

doi: 10.11751/ISSN.1002-1280.2021.3.01

# 兽药典收载羊败血性链球菌病疫苗生产 检验用菌种的系统分类鉴定

李伟杰, 田野, 岂晓鑫, 魏财文, 李建, 张一帜, 蒋桃珍\*

(中国兽医药品监察所, 北京 100081)

[收稿日期] 2020-10-19 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2021) 03-0001-05 [中图分类号] S859.79

**[摘要]** 根据现有细菌分类鉴定方法, 采用血清学、Biolog、16S rRNA 序列分析和全基因组序列分析等方法对羊败血性链球菌病疫苗生产检验用菌种 CVCC 553、55001 和 55002 进行系统鉴定。结果显示, 菌种 CVCC 553、55001 和 55002 血清群为兰氏 C 群; Biolog 鉴定为马链球菌反刍亚种; 16S rRNA 序列分析与马链球菌反刍亚种模式菌株 CECT 5772 的同源性最高(均为 99.72%), 且在系统发育树中位于同一分支; 与马链球菌反刍亚种模式菌株 CCUG 47520 的 DNA-DNA 的杂交值大于 70%, 分别为 80.5%、80.2%、80.5%, 与马链球菌反刍亚种模式菌株 CECT 5772 的平均核苷酸同源性分别为 97.73%、97.64%、97.77%。因此本研究认为羊败血性链球菌病疫苗生产用菌种 CVCC 553、55001 和 55002 应为马链球菌反刍亚种。

**[关键词]** 羊败血性链球菌病; 马链球菌反刍亚种; Biolog; 16S rRNA; 全基因组序列分析

## Systematic Identification of CVCC 553, 55001 and 55002 for Producing and Inspecting Vaccine against Ovine/Caprine Septicemia Streptococcosis in Chinese Veterinary Pharmacopoeia

LI Wei-jie, TIAN Ye, QI Xiao-xin, WEI Cai-wen, LI Jian, ZHANG Yi-zhi, JIANG Tao-zhen\*

(China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

Corresponding author: JIANG Tao-zhen, E-mail: taozhen\_jiang@163.com

**Abstract:** According to the existing methods of bacterial classification, the strains CVCC 553, 55001 and 55002, which used to producing and inspecting vaccine against ovine/caprine streptococcosis septicemia, were systematically identified by serology, BIOLOG, 16S rRNA sequence analysis and whole genome sequence analysis. The results showed that CVCC 553, 55001 and 55002 were Lancefield group C, identified as *Streptococcus equi* subsp *ruminatorum* by Biolog. Comparative 16S rRNA gene sequencing studies confirmed that CVCC 553, 55001 and 5502 are members of the species *Streptococcus equi*, with *Streptococcus equi* subsp.

基金项目: 国家微生物资源平台(NIMR-5)

作者简介: 李伟杰, 副研究员, 从事兽医微生物菌种鉴定和兽用生物制品检验工作。

通讯作者: 蒋桃珍。E-mail: taozhen\_jiang@163.com

*ruminatorum* CECT 5772 as their closest phylogenetic relative (99.72%). DNA – DNA pairing studies showed that CVCC 553, 55001 and 55002 displayed more than 70% relatedness to *Streptococcus equi* subsp. *ruminatorum* type strain CCUG 47520 (80.5%, 80.2%, 80.5%). Average nucleotide identity between CVCC 553, 55001, 55002 and *Streptococcus equi* subsp. *ruminatorum* type strain CECT 5772 is 97.73%, 97.64%, 97.77%. In summary, CVCC 553, 55001 and 55002 are not *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*, but *Streptococcus equi* subsp. *ruminatorum*.

