

# 两株驴源马链球菌兽疫亚种流行株的生物学特性及全基因组序列的比较分析

彭靖轩, 蒋新宇, 田裕辉, 宋丹丹, 张宝江, 苏艳\*

新疆农业大学 动物医学学院, 新疆 乌鲁木齐

彭靖轩, 蒋新宇, 田裕辉, 宋丹丹, 张宝江, 苏艳. 两株驴源马链球菌兽疫亚种流行株的生物学特性及全基因组序列的比较分析[J]. 微生物学报, 2025, 65(10): 4637-4652.

PENG Jingxuan, JIANG Xinyu, TIAN Yuhui, SONG Dandan, ZHANG Baojiang, SU Yan. Comparison of the biological characteristics and whole genomes between two donkey-derived isolates of *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2025, 65(10): 4637-4652.

**摘要:** 【目的】开展新疆 2 株驴源马链球菌兽疫亚种(*Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*, SEZ)不同区域流行株(YLCD588 和 HT222)的致病特征、耐药特点、多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST)及其基因组比较分析,明确该菌的分子进化规律,分析该菌致病性和耐药性相关的基因和表型特征,探究 SEZ 的致病与耐药机制,为该菌的防控提供科学依据。【方法】利用二代测序技术对分离菌株进行全基因组测序,将测序数据与数据库中已有序列构建 MLST 发育树;利用毒力因子数据库(<https://www.mgc.ac.cn/VFs/>)和基因组流行病学中心数据库(<http://genomicepidemiology.org>)对其毒力基因和耐药基因分别进行注释和比较;对 2 株菌的生长、药物敏感性和生物膜形成进行检测与比较。将菌株分别接种小鼠,观察比较实验动物的发病情况,并对发病小鼠的肺脏和脾脏组织进行病理组织学观察和组织菌体载量的检测比较。【结果】测序结果显示,HT222 与 YLCD588 基因组大小分别为 2 105 005 bp 和 2 090 225 bp,分别有 1 995 个和 1 905 个编码区,HT222 共有 214 个毒力基因, YLCD588 共有 212 个毒力基因; HT222 携带有 235 个耐药基因, YLCD588 共有 233 个耐药基因。 YLCD588 为一个新的 ST 型 ST545, MLST 系统发育树显示 YLCD588 与山羊源 SEZ 具有最近的亲缘关系,而 HT222 则与犬源 SEZ 最近。 YLCD588 对 6 种抗生素耐药, HT222 对 4 种抗生素耐药。结晶紫法( $P<0.05$ )和共聚焦显微观察均表明 YLCD588 生物膜形成能力显著高于 HT222,而 HT222 菌株对小鼠致死率( $P<0.05$ )及组织荷菌量( $P<0.01$ )显著高于 YLCD588,且对小鼠病理损伤更严重。【结论】2 株流行株具有不同的基因组特征、序列分型(sequence type, ST)、致病和耐药特征, HT222 比 YLCD588 携带毒力和耐药基因多,致病表型

资助项目: 新疆维吾尔自治区“三农”骨干人才培养资助项目(2023SNGGGCC001)

This work was supported by the Three Agricultural Key Personal Training Project of Xinjiang Uygur Autonomous Region (2023SNGGGCC001).

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

Received: 2025-03-26; Accepted: 2025-04-25; Published online: 2025-06-04

更强；YLCD588 比 HT222 生物膜形成能力强，耐药表型显著；拓宽了对不同驴源 SEZ 分子流行、致病与耐药机制的认识，为有效控制 SEZ 的感染传播以及临床治疗提供了参考。

关键词：驴源马链球菌兽疫亚种；基因组比较分析；多位点序列分型；致病性；耐药性

## Comparison of the biological characteristics and whole genomes between two donkey-derived isolates of *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*

PENG Jingxuan, JIANG Xinyu, TIAN Yuhui, SONG Dandan, ZHANG Baojiang, SU Yan \*

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

**Abstract:** [Objective] To deeply understand the molecular evolution pattern, pathogenicity, and drug resistance mechanism and provide a scientific basis for the prevention and control of *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* (SEZ), we compared the pathogenicity, drug resistance, and genome sequences of two SEZ strains (YLCD588 and HT222) isolated from donkeys in Xinjiang. [Methods] Whole-genome sequences of the two strains were determined by next-generation sequencing and a phylogenetic tree was constructed based on multilocus sequence typing (MLST) of sequencing data and existing sequences in the database. The virulence factor database (VFDB) (<https://www.mgc.ac.cn/VFs/>) and the center for genomic epidemiology (CGE) (<http://genomicepidemiology.org>) were used for annotation of the virulence and drug resistance genes of the two strains. The growth curves, antimicrobial susceptibility, and biofilm formation of the two strains were examined and compared. Mice were challenged with these strains separately and the pathogenicity of the strains was observed and evaluated. Then, histopathological changes and bacterial loads in the lung and spleen tissues of the morbid mice were observed and determined. [Results] Sequencing data showed that the genome sizes of YLCD588 and HT222 were 2 090 225 bp (1 905 coding sequences) and 2 105 005 bp (1 995 coding sequences), respectively. HT222 and YLCD588 carried 214 and 212 virulence genes, respectively. HT222 and YLCD588 had 235 and 233 drug resistance genes, respectively. YLCD588 was assigned to a novel sequence type (ST) 545 by MLST. The MLST phylogenetic tree indicated that YLCD588 was closely related to the goat-derived SEZ strain, while HT222 was closely related to the canine SEZ strain. YLCD588 displayed resistance to six antibiotics and HT222 exhibited resistance to four. The crystal violet assay and confocal laser scanning microscopy results showed that YLCD588 exhibited stronger biofilm formation than HT222 ( $P<0.05$ ), whereas HT222 caused higher mortality rate ( $P<0.05$ ), higher bacterial load ( $P<0.01$ ), and severer pathological damage in mice than YLCD588. [Conclusion] The two SEZ strains exhibit distinct genomic characteristics, sequence types, pathogenicity, and drug resistance. HT222 possesses more drug resistance genes and virulence genes and exhibits stronger pathogenicity than YLCD588, while YLCD588 showcases stronger biofilm formation and

drug resistance than HT222. These findings broaden the understanding about the molecular epidemiology, pathogenicity, and drug resistance of different SEZ strains from donkey and provide references for the effective control of the infection and spread of SEZ and clinical treatment of SEZ infection.

**Keywords:** donkey-derived *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*; genome comparison; multilocus sequence typing; pathogenicity; drug resistance

马链球菌兽疫亚种(*Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*, SEZ)是一种重要的人畜共患病原体, 可通过呼吸道或伤口感染马、驴、猪、猫、犬、绵羊、山羊、人等多种宿主, 并引发肺炎、化脓性关节炎及败血症等严重疾病<sup>[1]</sup>。近年来, 随着畜牧业的快速发展 SEZ 的跨宿主传播风险显著增加, 驴作为重要的经济动物, 其携带的 SEZ 可通过多种途径污染食品并传染给人, 对公共卫生构成威胁<sup>[2]</sup>。近年来, 新疆地区驴养殖业规模化发展迅速, 驴源 SEZ 感染病例明显增加。SEZ 的基因组表现出显著的多样性<sup>[3]</sup>, 了解驴源 SEZ 的优势基因型、流行特点、毒力基因分布及耐药特征可为临床有效控制 SEZ 的传播及合理使用抗生素提供依据。

全基因组测序技术的发展已深刻改变了人们对病原体耐药机制、致病机制及进化等方面的认识<sup>[4]</sup>。采用该技术对细菌的遗传特征、毒力因子、耐药基因等进行比较分析已显示出极大的应用价值<sup>[5]</sup>。2016年, 广西发生了猪链球菌感染人的事件, Huang 等<sup>[6]</sup>对从患者体内分离出的 6 株猪链球菌进行了全基因组测序, 首次证实 ST665 可以感染人, 并通过将序列与其他流行株比较发现 6 株菌与越南分离菌株的亲缘关系更为密切。Wang 等<sup>[7]</sup>对 52 株猪链球菌血清 31 型进行了全基因组测序, 发现第 3 群菌株的耐药基因主要由前噬菌体携带, 这一结果与传统观点认为猪链球菌耐药基因主要由整合性接合元件和可移动元件携带有所不同。

多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST)是研究细菌进化关系的常用手段, 通过

对菌株特定看家基因在全球数据库中进行序列比对分析, 根据等位基因序列型特征可得出细菌的菌群变异和进化特点, 有助于对 SEZ 的分型和进化研究<sup>[8]</sup>。此外, MLST 数据库可将国内外不同时间和不同动物源细菌的等位基因序列研究成果进行比较, 有利于该病的分子流行病学和防控研究<sup>[9]</sup>。

对驴源 SEZ 不同地区的分离株进行全基因组测序、分子分型研究和进化特征分析可更好地了解流行菌株之间的关系, 为合理有效防控人畜共患病提供科学依据。目前关于驴源 SEZ 不同流行菌株的致病性、耐药性比较分析及遗传进化的研究非常有限, SEZ 分离株的 MLST 数据多集中于马源和猪源 SEZ<sup>[10-11]</sup>, 这限制了该病针对性的高效防控策略的制定。不同 SEZ 流行株的基因组组成及数量差异较大<sup>[12]</sup>, 开展 SEZ 不同流行株的分离和遗传特征分析, 并通过基因组和生物特性比较分析种内不同流行株的进化、致病和耐药性差异非常必要。

