉴定和耐药性分析[J]. 西北农业学报, 2014,23(01): 36-40.
- [98] 王雨朦. 马链球菌马亚种的分离鉴定、致病性检测和抗菌药物筛选[D]. 新疆农业大学, 2017.
- [99] 黄荣, 索佳佳, 高楠楠, 等. 青海毛驴马腺疫病原菌的分离鉴定[J]. 青海畜牧兽医杂志, 2021,51(05): 39-42.
- [100] 邓汝森, 张海龙, 颜广智, 等. 猪源马链球菌兽疫亚种分离鉴定[J]. 畜牧与兽医, 2021,53(09): 66-70.
- [101] 程龙飞, 吴志强, 刘荣昌, 等. 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(06): 1158-1161.
- [102] 周宇, 邱启官. 一例骆驼马链球菌病诊治[J]. 湖南畜牧兽医, 2014(05): 30-31.
- [103] 王冰艺, 马弘财, 邹明昊, 等. 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(02): 745-753.

- 
- [104] KOREN S, WALENZ B P, BERLIN K, et al. Canu: scalable and accurate long-read assembly via adaptive k-mer weighting and repeat separation[J]. *Genome Res*, 2017,27(5): 722-736.
- [105] DELCHER A L, BRATKE K A, POWERS E C, et al. Identifying bacterial genes and endosymbiont DNA with Glimmer[J]. *Bioinformatics*, 2007,23(6): 673-679.
- [106] BESEMER J, BORODOVSKY M. GeneMark: web software for gene finding in prokaryotes, eukaryotes and viruses[J]. *Nucleic Acids Res*, 2005,33(Web Server issue): W451-W454.
- [107] BLAND C, RAMSEY T L, SABREE F, et al. CRISPR recognition tool (CRT): a tool for automatic detection of clustered regularly interspaced palindromic repeats[J]. *BMC Bioinformatics*, 2007,8: 209.
- [108] AKHTER S, AZIZ R K, EDWARDS R A. PhiSpy: a novel algorithm for finding prophages in bacterial genomes that combines similarity- and composition-based strategies[J]. *Nucleic Acids Res*, 2012,40(16): e126.
- [109] BLIN K, SHAW S, STEINKE K, et al. antiSMASH 5.0: updates to the secondary metabolite genome mining pipeline[J]. *Nucleic Acids Res*, 2019,47(W1): W81-W87.
- [110] WALLER A S, PAILLOT R, TIMONEY J F. *Streptococcus equi*: a pathogen restricted to one host[J]. *J Med Microbiol*, 2011,60(Pt 9): 1231-1240.
- [111] WALLER A S, ROBINSON C. *Streptococcus zooepidemicus* and *Streptococcus equi* evolution: the role of CRISPRs[J]. *Biochem Soc Trans*, 2013,41(6): 1437-1443.
- [112] PARK S Y, LEE M, LIM S R, et al. Complete genome sequence of *Streptococcus equinus* CNU\_G6, isolated from the rumen of native Korean cattle[J]. *Korean Journal of Microbiology*, 2020,56(2): 190-192.