**Key words:** ovine/caprine Streptococcosis septicemia; *Streptococcus equi* subsp. *ruminatorum* Biolog; 16S rRNA; whole genome sequence analysis

细菌分类学始于 19 世纪后半叶,起初采用表型分类方法进行简单分类,但在揭示细菌间的系统发育关系方面具有局限性<sup>[1]</sup>。20 世纪 60 年代, DNA – DNA 杂交(DNA – DNA hybridization, DDH)被称为分类学中的“金标准”,70% 的 DNA – DNA 的杂交值已被作为种间阈值在原核生物的分类中得到广泛应用<sup>[2-3]</sup>,现在可以用细菌的全基因组序列进行数字 DNA – DNA 杂交值的计算<sup>[4]</sup>。20 世纪 80 年代后,因序列保守且不受水平基因转移的影响,16S rRNA 基因序列分析方法被广泛用来细菌分类鉴定,种间阈值经历了 97%、98.7% ~ 99.0%、98.2% ~ 99.0%、98.65% 的变化<sup>[5-8]</sup>。随着高通量测序技术的发展,比表型特征和基因片段序列分析更精确的基于全基因组序列分析的方法被用于细菌分类,主要的分析方法包括平均核苷酸同源性(Average nucleotide identity, ANI)<sup>[9]</sup>、基因组局部相似性搜索距离系统发育分析(Genome blast distance phylogeny, GBDP)<sup>[10]</sup>、最大唯一匹配指数分析(Maximal unique matches index, MUMi)<sup>[11]</sup>。其中 ANI 被广泛使用和认可,95% ~ 96% 的 ANI 值等同于 70% 的 DDH 值,相对应于 98.65% 的 16S rRNA 基因同源性,使其成为下一代细菌鉴定金标准的候选<sup>[8]</sup>。本文对《中华人民共和国兽药典》三部 2015 年版收载的羊败血性链球菌病疫苗生产检验用菌种 CVCC 553、55001 和 55002<sup>[12]</sup>,按现有细菌分类鉴定方法进行了系统分类鉴定,现将结果报告如下。

## 1 材料与方法

1.1 菌种 CVCC 553、55001 和 55002 由中国兽药药品监察所国家兽医微生物中心提供,为羊败血

性链球菌病疫苗生产检验用菌种。

1.2 培养基 胰酪大豆胨琼脂培养基(TSA)、胰酪大豆胨液体培养基(TSB)购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司,BUG 培养基购自 Biolog 公司,缓冲肉汤培养基、马丁肉汤培养基购自北京中海生物科技有限公司。

1.3 试剂 马血清购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司,无菌脱纤维绵羊血自采,革兰染色试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司,PCR 相关试剂购自宝日医生物技术(北京)有限公司,细菌基因组提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司,链球菌乳胶分群试剂盒购自丹麦国家血清研究院,C1 接种液和 Gen III 鉴定板购自 Biolog 公司。

1.4 菌种的培养 无菌开启菌种 CVCC 553、55001 和 55002 冻干安瓿瓶,用 TSB 肉汤充分溶解,接种含 5% 马血清的 TSA 平板,37 °C,5% CO<sub>2</sub>,培养 24 h 后转接含 5% 马血清的 TSA 平板,连续纯化 2 代后接种含 5% 马血清的 TSA 平板和含 10% 无菌脱纤维绵羊血琼脂平板,37 °C,5% CO<sub>2</sub>,培养 18 h ~ 24 h 后观察。

1.5 菌种的革兰染色 革兰染色参照说明书操作。

1.6 菌种血清群的鉴定 用链球菌乳胶分群试剂盒中亚硝酸提取试剂,参照说明书操作步骤,提取链球菌群特异性多糖抗原,与分群血清进行反应,30 s 内判定结果。

1.7 菌种 Biolog 鉴定 取菌种 CVCC 553、55001 和 55002 的纯培养物划线接种含 5% 脱纤维绵羊血的 BUG 培养基,37 °C,5% CO<sub>2</sub>,培养 24 h。将一次性棉签用 C1 接种液稍微浸湿,然后蘸取单菌落在

试管内壁接种液液面上方干燥部位,旋转挤压棉签,尽量使菌落分散,然后上下移动棉签,将分散的菌落和接种液充分混合,形成均一、无团块的菌悬液,调整浊度范围在 96%~98%。静置片刻后将菌悬液接种到 Gen III 鉴定板中,100  $\mu$ L/孔,放置在湿盒中,37  $^{\circ}$ C,5%  $\text{CO}_2$  培养,通过 Biolog 微生物鉴定系统 MicroStation 中的软件读取 Gen III 鉴定板上菌种的表型图谱。