本研究以新疆地区驴源 SEZ 不同流行株(HT222 与 YLCD588)为研究对象, 对其进行全基因组测序分析, 重点分析其 MLST、遗传进化关系、毒力基因的分布和差异以及耐药基因的差异, 并结合致病性、耐药表型及生物膜形成等表型实验, 以期了解新疆驴源 SEZ 不同流行株的致病性、耐药性和 MLST 进化特点, 探究驴源 SEZ 的分子流行特征及致病和耐药机制, 为有效控制新疆地区驴源 SEZ 感染和传播以及临床治疗提供参考, 也为进一步开展致病和耐药机制研究奠定基础。

# 1 材料与方法

## 1.1 菌株

本研究中的 2 株驴源 SEZ (HT222 与 YLCD588) 分别于 2023 年分离自新疆南部和北部规模驴场病驴的下颌病变组织中。分离菌株及药敏试验质控菌株金黄色葡萄球菌 ATCC 29213 均保存于新疆农业大学动物医学学院微生物实验室。

## 1.2 主要试剂和培养基

细菌基因组提取试剂盒、胶回收试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司; 药敏试纸, 杭州滨合微生物试剂有限公司; THB 培养基、MHB 培养基, 青岛高科技工业园海博生物技术有限公司。

## 1.3 实验动物

6-7 周龄的 SPF 级昆明小白鼠(20-25 g)购自新疆医科大学动物实验中心。小鼠饲养于条件良好的环境中, 自由采食及饮水。本研究所有动物实验通过新疆农业大学实验动物伦理委员会批准, 编号为 2023035。

## 1.4 全基因组测序及 MLST

将 2 株分离株接种于 Todd-Hewitt Broth (THB) 培养基中, 37 °C、180 r/min 培养至  $OD_{600}$  为 1.4, 6 000 r/min 离心 2 min 收集菌体, 提取基因组 DNA, 委托上海美吉生物医药科技有限公司进行菌株二代全基因组测序、组装。将全基因组序列信息注册至 GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 数据库中, 并通过 NCBI 的基因组注释 PGAP 对组装后的基因组序列进行注释。蛋白编码序列采用 Diamond 0.8.35 软件及同源蛋白数据库(cluster of orthologous groups of proteins, COG) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/>)、基因功能分析数据库(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) (<http://www.genome.jp/kegg/kegg2.html>)<sup>[13]</sup> 2 个数据库进行功能分析。

将全基因组序列上传至毒力因子数据库(virulence factor database, VFDB)<sup>[14]</sup> (version 4.0),

对 2 株分离菌的毒力基因进行分析, 获得该菌株相关毒力因子信息; 将全基因组序列上传至抗生素耐药数据库 (comprehensive antibiotic resistance database, CARD)<sup>[15]</sup> (version 1.1.3), 注释 2 株分离菌携带的耐药基因。

将 2 株菌的测序结果中的 7 个管家基因(*arcC*、*nrdE*、*proS*、*spi*、*tdk*、*tpi* 和 *yqiL*) 序列结合 *S. zooepidemicus* MLST 数据库 (<https://pubmlst.org/szooepidemicus>), 确定分离菌株 HT222 与 YLCD588 的 ST 型, 进一步在 MLST 数据库中将 2 株驴源 SEZ 菌株与 1900 年至 2023 年来自 22 个国家 (UK、USA、Spain、New Zealand、Iceland、Denmark、Ireland、Belgium、Sweden、Argentina、Finland、Australia、Japan、Saudi Arabia、Portugal、Netherlands、Brazil、China、Faroe Islands、New Caledonia、Norway、United Arab Emirates) 的 20 株人源及 123 株不同动物 (驴、犬、牛、山羊、马、绵羊) 源共 145 株 SEZ 分离株进行比对分析, 采用 MStree v2 算法构建 GrapeTree 进行 MLST 分析<sup>[16]</sup>。

## 1.5 分离菌生长曲线的测定

将 SEZ HT222、YLCD588 分别接种于 THB 培养基中, 37 °C、180 r/min 培养, 于接种后每隔 2 h 分别收取菌液, 测量  $OD_{600}$  吸光值, 每次测量设置 3 个重复<sup>[17]</sup>, 绘制细菌生长曲线。

## 1.6 生物膜的形成测定

生物膜形成的检测采用 2 种方法: 结晶紫染色法和激光共聚焦显微镜 (confocal laser scanning microscopy, CLSM) 观察法<sup>[18]</sup>。对分离株生物膜进行染色<sup>[19]</sup>, 取对数生长期菌液 100  $\mu$ L 加入 96 孔细胞培养板中, 分别在 6、12、20、30、40、50、60、70 h 取样处理。吸除上层培养基并用 PBS 洗涤, 晾干后加入 0.1% 结晶紫染液, 静置染色 30 min。吸除染液后再用无菌 PBS 洗涤 3 次, 用 95% 乙醇脱色 30 min, 测定 595 nm 光密度值。

CLSM 观察法是将 SEZ HT222、YLCD588

菌液分别加入腔室载玻片中, 培养 48 h 后, 吸除上层培养基并用无菌 PBS 洗涤 2 次, 用 0.3% SYTO-9 避光染色 15 min, 吸除染液晾干后, 加入 2.5% 的戊二醛溶液固定 30 min, 晾干并滴加 BacLight™ Mounting Oil, CLSM 观察<sup>[19]</sup>。

### 1.7 分离株的耐药特性检测

采用 K-B 纸片扩散法<sup>[20]</sup>检测 2 株分离菌 HT222、YLCD588 对 22 种抗生素(青霉素、阿莫西林、氨苄西林、头孢唑肟、厄他培南、美罗培南、万古霉素、氯霉素、链霉素、红霉素、阿奇霉素、克拉霉素、多西环素、土霉素、四环素、替加环素、左氧氟沙星、氧氟沙星、加替代星、林可霉素、磺胺嘧啶钠、泰妙灵)的敏感性。将菌液均匀涂布到 MH 琼脂培养基上, 再将药敏纸片贴在培养基表面, 37 °C 培养过夜后测量抑菌圈的直径, 根据美国临床和实验室标准协会的药物敏感性判定标准判定分离菌株 HT222、YLCD588 对药物的敏感性。

### 1.8 小鼠毒力检测

将 30 只小鼠随机分为 3 组, 分别为 HT222 组、YLCD588 组和对照组, 每组 10 只。每组小鼠分别腹腔接种浓度为  $1 \times 10^7$  CFU/mL 的菌液 (1 mL), 其中 HT222 组和 YLCD588 组分别接种对应分离菌株液, 对照组注射等体积的 PBS。接种后观察并记录小鼠 7 d 内的存活情况与状态, 绘制小鼠生存曲线。对死亡或发病小鼠取肺脏、脾脏组织, 用福尔马林固定, 制作石蜡切片, 进行苏木精-伊红染色(hematoxylin-eosin stainin, HE)染色并观察病理组织学变化。取不同组小鼠的肺脏和脾脏匀浆, 并用 PBS 稀释至  $10^{-3}$ , 涂布在 THB 固体培养基培上进行脏器荷菌量检测<sup>[21]</sup>。

表1 两株SEZ菌株基因组特征

Table 1 Genomic characteristics of the two SEZ isolates

Strain name	Genome size (bp)	Scaffold number	G+C content (%)	CDS number	tRNA number	rRNA number
YLCD588	2 090 225	37	41.44	1 905	33	3
HT222	2 105 005	35	41.42	1 995	39	3

## 1.9 统计分析

应用 SPSS 19.0 软件进行统计分析, 所有试验至少重复 3 次, 数据以均值(mean)±标准差(SD)表示, 组间差异采用双侧 *t* 检验。

## 2 结果与分析

### 2.1 基因组测序结果

两个 SEZ 分离株的基因组特征如表 1 所示, 全基因组测序结果显示菌株 YLCD588 和 HT222 的 G+C 含量分别为 41.44% 和 41.42%, 总长度分别为 2 090 225 bp 和 2 105 005 bp。经基因组注释, 预测编码蛋白质的序列分别为 1 905 个和 1 995 个。测序结果已上传至 GenBank 数据库并获得相应的登录号。

### 2.2 MLST 结果

分别从 2 株分离菌基因组 DNA 测序结果中获得 7 个管家基因(*arcC*、*nrdE*、*proS*、*spi*、*tdk*、*tpi* 和 *yqiL*)的序列。2 株分离菌测序后分别属于 2 个不同的序列型(ST) (表 2), YLCD588 为 ST545, HT222 为 ST420, 其中 ST545 为新发现的 ST 型。将 2 株分离株与其他 143 株不同动物源和不同 ST 型的 SEZ 参考株构建最小生成树(图 1)。结果显示, 145 株菌形成 2 个主要分支: ST40 分支和 ST365 分支。本研究中的 2 株驴源分离株 ST545 和 ST420 均属于 ST365 分支。最小生成树显示, 本研究的 2 株驴源 SEZ 分离株 YLCD588 (ST545)和 HT222 (ST420)分别与不同动物源 ST 型的亲缘关系较近。YLCD588 (ST545) 与山羊源 SEZ (ST265)、驴源 SEZ (ST533)、马源 SEZ (ST278)的亲缘关系较近, HT222 (ST420)与犬源 SEZ (ST318)、犬源 SEZ (ST327)、马源 SEZ (ST300)、人源 SEZ (ST194)

表2 两株SEZ菌株看家基因及ST型

Table 2 House-keeping genes and ST types of the two SEZ strains

Strains name	YLCD588	HT222
ST	545	420
<i>tdk</i>	20	22
<i>nrdE</i>	11	64
<i>proS</i>	10	10
<i>tpi</i>	14	49
<i>spi</i>	82	45
<i>arcC</i>	12	12
<i>yqiL</i>	11	12

