

蔡靖, 王苏苏, 李涛, 等. 警犬呼吸道和肠道细菌的鉴定及其特性分析 [J]. 畜牧与兽医, 2024, 56 (6): 110-117.

CAI J, WANG S S, LI T, et al. Identification of bacteria in respiratory tract and intestinal tract of police dogs and analysis of their characteristics [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2024, 56 (6): 110-117.

警犬呼吸道和肠道细菌的鉴定及其特性分析

蔡靖¹, 王苏苏^{2,3}, 李涛^{2,3}, 丁宁⁴, 王莹⁴, 王志鹏^{2,3},
王子渲^{2,3}, 包喜军¹, 朱程程¹, 蔡亚非^{2,3*}

1. 南京警察学院警犬研究所, 江苏 南京 210012;
2. 南京农业大学动物科技学院, 江苏 南京 210095;
3. 江苏省奶牛生产性能测定中心, 江苏 南京 210095;
4. 广州海关技术中心, 广东 广州 510623)

摘要: 为了快速检测犬类动物呼吸道和消化道细菌的分布状况并研究其特性, 选取南京警犬研究所部分患病警犬为试验对象, 收集呼吸道、肠道分泌物, 使用 TaqMan 探针-荧光定量 PCR 技术进行扩增鉴定, 分离细菌后进行药敏试验、细菌侵染细胞试验并检测凋亡相关斑点样蛋白 (ASC) 的变化。结果表明: 试验犬呼吸道内以 β -内酰胺酶抗性基因菌、金黄色葡萄球菌、无乳链球菌为主要细菌, 消化道内以大肠杆菌、 β -内酰胺酶抗性基因菌、支原体为主流细菌; 药敏试验表明肺炎克雷伯氏菌对头孢类抗生素敏感, 无乳链球菌对多种抗生素敏感, 经过无乳链球菌的侵染后的细胞凋亡率为 4.08%, 而经过肺炎克雷伯氏菌侵染后的细胞凋亡率为 13.47%, 侵染细胞后 0~4 h 炎症因子 ASC 显著上升。综上, TaqMan 探针-荧光定量 PCR 技术可以快速检测出警犬呼吸道和肠道细菌, 筛选出患犬呼吸道和肠道的主流菌, 这些细菌对头孢类等抗生素敏感, 可为兽医针对性地用药提供参考。

关键词: 病警犬细菌; PCR 快速检测; 药物敏感性; 炎症因子 ASC

中图分类号: S855 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-5130(2024)06-0110-08

Identification of bacteria in respiratory tract and intestinal tract of police dogs and analysis of their characteristics

CAI Jing¹, WANG Susu^{2,3}, LI Tao^{2,3}, DING Ning⁴, WANG Ying⁴, WANG Zhipeng^{2,3},
WANG Zixuan^{2,3}, BAO Xijun¹, ZHU Chengcheng¹, CAI Yafei^{2,3*}

1. Police Dog Technology Institute, Nanjing Police University, Nanjing 210012, China;
2. College of Animal Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;
3. Jiangsu Dairy Herd Improvement Center, Nanjing 210095, China;
4. Guangzhou Customs Technical Center, Guangzhou 510623, China)

Abstract: To rapidly detect the distribution of bacteria in the respiratory tract and digestive tract of dogs and to study their infection mechanisms, we selected some sick police dogs in Nanjing Police Dog Institute, collected their respiratory secretions and intestinal secretions, and used the TaqMan probe-fluorescence quantitative PCR technology to amplify and identify the types of pathogenic bacteria in the secretions. Then, the identified pathogens were isolated to test their drug sensitivity. Bacteria infection experiments were carried out on cells, and the changes in apoptosis-associated speck-like proteins containing a CARD (ASC) in cells were detected. The PCR results showed that β -lactamase resistance bacteria, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactis* were the main pathogens in the respiratory tract of the police dogs. *Escherichia coli*, β -lactamase resistance bacteria and *mycoplasma* were the main stream bacteria in the digestive tract. The results of the drug sensitivity test showed that *Klebsiella pneumoniae* was sensitive to cephalosporin antibiotics, and *Streptococcus agalactia* was sensitive to many antibiotics. After the infection of *Streptococcus agalactis*, the pyrogenic cells accounted for 4.08% of the total cells. The pyrogenic cells infected by *Klebsiella pneumoniae* accounted for 13.47% of the total cells. The inflammatory factor ASC increased within 0-4 h after infection.