**1.8 菌种 16S rRNA 序列测定和分析** 菌种 CVCC 553、55001 和 55002 的 DNA 提取和 16S rRNA 的扩增参照文献<sup>[13]</sup>,PCR 产物由中美泰和生物技术(北京)有限公司完成序列测定。用 Bioedit 软件对 16S rRNA 测序结果进行质控和序列拼接,拼接后的序列提交到 <https://www.ezbiocloud.net/> 进行比对,选取相似性高的菌株序列,利用 MEGA-X 软件中的 Clustal W 方法进行同源性比对,采用邻接法(Neighbor Joining, NJ)获得分支系统发育树,系统发育树各分支的置信度经重抽样法 1000 次重复检测,DNA 序列变异中的转换和颠换赋予相同的加权值。

**1.9 菌种的全基因组序列测定和分析** 菌种 CVCC 553、55001 和 55002 全基因组的提取使用细菌基因组 DNA 提取试剂盒,DNA 经检测合格后送上海美吉生物医药科技有限公司测定,在 <https://www.dsmz.de/> 在线计算 DNA-DNA 的杂交值<sup>[4]</sup>,在 <https://www.ezbiocloud.net/> 在线计算平均核苷酸同源性<sup>[14]</sup>。

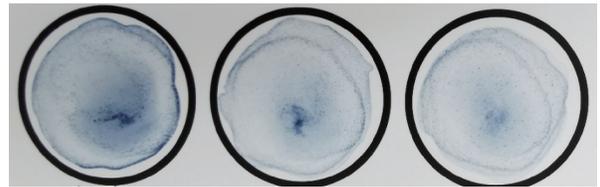
## 2 结果与分析

**2.1 菌种染色特性及菌体形态** 菌种 CVCC 553、55001 和 55002 均为革兰阳性球菌,呈单个、成对和短链排列。

**2.2 菌种菌落形态及培养特性** 菌种 CVCC 553、55001 和 55002 在含 10% 无菌脱纤维绵羊血平板上培养 18 h 形成灰色、半透明、湿润、黏稠菌落,在含 10% 无菌脱纤维绵羊血平板上培养 24 h 后呈  $\beta$  溶血。

**2.3 菌种血清分群结果** 用链球菌兰氏分群试剂盒提取菌种 CVCC 553、55001 和 55002 的抗原,在

反应卡上与含乳胶颗粒的分群血清进行反应,30 s 内菌种 CVCC 553、55001 和 55002 只与链球菌兰氏 C 群血清发生凝集反应,形成蓝色的颗粒状凝集物(图 1),而与 A、B、D、F、G 群血清不发生凝集反应,判定菌种 CVCC 553、55001 和 55002 为兰氏 C 群。



A: CVCC 553, B: CVCC 55001, C: CVCC 55002

图 1 菌种 CVCC 553、55001 和 55002 兰氏分群结果

Fig 1 The Lancefield results of CVCC 553, 55001 and 55002

**2.4 菌种 Biolog 鉴定结果** 根据对 71 种碳源利用情况以及对 23 种化学物质敏感性的结果,菌种 CVCC 553、55001 和 55002 经 Biolog 鉴定均为马链球菌反刍亚种。

**2.5 菌种的 16S rRNA 序列分析结果** 将菌种 CVCC 553、55001 和 55002 的 16S rRNA 序列拼接后提交到 <https://www.ezbiocloud.net/> 进行比对,用 MEGA-X 软件构建系统发育树,结果菌株 CVCC 553、55001 和 55002 与马链球菌反刍亚种模式菌株 CECT 5772 的同源性最高,均为 99.72%,与马链球菌马亚种模式菌株 ATCC 33398 和兽疫亚种模式菌株 NCTC 4676 的同源性分别均为 97.68%、97.73% 和 97.71%,在系统发育树中菌株 CVCC 553、55001 和 55002 与马链球菌反刍亚种模式菌株 CECT 5772 位于同一分支(图 2)。