的亲缘关系较近,说明2株不同ST型驴源SEZ具有不同的动物传播和进化特征。

### 2.3 同源基因分析

HT222与YLCD588基因组的共线性比较结果表明,2个分离株之间存在基因的移位和倒位(图2A)。HT222特有基因数量为270个,YLCD588特有基因数量为201个,2株菌共有

基因1686个(图2B),表明2株菌具有不同的基因组遗传特征。

### 2.4 COG及KEGG注释分析

将分离株HT222与YLCD588的序列与数据库进行比对注释( $E\text{-value} \leq 1 \times 10^{-5}$ ),分别有1710个和1669个基因被注释到23种COG功能分类中。2株菌中编码翻译、核糖体结构和生物合成(translation, ribosomal structure and biogenesis)相关功能的基因数量最多,分别为199个。HT222编码复制、重组和修复(replication, recombination and repair)的基因数量(112个)比YLCD588(96个)多;HT222编码移动基因组、前噬菌体和转座子(mobilome, prophages and transposons)的基因数量(39个)比YLCD588(22个)多;而YLCD588编码防御因子(defense mechanisms)的基因数量(71个)比HT222(59个)多(图3)。

HT222和YLCD588分别有1700个和1668个蛋白被注释到KEGG功能分类中。其

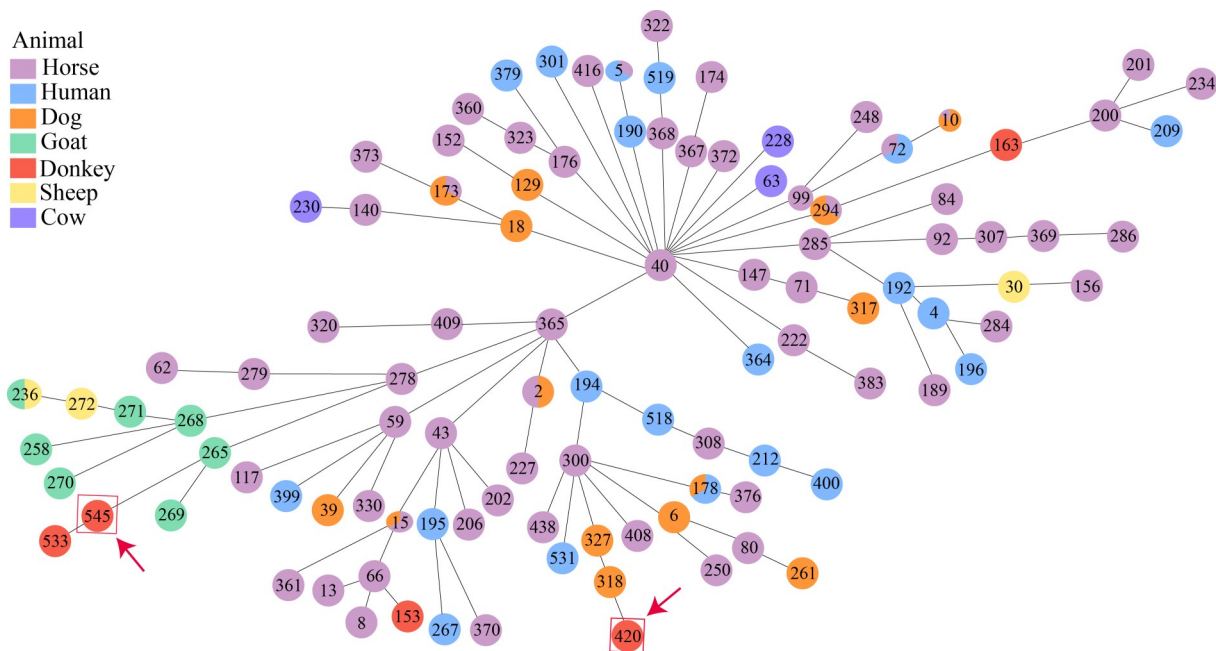


图1 基于马链球菌兽疫亚种ST型的最小生成树

Figure 1 Minimum spanning tree constructed based on the ST types of *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*.

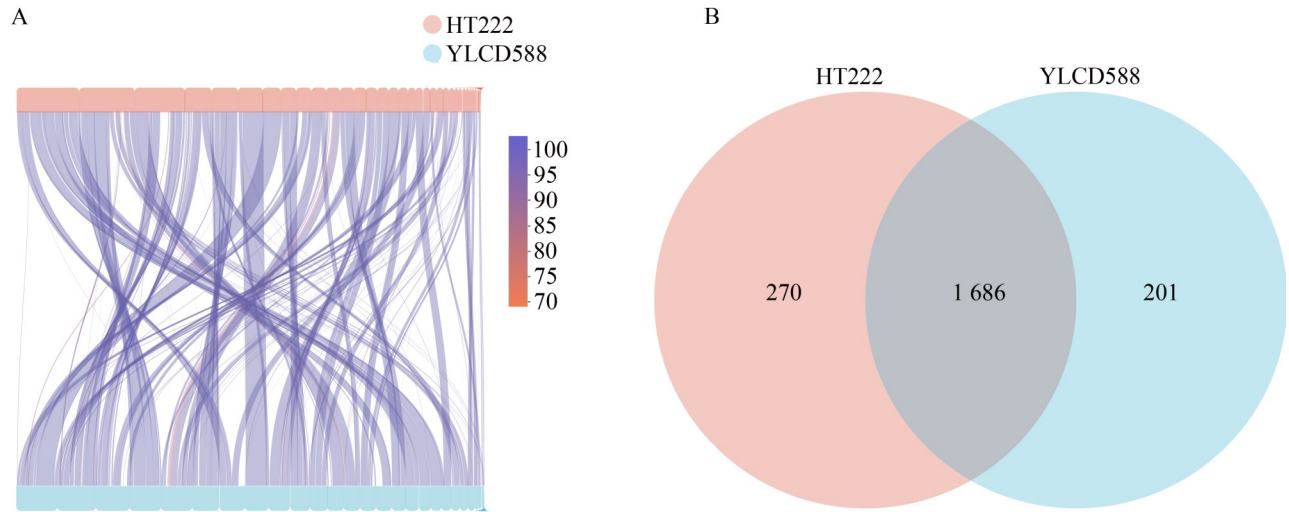


图2 分离株同源基因分析

Figure 2 Homologous gene analysis of isolates. A: Homologous genes collinearity analysis of YLCD588 and HT222; B: Homologous genes Venn diagram of YLCD588 and HT222.

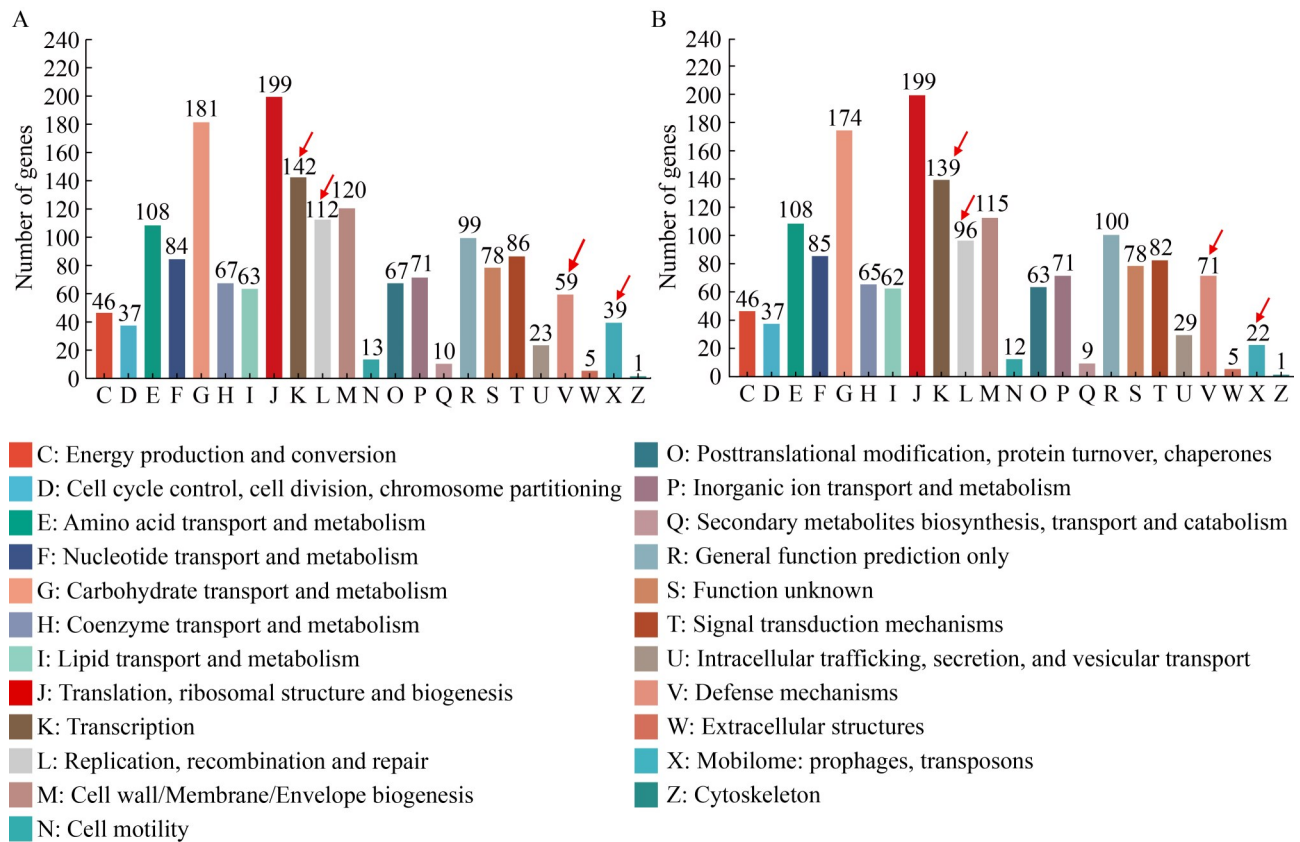


图3 COG功能分类分析结果

Figure 3 COG functional classification analysis results. A: HT222; B: YLCD588.