**2.6 菌种的全基因组序列分析结果** 菌种 CVCC 553、55001 和 55002 扫描图序列大小分别为 2124577 bp、2186173 bp、2178262 bp,G+C mol% 分别为 41.0、41.1、41.0。将菌种 CVCC 553、55001 和 55002 扫描图序列提交到 <https://www.dsmz.de/> 进行全基因组序列分析<sup>[6]</sup>,结果显示菌种 CVCC 553、55001 和 55002 均与马链球菌反刍亚种模式菌株 CCUG 47520 的 DNA-DNA 的杂交值最高,分别为 80.5%、80.2%、80.5%(表 1)。将菌种 CVCC 553、

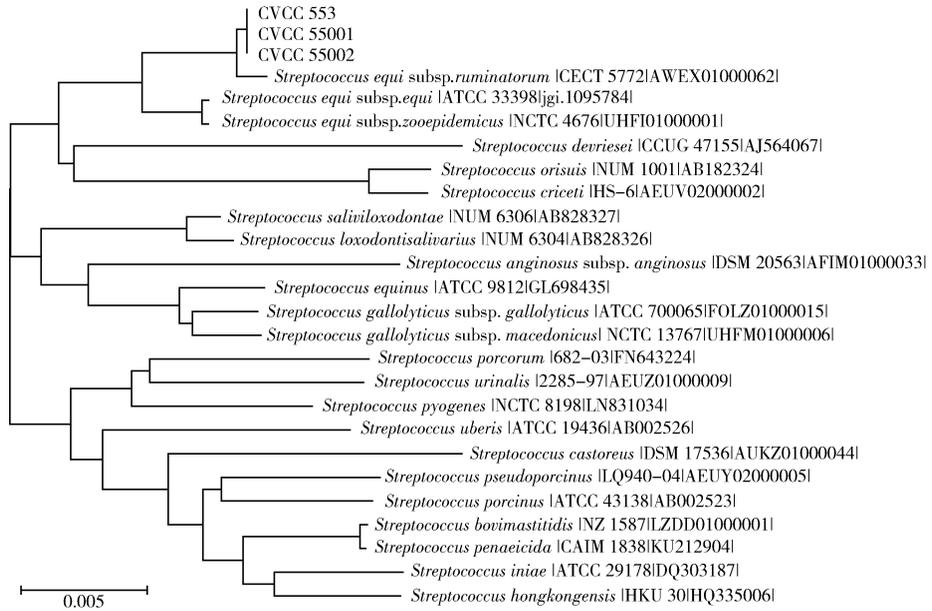


图 2 马链球菌 CVCC 553、55001 和 55002 基于 16S rRNA 序列构建的系统发育树

Fig 2 Phylogenetic tree based on 16S rRNA sequences of *Streptococcus equi* CVCC 553, 55001 and 55002

55001 和 55002 扫描图序列提交到 <https://www.ezbiocloud.net/> 计算平均核苷酸同源性<sup>[7]</sup>, 菌种 CVCC 553、55001 和 55002 与马链球菌反刍亚种模式菌株 CECT 5772、兽疫亚种模式菌株 NCTC 4676 和马亚种模式菌株 ATCC 33398 的 ANI 值分别为 97.73%、95.42%、96.22%、97.64%、95.51%、96.11%、97.77%、95.47%、96.04%。

### 3 讨论与结论

马链球菌目前分为 3 个亚种, 分别为马亚种、兽疫亚种和反刍亚种<sup>[15-16]</sup>。其中马亚种只引起马、骡、驴的马腺疫<sup>[16-17]</sup>; 兽疫亚种可致多种动物疫病, 包括马的败血症和子宫炎、牛的乳腺炎和子宫炎、猪的败血症和关节炎、羔羊和幼犬败血症和肺炎等<sup>[17]</sup>; 反刍亚种可引起绵羊和山羊的乳腺炎, 2004 年由 Fernández 等依据表型和基因型首先报道了该亚种<sup>[15]</sup>。我国兽药典中收载的羊败血性链球菌病疫苗是 1973 年青海兽医生物药品厂研制, 生产检验用菌种为马链球菌 CVCC 553、55001 和 55002。通过查阅现存档案, 菌种 CVCC 553、55001 和 55002 最早的鉴定报告中采用形态和生化特性、培养特性及血清学特性来确定其分类地位, 其中

表 1 菌种 CVCC 553、55001 和 55002 DNA-DNA 杂交值

Tab 1 DNA-DNA hybridization values of CVCC 553、55001 and 55002

| 本研究菌种      | DSMZ 数据库菌株  | DNA-DNA 杂交值 |
|------------|---|-------------|
| CVCC 553   | <i>S. equi</i> subsp. <i>ruminatorum</i> CCUG 47520 | 80.5        |
|            | <i>S. equi</i> subsp. <i>zoepidemicus</i> NCTC 7023 | 71.7        |
|            | <i>S. equi</i> subsp. <i>zoepidemicus</i> NCTC 4676 | 66.8        |
|            | <i>S. equi</i> subsp. <i>equi</i> DSM 20561         | 63.3        |
|            | <i>S. equi</i> subsp. <i>equi</i> ATCC 33398        | 63.3        |
| CVCC 55001 | <i>S. porcinus</i> NCTC 10999                       | 26.3        |
|            | <i>S. equi</i> subsp. <i>ruminatorum</i> CCUG 47520 | 80.2        |
|            | <i>S. equi</i> subsp. <i>zoepidemicus</i> NCTC 7023 | 71.6        |
|            | <i>S. equi</i> subsp. <i>zoepidemicus</i> NCTC 4676 | 66.7        |
|            | <i>S. equi</i> subsp. <i>equi</i> DSM 20561         | 63.1        |
| CVCC 55002 | <i>S. equi</i> subsp. <i>equi</i> ATCC 33398        | 63.1        |
|            | <i>S. porcinus</i> NCTC 10999                       | 26.3        |
|            | <i>S. equi</i> subsp. <i>ruminatorum</i> CCUG 47520 | 80.5        |
|            | <i>S. equi</i> subsp. <i>zoepidemicus</i> NCTC 7023 | 71.7        |
|            | <i>S. equi</i> subsp. <i>zoepidemicus</i> NCTC 4676 | 66.7        |
| CVCC 55002 | <i>S. equi</i> subsp. <i>equi</i> DSM 20561         | 63.2        |
|            | <i>S. equi</i> subsp. <i>equi</i> ATCC 33398        | 63.1        |
|            | <i>S. porcinus</i> NCTC 10999                       | 26.5        |

生化反应采用的是糖发酵管,包括葡萄糖、蔗糖、果糖、乳糖、半乳糖、麦芽糖、山梨醇阳性,纤维二糖、甘露醇、棉子糖、鼠李糖、松三糖、水杨素、菊糖、树胶醛糖、木糖、七叶苷阴性。根据细菌鉴定的要求,仅依据以上鉴定项目不能在种水平上得出菌种 CVCC 553、55001 和 55002 是马链球菌兽疫亚种的结论。

基于以上菌种鉴定过程中存在的问题,本文采用染色特性及菌体形态、菌落形态及培养特性、血清分群、Biolog 鉴定、16S rRNA 序列分析和全基因组序列分析对羊败血性链球菌疫苗生产检验用菌种 CVCC 553、55001 和 55002 进行了系统分类鉴定,结果表明菌种的形态和培养特性与《中华人民共和国兽药典》二〇〇〇年版中的规定一致,但 Biolog 给出的结果均为马链球菌反刍亚种,16S rRNA 序列与马链球菌反刍亚种模式菌株 CECT 5772 同源性最高且处于系统发育树的同一分支,基于全基因组序列的 DNA - DNA 的杂交值与马链球菌反刍亚种模式菌株 CCUG 47520 最高,分别为 80.5%、80.2%、80.5%,均大于 70%。以上结果都表明羊败血性链球菌疫苗生产检验用菌种 CVCC 553、55001 和 55002 为马链球菌反刍亚种,而不是原命名的马链球菌兽疫亚种。在以上鉴定的基础上,对中国兽医药品监察所国家兽医微生物中心保藏的分离自青海、甘肃患败血症绵羊心血的 4 株马链球菌 CVCC 549、550、551、552 进行了系统分类鉴定,结果表明均为马链球菌反刍亚种。