中，参与新陈代谢(metabolism)的 global and overview maps 基因数量最多，HT222 和 YLCD588 分别有 416 个和 408 个相关基因；其次是碳水化合物代谢(carbohydrate metabolism)，HT222 和 YLCD588 分别有 184 个和 178 个相关基因；膜转运(membrane transport)相关基因数量分别为 158 个和 155 个(图 4)。

## 2.5 耐药基因注释结果

分离株 HT222 与 YLCD588 的全基因组序列经 CARD (v3.2.9)数据库注释，通过 BLAST ( $E\text{-value}\leq 1\times 10^{-5}$ )共发现 11 类抗性基因，包括  $\beta$ -内酰胺类、氨基糖苷类、大环内酯类、四环素类、氟喹诺酮类、肽类、糖肽类、林可酰胺类、恶唑烷酮类、氨基香豆素类和截短侧耳素类(图 5)。

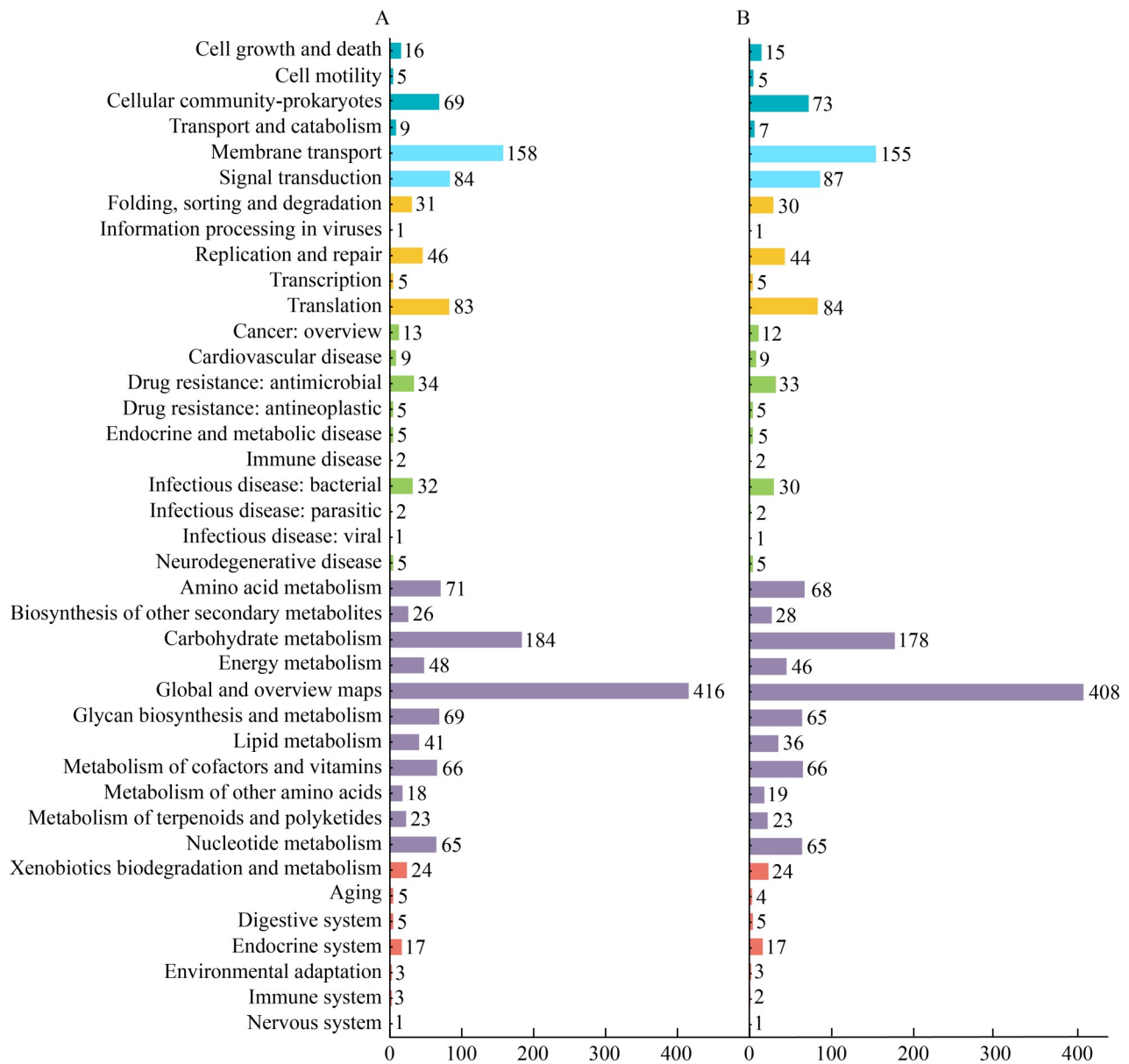


图4 分离株YLCD588和HT222的KEGG注释分析

Figure 4 KEGG annotation analysis of the isolates HT222 and YLCD588. A: HT222; B: YLCD588.

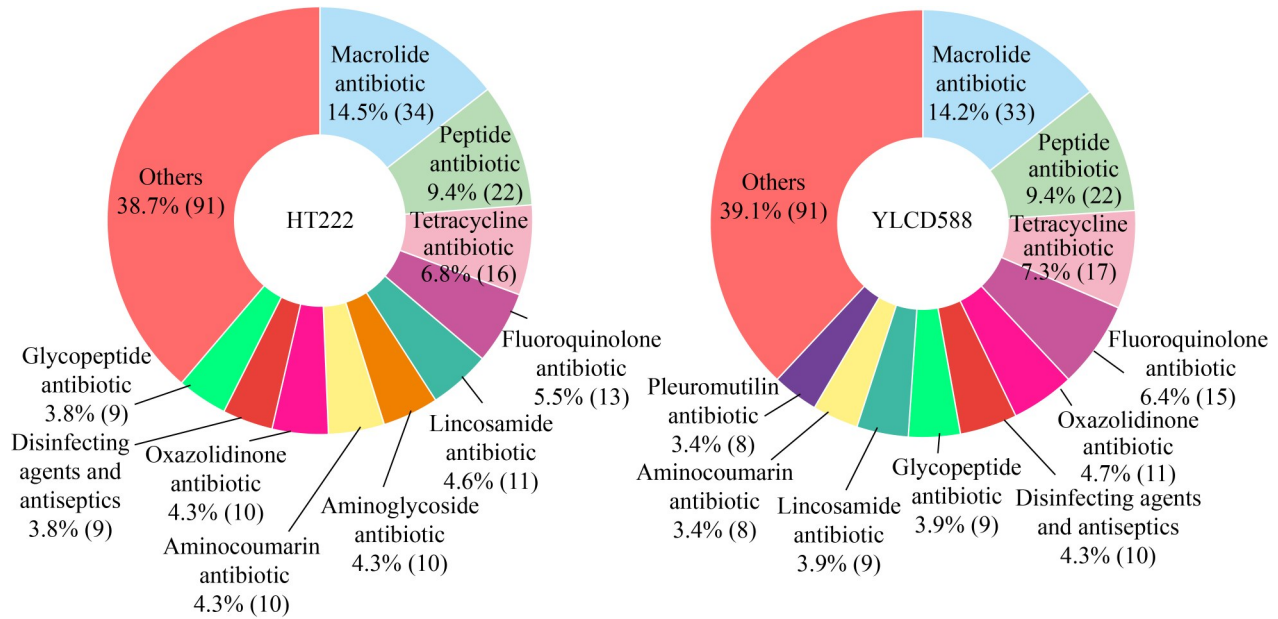


图5 分离株耐药基因预测

Figure 5 Prediction of antibiotic resistance genes in isolates.