本研究从表型水平和基因型水平对羊败血性链球菌疫苗生产检验用菌种 CVCC 553、55001 和 55002 进行了系统分类鉴定,结果为《中华人民共和国兽药典》的修订提供了技术支持,同时也明确了马链球菌反刍亚种可引起羊败血性链球菌病。

## 参考文献:

[1] Schleifer K H. Classification of Bacteria and Archaea: past, present and future [J]. Systematic and Applied Microbiology, 2009, 32(8): 533 - 542

[2] Wayne L G, Brenner D J, Colwell R R, et al. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial system-

atics [J]. Int J Syst Bacteriol, 1987, 37(4): 463 - 464.

[3] Tindall B J, Rosselló - Móra, Busse H J, et al. Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes [J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2010, 60(1): 249 - 266.

[4] Meier - Kolthoff J P, Göker M. TYGS is an automated high - throughput platform for state - of - the - art genome - based taxonomy. Nat Commun, 2019, 10(1): 2182.

[5] Stackebrandt, E, Goebel, B M. Taxonomic note: a place for DNA - DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. Int J Syst Bacteriol, 1994, 44(4): 846 - 849.

[6] Stackebrandt E, Ebers J. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. Microbiol Today, 2006, 33, 152 - 155.

[7] Mende D R, Sunagawa S, Zeller G et al. Accurate and universal delineation of prokaryotic species. Nat Methods, 2013, 10(9): 881 - 884.

[8] Kim M, Oh H S, Park S C, et al. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes [J]. Int J Syst Evol Microbiol. , 2014, 64(2): 346 - 351.

[9] Konstantinidis K T, Ramette A, Tiedje J M. The bacterial species definition in the genomic era [J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2006, 361(1475): 1929 - 1940.

[10] Henz S R, Huson D H, Auch A F, et al. Whole - genome prokaryotic phylogeny [J]. Bioinformatics, 2005, 21: 2329 - 2335.

[11] Deloger M, El Karoui M, Petit M A. A genomic distance based on MUM indicates discontinuity between most bacterial species and genera [J]. J Bacteriol, 2009, 191(1): 91 - 99.

[12] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典三部 2015 年版 [S]. Chinese Veterinary Pharmacopoeia Committee. The Third Volume of Chinese Veterinary Pharmacopoeia 2015 Edition [S].

[13] 李伟杰, 祁鑫, 田野, 等. 1 株致禽霍乱多杀性巴氏杆菌的病原学与分子生物学鉴定 [J]. 畜牧与兽医, 2020, 52(6): 89 - 93.

LI W J, QI X X, TIAN Y, et al. Identification of *Pasteurella multocida* causing fowl cholera by etiology and molecular biology [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2020, 52(6): 89 - 93.

[14] Yoon S H, Ha S M, Lim J, et al. A large - scale evaluation of algorithms to calculate average nucleotide identity [J]. Antonie Van Leeuwenhoek. 2017, 110(10): 1281 - 1286.

[15] Fernández E, Blume V, Garrido P, et al. *Streptococcus equi* subsp. *ruminatorum* subsp. nov., isolated from mastitis in small ruminants [J]. Int J of Syst Evol Microbio, 2004, 54(6): 2291 - 2296.

[16] Richards V P, Palmer S R, Pavinski Bitar P D, et al. Phylogenomics and the dynamic genome evolution of the genus *Streptococcus* [J]. Genome Biol Evol, 2014, 6(4): 741 - 753.

[17] Patty O A, Cursons R T. The molecular identification of *Streptococcus equi* subsp. *equi* strains isolated within New Zealand [J]. N Z Vet, 2014, 62(2): 63 - 67.