HT222 携带 235 个耐药基因，而 YLCD588 携带 233 个耐药基因。2 个菌株的差异基因主要包括：HT222 携带糖肽类耐药基因 *vanXY*，Y 而 LCD588 携带糖肽类耐药基因 *vanY*；HT222 缺乏大环内酯类耐药基因 *mupA* 和四环素类耐药基因 *tetA*，而 YLCD588 携带大环内酯类耐药基因 *mupA* 和四环素类耐药基因 *tetA* (表 3)。

### 2.6 毒力基因注释结果

经 VFDB (v20240301)数据库注释和 BLAST 比对分析( $E\text{-value} \leq 1 \times 10^{-5}$ )比对后，结果显示分

表3 分离株耐药基因差异

Table 3 Drug resistance genes differences of isolates

Antibiotics	Drugs	HT222	YLCD588
Macrolides	Erythromycin		<i>mupA</i>
	Clarithromycin		
	Azithromycin		
Tetracyclines	Doxycycline		<i>tetA</i>
	Tetracycline		
	Tetracycline		
	Tigecycline		
Glycopeptide	Vancomycin	<i>vanXY</i>	<i>vanY</i>

离株 HT222 基因组中共检测到 214 个毒力基因，分离株 YLCD588 基因组中共检测到 212 个毒力基因，包括免疫调节因子、营养代谢因子、外毒素、效应器输送系统、黏附因子、生物膜形成因子和侵袭性蛋白(图 6)。2 个菌株中共有 6 种毒力基因存在差异，主要包括免疫因子 (*pbpG* 和 *ctrD*)、营养代谢因子(*pvdJ*)、外毒素 (*clbN*)、黏附因子(*can*、*acm* 和 *spaP/pac*)、生物膜形成因子(*fsrC*)和胞外酶(*sak*)。具体而言，HT222 缺乏营养代谢因子基因 *pvdJ* 和生物膜形成相关基因，HT222 不含 *fsrC* 基因；YLCD588 缺乏外毒素基因 *clbN* 和胞外酶基因 *sak* (表 4)。

### 2.7 分离株生长曲线测定和生物膜形成能力

HT222 和 YLCD588 的生长曲线存在差异(图 7)。通过结晶紫染色法检测 2 种菌的生物被膜形成能力(图 8)，不同时间点的 595 nm 波长处光密度值比较表明，随着时间的增加 2 株菌的生物被膜形成能力逐渐增强。培养至 50 h 时，2 株菌的生物被膜形成均达到最高水平，YLCD588

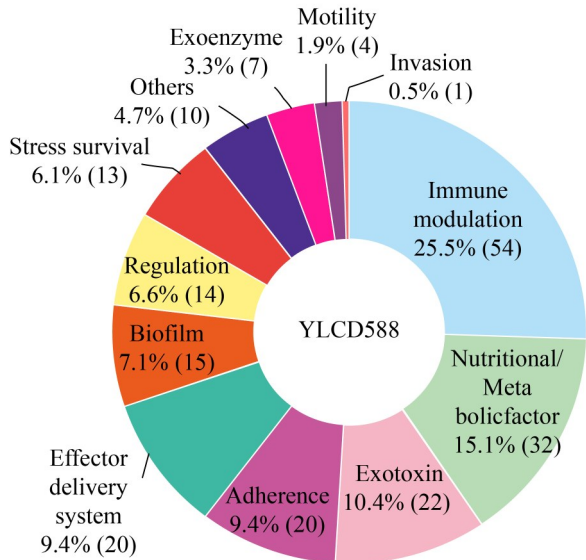
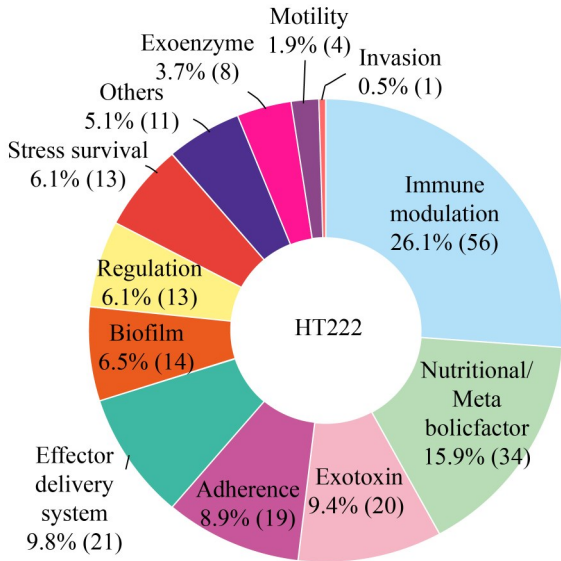


图6 两株菌的毒力基因预测

Figure 6 Prediction of virulence genes of two isolates.

表4 分离株毒力基因差异

Table 4 Different virulence genes of isolates

Function	HT222	YLCD588
Immune	<i>pbpG</i>	<i>ctrD</i>
Nutritional/Metabolic factor		<i>pvdJ</i>
Exotoxin	<i>clbN</i>	
Adherence	<i>cna</i>	<i>Acm, spaP/pac</i>
Biofilm		<i>fsrC</i>
Exoenzyme	<i>sak</i>	

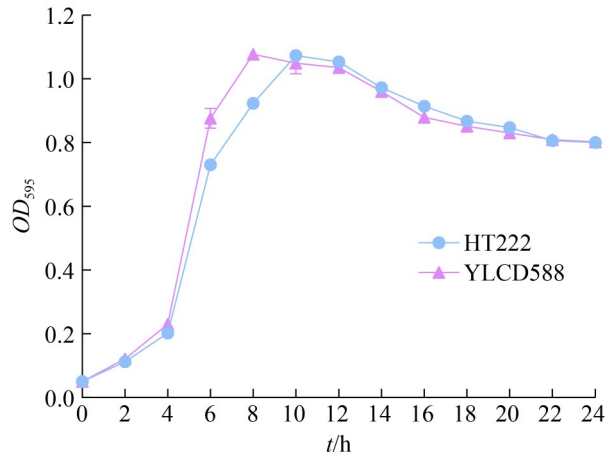


图7 两株菌的生长曲线

Figure 7 Growth curves of two strains.

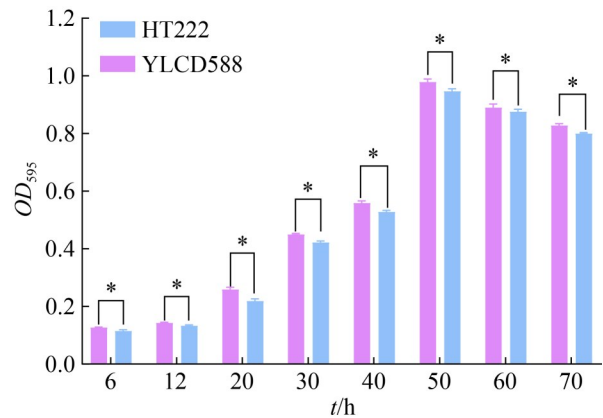


图8 结晶紫法检测2株菌的生物被膜

Figure 8 Detection of biofilms of two isolates using crystal violet. \*: 0.01 <math>P</math> <math>0.05</math>.

的生物被膜形成能力显著高于 HT222 ( $P < 0.05$ )。共聚焦扫描显微镜观察结果表明, YLCD588 的生物被膜结构更为紧密(图 9A), 而 HT222 的生物被膜结构相对疏松(图 9B)。

### 2.8 分离株的耐药特性

YLCD588 和 HT222 菌株对 22 种抗菌药物的药敏试验结果见表 5。YLCD588 对氨苄西林、阿莫西林、厄他培南、万古霉素、链霉素、加替沙星 6 种抗生素耐药; HT222 对链霉素、克拉霉素、土霉素、加替沙星 4 种抗生素耐药。

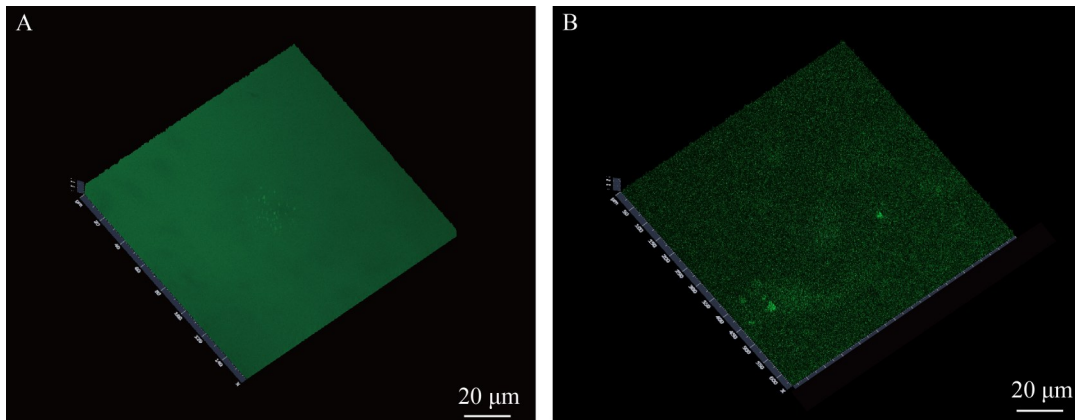


图9 共聚焦扫描显微镜观察2株菌的生物被膜

Figure 9 Confocal scanning microscopy observation of biofilms of YLCD588 (A) and HT222 (B).

表5 药敏试验结果

Table 5 Results of antibiotic sensitivity tests

Drugs	Inhibition zone diameters (mm)		Drug susceptibility	
	HT222	YLCD588	HT222	YLCD588
青霉素 Penicillin	36	36	S	S
头孢喹肟 Cefquinaxime	36	37	S	S
氨苄西林 Ampicilin	26	14	S	R
厄他培南 Ertapenem	29	27	I	R
美罗培南 Meropenem	32	37	S	S
阿莫西林 Amoxicillin	27	8	S	R
万古霉素 Vancomycin	24	14	S	R
氯霉素 Chloramphenicol	22	25	S	S
链霉素 Streptomycin	11	14	R	R
磺胺嘧啶钠 Sulfadiazine sodium	20	24	S	S
红霉素 Erythromycin	22	26	S	S
克拉霉素 Clarithromycin	18	25	R	S
阿奇霉素 Azithromycin	26	28	S	S
多西环素 Doxycycline	24	28	S	S
四环素 Tetracycline	32	35	I	I
土霉素 Tetracycline	15	24	R	S
替加环素 Tigecycline	25	27	I	I
左氧氟沙星 Levofloxacin	29	32	I	S
氧氟沙星 Oxyfloxacin	23	30	S	S
加替沙星 Gatifloxacin	8	13	R	R
林可霉素 Lincomycin	22	33	S	S
泰妙灵 Tamsulosin	20	21	S	S

S: 敏感; R: 耐药; I: 中度敏感。

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

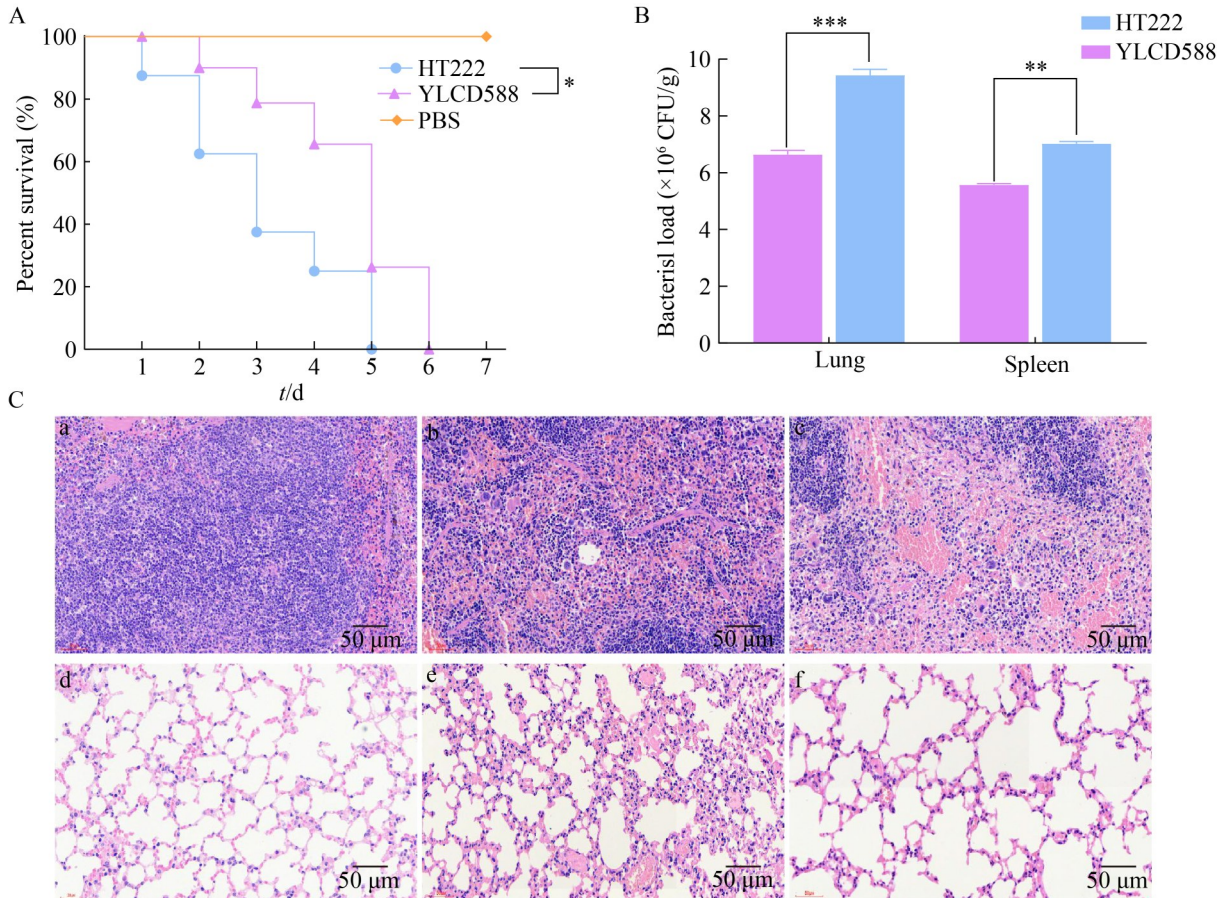
## 2.9 分离菌株的毒力测定

将分离株 YLCD588 和 HT222 分别接种小鼠后, 2 组感染小鼠均在 7 d 内死亡, 感染 HT222 的小鼠比感染 YLCD588 的小鼠死亡时间更短(图 10A)。对感染小鼠脾脏和肺脏细菌载量的检测结果表明, YLCD588 在感染鼠脾脏和肺脏的定殖水平显著低于 HT222 (图 10B)。病理切片结果显示, 与对照组相比, HT222 和 YLCD588 感染鼠的肺组织均出现肺泡增厚, 其中 HT222 感染鼠的肺泡增厚病变更为明显(图 10C 中 a-c)。HT222 和 YLCD588 感染鼠的脾脏组织均表现出

血管扩张, 脾窦和脾小结内红细胞增多, 脾组织出现空泡样变化, 且 HT222 感染鼠的脾组织病变比 YLCD588 感染鼠更严重(图 10C 中 d-f), 表明 2 株 SEZ 菌株 YLCD588 和 HT222 对小鼠的致病力存在显著差异。

## 3 讨论

本研究对驴源马链球菌兽疫亚种分离株 HT222 与 YLCD588 进行了全基因组测序和 ST 分型。结果表明, YLCD588 被鉴定为新的 ST 型 ST545, MLST 系统发育树显示 YLCD588 与



**图10** 两株分离菌的毒力分析。A: 小鼠存活率; B: 肺脏、脾脏菌体载量; C: 小鼠脾及肺病理组织学观察结果(HE染色)(200×)。

Figure 10 Virulence analysis of two isolates. A: Mice survival rate; B: Lung and spleen bacteria loads; C: The HE staining result of lung and spleen of mice (200×). a: Spleen-PBS; b: Spleen-HT222; c: Spleen-YLCD588; d: Lung-PBS control; e: Lung-HT222; f: Lung-YLCD588. \*:  $0.01 < P < 0.05$ ; \*\*:  $0.001 < P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ .

山羊源 SEZ 株亲缘关系最近, 而 HT222 则与犬源 SEZ 株亲缘关系较近。HT222 比 YLCD588 携带更多的毒力和耐药基因, 表现出更强的致病性; 而 YLCD588 比 HT222 具有更强的生物被膜形成能力, 耐药表型更为显著。

马链球菌兽疫亚种具有广泛的宿主种类, 是一种重要的人畜共患病原菌<sup>[22]</sup>。研究表明, SEZ 可在马和犬、猫和人, 以及犬和人之间传播<sup>[23-25]</sup>, 其引起的感染在欧美地区多发生于马、猫、犬等动物。Jara 等<sup>[26]</sup>从美国爱德华州豚鼠下颌脓肿样品中分离出 SEZ。相比之下, 国内 SEZ 主要在猪群中常见<sup>[27]</sup>, 还可引起马和人之间的传播<sup>[28]</sup>。Preziuso 等<sup>[3]</sup>对意大利不同地区流行的马源 SEZ 进行了 16S rRNA 基因序列比较分析, 发现 SEZ 表现出高度的遗传多样性。

由于 SEZ 感染宿主的多样性, MLST 可用于揭示病原菌的传播规律和种群动态<sup>[29-31]</sup>。蒲小峰等<sup>[32]</sup>首次报道了新疆地区分离的 2 株驴源 SEZ, 鉴定出 ST420, 并对其进行了药物敏感性及生物学特性分析, 同时对分离株的 16S rRNA 基因 V1-V5 可变区进行了比较分析, 对分离菌株进行了 *SeM* 基因进化分析和多位点序列分型 (multilocus sequence typing, MLST), 评估了其种内进化特征。Cantelmi 等<sup>[12]</sup>从意大利阿布鲁佐地区病驴中分离鉴定了一株新的驴源 SEZ ST525, 认为驴源 SEZ 的生物学特性及致病性与马源 SEZ 菌株存在显著差异, 并通过全基因组测序发现了驴源 SEZ 中由人化脓链球菌前噬菌体携带的毒力因子 *mf2*。

Björnsdóttir 等<sup>[33]</sup>对冰岛流行的 257 株人源及马源 SEZ 进行了 MLST 分析, 发现 SEZ ST209 在病人及患马中流行, 该结果在公共卫生方面具有一定意义。Bisgaard 等<sup>[34]</sup>从患病鸡体内检出了禽源 SEZ ST173 和 ST280, 发现禽源 ST208 来源于马源菌株。蒲小峰等<sup>[32]</sup>对新疆地区分离得到的 2 株驴源 SEZ (ST179 和 ST420) 进行 MLST 分析, 得出驴源分离株 ST179 来源于以往流行的马源 ST179。本研究通过多位点序列

分型分离鉴定出驴源 SEZ 的 2 个不同基因型 ST420 (HT222) 与 ST545 (YLCD588)。其中, ST420 与先前分离自人类临床样本的 ST194、犬源 SEZ (ST318)、犬源 SEZ (ST327)、马源 SEZ (ST300) 呈现遗传进化关联, 提示该基因型具有潜在的人兽共患病传播风险。ST545 是本次鉴定的新基因型, 该结果完善了驴源 SEZ 的分子分型数据, 揭示了 SEZ 的遗传多样性及其在不同地理区域和宿主中的差异。此外, ST545 与山羊源 ST265 分离株、驴源 SEZ (ST533)、马源 SEZ (ST278) 亲缘关系较近, 存在系统发育同源性, 揭示了其在不同哺乳动物种间传播的分子流行病学特征。

本研究对 2 株 SEZ 不同流行株的毒力基因进行比较分析, 结果显示 HT222 携带有毒力因子基因 *saK*, 而 YLCD588 菌株未携带该基因。*SaK* 有助于病原菌在宿主体内的扩散, 使细菌从脓肿中逃逸出来, 从而增强免疫逃逸能力, 导致其致病性增强<sup>[35]</sup>。Wang 等<sup>[36]</sup>发现毒力因子 *SaK* 通过调控金黄色葡萄球菌的纤溶系统平衡和炎症反应, 从而加重感染进程和宿主病理损伤。该结果与本研究 HT222 比 YLCD588 对小鼠的病理损伤更严重的结果一致。HT222 感染小鼠引起典型肺炎病理变化。鉴于本研究仅在基因组水平比较毒力基因, 今后还需进一步开展基因表达相关的实验进行分析验证。

耐药基因是细菌产生耐药性的机制之一, 本研究中 SEZ 分离株经全基因组测序分析发现其包含 11 类抗生素耐药基因, 包括  $\beta$ -内酰胺类、氨基糖苷类、大环内酯类、四环素类、氟喹诺酮类、肽类、糖肽类、林可酰胺类、恶唑烷酮类、氨基香豆素类和截短侧耳素类。根据测序结果和耐药试验结果, 虽然 YLCD588 的耐药基因数目比 HT222 少, 但 YLCD588 表现出比 HT222 更强的耐药表型。分析其原因可能存在部分的耐药基因不表现出相对应的耐药表型, 或存在除耐药基因以外的其他机制介导耐药表型。Wang 等对人、鸡及猪分别开展了肠道微生物

物耐药基因宏基因组和宏转录组比较分析,发现这3种生物分别有49.4%、66.5%和56.6%的耐药基因是表达的<sup>[37]</sup>,本研究结果也与之相符,也进一步表明开展表达分析的必要性。

$\beta$ -内酰胺类药物是治疗链球菌感染的主要抗生素之一。黄荣等<sup>[38]</sup>分离鉴定了青海驴腺疫链球菌对 $\beta$ -内酰胺类抗生素高度敏感。近年来,在药物的选择压力下链球菌对该类药物耐药率呈上升趋势。蒲小峰等<sup>[32]</sup>发现2株驴源SEZ中HT111对6种 $\beta$ -内酰胺类药物(阿莫西林、氨苄西林、头孢呋辛、头孢替唑、头孢西丁、青霉素)均敏感,而HT321则对其中4种(阿莫西林、头孢呋辛、头孢替唑、青霉素)表现出耐药性,表明这2个菌株已对 $\beta$ -内酰胺类药物表现出明显的耐药趋势。本研究发现,HT222菌株对3种 $\beta$ -内酰胺类药物(阿莫西林、氨苄西林、厄他培南)敏感,而YLCD588对这3种药物均表现出耐药性,说明耐药表型与耐药基因型具有相关性,但也存在差异,分析其原因可能与YLCD588和HT222菌株之间的差异以及不同区域的用药差异有关。赵巧雅等<sup>[39]</sup>对粪肠球菌的研究发现,2株耐药基因均一致的粪肠球菌耐药表型存在明显差异。以往研究还表明,链球菌属对氨基糖苷类药物表现出低水平耐药,但氨基糖苷类相关耐药基因的存在可引发高水平耐药<sup>[40]</sup>。本研究中2株菌存在氨基糖苷类相关耐药基因,在药敏检测中均表现出耐药性,该结果与上述研究一致。

细菌生物被膜的形成会对菌株的耐药表型产生一定影响,导致耐药基因型和表型存在差异。以往研究已证实猪链球菌可通过生物被膜介导增强其耐药潜能<sup>[41]</sup>。本研究发现分离株YLCD588的生物被膜形成能力较HT222强,推测YLCD588比HT222表现出更强的耐药表型,与其较强的生物被膜形成能力有关。

生物被膜是链球菌产生毒力的重要原因之一,生物被膜形成能力与分离株致病性呈现相关性。本研究中分离株YLCD588比HT222表

现出更强的生物被膜形成能力,但其致病性较HT222低,推测YLCD588在生物被膜形成过程中可能通过调控毒力基因的表达而降低了该菌的致病性,该结论与以往对猪链球菌的研究发现其生物被膜形成能力与毒力表型呈负相关的结论<sup>[38]</sup>一致。

## 4 结论

本研究对2株驴源SEZ分离株HT222与YLCD588进行了全基因组测序、MLST进化分析、药敏检测、生物被膜形成试验及小鼠致病性试验等,揭示了HT222和YLCD588与国内外不同动物源SEZ的亲缘关系,分析了2株菌毒力与耐药基因及表型的差异,为临床有效控制SEZ的传播、治疗及保障人员健康提供了帮助,并为后续开展SEZ的致病和耐药机制研究提供了参考依据。

## 作者贡献声明

彭靖轩:数据收集,验证与分析,撰写文章;蒋新宇:数据分析,撰写文章;田裕辉:数据分析,软件程序;宋丹丹:数据收集,撰写文章;张宝江:审阅、编辑文章;苏艳:获取基金,提出概念,项目管理,撰写与审阅文章。

## 作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

## 参考文献

- [1] YUAN C, WANG YC, ZHANG XW, TIAN XY, LIANG Y, PAN F, SONG HS, XIA LY, WU ZH, WANG WQ, ZHANG XW, XIE YR, ZHU ML, HU RQ, YANG Z, FAN HJ, MA Z. The clinical characteristics of *Streptococcus equi* ssp. *zooepidemicus* causing acute death in pigs and its prevention with chimeric monoclonal antibodies[J]. *Veterinary Microbiology*, 2025, 302: 110420.
- [2] KERDSIN A, CHOPJITT P, HATRONJIT R, BOUEROY P, GOTTSCHALK M. Zoonotic infection

- and clonal dissemination of *Streptococcus equi* subspecies *zooepidemicus* sequence type 194 isolated from humans in Thailand[J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2022, 69(4): e554-e565.
- [3] PREZIUSO S, MORICONI M, CUTERI V. Genetic diversity of *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* isolated from horses[J]. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 2019, 65: 7-13.
- [4] LIU L, YAN ZY, HE FM, CHEN J, KUANG LH, LIU XX, CUI YL, WANG X, MIAO CL, LI H, JIANG YM. Antibiotic susceptibility and molecular characterization based on whole-genome sequencing of *Staphylococcus aureus* causing invasive infection in children and women living in southwest China during 2018–2023[J]. *BMC Microbiology*, 2025, 25(1): 47.
- [5] XIE HL, DAVIES MR, TONG SYC. *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* infection and its intersection with *Streptococcus pyogenes*[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2024, 37(3): e0017523.
- [6] HUANG WH, WANG ML, HAO HJ, YANG RF, XIE JJ, SU JH, LIN M, CUI YJ, JIANG YQ. Genomic epidemiological investigation of a *Streptococcus suis* outbreak in Guangxi, China, 2016[J]. *Infection, Genetics and Evolution*, 2019, 68: 249-252.
- [7] WANG XM, SUN JJ, BIAN C, WANG JP, LIANG ZJ, SHEN YL, YAO HC, HUANG JH, WANG LP, ZHENG H, WU ZF. The population structure, antimicrobial resistance, and pathogenicity of *Streptococcus suis* cps31[J]. *Veterinary Microbiology*, 2021, 259: 109149.
- [8] 刘朋, 程子龙, 陈萌, 刘思当. 驴源猪链球菌2型的分离和鉴定及MLST分型[J]. *中国兽医学报*, 2018, 38(10): 1920-1925.
- LIU P, CHENG ZL, CHEN M, LIU SD. *Streptococcus suis* type 2 strain from donkey: isolation, identification, and MLST typing[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2018, 38(10): 1920-1925 (in Chinese).
- [9] DAUGALIYEVA A, DAUGALIYEVA S, KYDYR N, PELETTI S. Molecular typing methods to characterize *Brucella* spp. from animals: a review[J]. *Veterinary World*, 2024, 17(8): 1778-1788.
- [10] 张泽华, 张欢, 汪丽, 古丽米热·对山巴依, 吕芬芬, 蒲小峰, 张宝江, 苏艳. 马源马链球菌兽疫亚种3株新疆分离株基因型的鉴定及MLST分析[J]. *微生物学通报*, 2021, 48(12): 4742-4755.
- ZHANG ZH, ZHANG H, WANG L, Gulimire·Duishanbayi, LÜ FF, PU XF, ZHANG BJ, SU Y. Identification and MLST analysis of three novel genotypes of *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* Xinjiang strains[J]. *Microbiology China*, 2021, 48(12): 4742-4755 (in Chinese).
- [11] 黄晓慧, 韩雪姣, 刘雪兰, 李亮, 孙裴, 魏建忠, 李郁. 199株猪链球菌临床分离株血清型、毒力基因及多位点序列分型分析[J]. *微生物学通报*, 2022, 49(10): 4209-4223.
- HUANG XH, HAN XJ, LIU XL, LI L, SUN P, WEI JZ, LI Y. Serotypes, main virulence genes, and multilocus sequence typing of 199 clinical isolates of *Streptococcus suis*[J]. *Microbiology China*, 2022, 49(10): 4209-4223 (in Chinese).
- [12] CANTELMINI MC, MEROLA C, AVERAIMO D, CHIAVERINI A, CITO F, COCCO A, di TEODORO G, de ANGELIS ME, di BERNARDO D, AUZINO D, PETRINI A. Identification of the novel *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* sequence type 525 in donkeys of abruzzo region, Italy[J]. *Pathogens*, 2023, 12(6): 750.
- [13] KANEHISA M, GOTO S, HATTORI M, AOKI-KINOSHITA KF, ITOH M, KAWASHIMA S, KATAYAMA T, ARAKI M, HIRAKAWA M. From genomics to chemical genomics: new developments in KEGG[J]. *Nucleic Acids Research*, 2006, 34(Database issue): D354-D357.
- [14] CHEN LH, ZHENG DD, LIU B, YANG J, JIN Q. VFDB 2016: hierarchical and refined dataset for big data analysis: 10 years on[J]. *Nucleic Acids Research*, 2016, 44(D1): D694-D697.
- [15] AROCA MKJ, GUTIERREZ SJ, BENITEZ CN, CORREA A. Genomic differences associated with resistance and virulence in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from clinical and environmental sites[J]. *Microorganisms*, 2024, 12(6): 1116.
- [16] ZHOU ZM, ALIKHAN NF, SERGEANT MJ, LUHMANN N, VAZ C, FRANCISCO AP, CARRIÇO JA, ACHTMAN M. GrapeTree: visualization of core genomic relationships among 100 000 bacterial pathogens[J]. *Genome Research*, 2018, 28(9): 1395-1404.
- [17] 梅纪坤, 姜轩, 吴桐, 姜合祥, 朱俊辉, 武增帅, 李丰阳, 李娜, 雷连成. 猪链球菌2型Orf207基因缺失菌株的构建及其生物学特性检测[J]. *微生物学通报*, 2023, 50(7): 3009-3019.
- MEI JK, JIANG X, WU T, JIANG HX, ZHU JH, WU ZS, LI FY, LI N, LEI LC. Construction of Orf207 gene mutant strain of *Streptococcus suis* type 2 and detection of its biological characterization[J]. *Microbiology China*, 2023, 50(7): 3009-3019 (in Chinese).
- [18] ZHANG YW, LV FF, SU Y, ZHANG H, ZHANG BJ. Complete genome sequencing and comparative genomic analysis of three donkey *Streptococcus equi* subsp. *equi* isolates[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2023, 14: 1285027.
- [19] XIE HL, ZHANG RT, GUO RH, ZHANG YN, ZHANG JY, LI H, FU Q, WANG XL. Characterization of AI-2/LuxS quorum sensing system in biofilm formation, pathogenesis of *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2024, 14: 1339131.
- [20] 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.
- [21] SU Y, ZHANG ZH, WANG L, ZHANG BJ, SU LL. Whole-genome sequencing and phenotypic analysis of *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* sequence type 147 isolated from China[J]. *Microorganisms*, 2024, 12(4): 824.
- [22] STEWARD KF, ROBINSON C, HOLDEN MTG, HARRIS SR, ROS AF, PÉREZ GC, BASELGA R, WALLER AS. 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]. *Veterinary Microbiology*, 2017, 207: 231-238.
- [23] ACKE E, ABBOTT Y, PINILLA M, MARKEY BK, LEONARD FC. Isolation of *Streptococcus zooepidemicus* from three dogs in close contact with horses[J]. *The Veterinary Record*, 2010, 167(3): 102-103.
- [24] DOLAPSAKIS C, CHARALAMPIDIS C, KIRGIA M, KOLLIA P. First case of zoonotic transmission of *Streptococcus equi* subspecies *zooepidemicus* from cat to human[J]. *Cureus*, 2023, 15(10): e46306.
- [25] ZAHLANIE Y, ALMATRAFI M, FILKINS L, HSIANG MS. Possible canine source of *Streptococcus equi* subspecies *zooepidemicus* causing meningitis in an infant[J]. *IDCases*, 2019, 17: e00568.
- [26] JARA LM, ANGULO-TISOC J, GIMÉNEZ-LIROLA LG, LI GW, ANDRADE R, MAMANI J. Outbreak of pathogenic *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* in guinea pigs farms of the Andean Region[J]. *Pathogens*, 2023, 12(3): 445.
- [27] 王继春, 何家惠, 侯继波, 徐筠遐, 刘冬霞, 褚长贵, 王伟峰, 刘跃兴, 杨英. 猪链球菌2型与马链球菌兽疫亚种生物学特性的初步比较[J]. *中国预防兽医学报*, 2000, 22(S1): 66-68.
- [28] HØYER-NIELSEN AK, GAINI S, KJERULF A, KOLLSLÍÐ R, STEIG TÁ, STEGGER M, JÓANESARSON J. Sepsis, endocarditis, and purulent arthritis due to a rare zoonotic infection with *Streptococcus equi* subspecies *zooepidemicus*[J]. *Case Reports in Infectious Diseases*, 2018, 2018(1): 3265701.
- [29] BRITTON AP, BLUM SE, LEGGE C, SOJONKY K, ZABEK EN. Multi-locus sequence typing of *Streptococcus equi* subspecies *zooepidemicus* strains isolated from cats[J]. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2018, 30(1): 126-129.
- [30] HOLDEN MTG, HEATHER Z, PAILLOT R, STEWARD KF, WEBB K, AINSLIE F, JOURDAN T, BASON NC, HOLROYD NE, MUNGALL K, QUAIL MA, SANDERS M, SIMMONDS M, WILLEY D, BROOKS K, AANENSEN DM, SPRATT BG, JOLLEY KA, MAIDEN MCJ, KEHOE M, et al. Genomic evidence for the evolution of *Streptococcus equi*: host restriction, increased virulence, and genetic exchange with human pathogens[J]. *PLoS Pathogens*, 2009, 5(3): e1000346.
- [31] WEBB K, JOLLEY KA, MITCHELL Z, ROBINSON C, NEWTON JR, MAIDEN MCJ, WALLER A. Development of an unambiguous and discriminatory multilocus sequence typing scheme for the *Streptococcus zooepidemicus* group[J]. *Microbiology*, 2008, 154(Pt 10): 3016-3024.
- [32] 蒲小峰, 陈晓萌, 汪丽, 张泽华, 吕芬芬, 王浩, 张宝江, 苏艳. 驴源兽疫链球菌的分离鉴定及多位点序列分型分析[J]. *微生物学报*, 2022, 62(2): 579-589.
- PU XF, CHEN XM, WANG L, ZHANG ZH, LÜ FF, WANG H, ZHANG BJ, SU Y. The isolation and identification of *Streptococcus equi* ssp. *zooepidemicus* from donkey and its multilocus sequence typing[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(2): 579-589 (in Chinese).
- [33] BJÖRNSDÓTTIR S, HARRIS SR, SVANSSON V, GUNNARSSON E, SIGURÐARDÓTTIR ÓG, GAMMELJORD K, STEWARD KF, NEWTON JR, ROBINSON C, CHARBONNEAU ARL, PARKHILL J, HOLDEN MTG, WALLER AS. Genomic dissection of an Icelandic epidemic of respiratory disease in horses and associated zoonotic cases[J]. *mBio*, 2017, 8(4): e00826-17.
- [34] BISGAARD M, BOJESEN AM, PETERSEN MR, CHRISTENSEN H. A major outbreak of *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* infections in free-range chickens is linked to horses[J]. *Avian Diseases*, 2012, 56(3): 561-566.
- [35] 陈淋淋, 谭紫凝, 马红霞, 王一鸣, 向华. 双组分系统调控细菌毒力和耐药性及其抑制剂研究进展[J]. *经济动物学报*, 2023, 27(3): 220-226.
- CHEN LL, TAN ZN, MA HX, WANG YM, XIANG H. Progress on two-component system regulating bacterial virulence and drug resistance and its inhibitors[J]. *Journal of Economic Animal*, 2023, 27(3): 220-226 (in Chinese).
- [36] WANG YN, ZHAO N, JIAN Y, LIU Y, ZHAO L, HE L, LIU Q, LI M. The pro-inflammatory effect of staphylokinase contributes to community-associated *Staphylococcus aureus* pneumonia[J]. *Communications Biology*, 2022, 5: 618.
- [37] WANG YN, HU YF, LIU F, CAO J, LV N, ZHU BL, ZHANG GP, GAO GF. Integrated metagenomic and metatranscriptomic profiling reveals differentially expressed resistomes in human, chicken, and pig gut microbiomes[J]. *Environment International*, 2020, 138: 105649.
- [38] 黄荣, 索佳佳, 高楠楠, 沈秀英, 朱伟, 董建宝. 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(5): 39-42.
- HUANG R, SUO JJ, GAO NN, SHEN XY, ZHU W, DONG JB. Isolation and identification of pathogen of adenitis equorum in donkey in Qinghai Province[J]. *Chinese Qinghai Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 2021, 51(5): 39-42 (in Chinese).
- [39] 赵巧雅, 路晓, 高月花, 刘娜, 胡峰, 刘玉山, 刘小群, 黄兵. 鸡源和兔源屎肠球菌的耐药性及相关基因分析[J]. *家禽科学*, 2021(1): 5-8.
- ZHAO QY, LU X, GAO YH, LIU N, HU F, LIU YS, LIU XQ, HUANG B. Drug resistance analysis and related gene detection of *Enterococcus faecalis* isolated from different provenances[J]. *Poultry Science*, 2021(1): 5-8 (in Chinese).
- [40] DECHÈNE-TEMPIER M, MAROIS-CRÉHAN C, LIBANTE V, JOUY E, LEBLOND-BOURGET N, PAYOT S. Update on the mechanisms of antibiotic resistance and the mobile resistome in the emerging zoonotic pathogen *Streptococcus suis*[J]. *Microorganisms*, 2021, 9(8): 1765.
- [41] GAO SJ, YUAN S, QUAN YY, JIN WJ, SHEN YM, LI RS, LIU BB, WANG YX, YI L, WANG SH, HOU XG, WANG Y. Targeting AI-2 quorum sensing: harnessing natural products against *Streptococcus suis* biofilm infection[J]. *Veterinary Research*, 2025, 56(1): 26.