收稿日期: 2023-12-13; 修回日期: 2024-04-26

基金项目: 公安部科技强警基础工作专项 (2021JC26)

第一作者: 蔡靖, 女, 助理研究员, 从事犬生理学研究

* 通信作者: 蔡亚非, 教授, 博导, 从事动物遗传育种研究, E-mail: ycai@njau.edu.cn.

This experiment indicated that the TaqMan probe-fluorescent quantitative PCR technique was able to quickly detect the bacteria in the respiratory tract and intestinal tract of police dogs, the main bacteria in the respiratory tract and intestinal tract of sick police dogs were screened out, those bacteria were sensitive to cephalosprin etc. The results helped to understand the infection mechanism, and provided targeted medication advice for veterinarians.

Keywords: bacteria in sick police dogs; rapid detection by PCR; susceptibility to drugs; inflammatory factor ASC

犬类细菌感染是常见疾病, 主要由于相应部位受到细菌入侵而造成的局部性炎症。警犬呼吸道、消化道细菌感染, 会对其健康和工作能力造成不良影响。呼吸道炎症会导致警犬出现发热、咳嗽、呼吸困难、流鼻涕、流泪、眼结膜炎等症状, 甚至出现肺炎、脑膜炎、心肌炎等并发症。消化道炎症会导致警犬出现呕吐、腹泻、腹痛、食欲不振、脱水、体重下降等症状, 甚至出现肠道穿孔、败血症等并发症。快速检测出警犬呼吸道和消化道的细菌显得十分必要。目前, 国内外警犬细菌检测技术大都采用微生物测定分析法^[1]、细菌培养法^[2]、多重 PCR 快速检测方法^[3]、荧光定量 PCR 检测法^[4-5]等。但上述方法准确性及特异性一般、且耗时较长、无法确定致病原因、存在假阴性等的情况, 使其具有局限性, 对警犬治疗用药指导价值不高。

TaqMan 探针-荧光定量 PCR 法在大型家畜上的应用相对成熟, 但是对于犬、猫等中小型动物应用较少, 本试验针对引起警犬呼吸道和肠道炎症的细菌的特有 DNA 保守区域设计特异的引物和 TaqMan 探针, 通过实时荧光 PCR 扩增是否产生级联放大荧光信号快速准确检测样品中引起炎症的细菌种类。根据 TaqMan 荧光探针定量 PCR 检测鉴定出警犬呼吸道和消化道细菌分布, 不仅使检测的菌种种类更为丰富且缩短耗时, 还增加了疑似阳性、弱阳性、强阳性等强度的区分。本研究还进一步对筛查得到的肺炎克雷伯氏菌和无乳链球菌的病原特性进行了初步鉴定, 为犬类细菌的感染机制研究奠定了理论基础。

1 材料与方

1.1 试验动物与材料

对 20 只患病警犬进行收集, 共得到收集病警犬大肠肛门测定分离菌株分泌液 (17 份) 和呼吸道分泌液 (59 份), 样品均来自公安部南京警犬研究所。

根据不同感染部位获得致病菌, 选用阿莫西林、庆大霉素、红霉素、林可霉素、青霉素、土霉素、头孢霉素等 20 种药敏片, 测定分离菌株采用药敏纸片扩散法 (K-B), 对 20 种常用抗菌药物的敏感性进行筛选^[6]。

其他试验材料包括: 细菌基因组 DNA 提取试剂盒 (货号: YRMBN7020)、8 联核酸检测试剂盒 (货

号: YRMBP7059XD)、16 联核酸检测试剂盒 (货号: YRMBP7045)、配套的实时荧光定量 PCR 仪 (YR8000) 均购自深圳市易瑞生物技术公司。血琼脂平板购自常德比克曼生物科技有限公司, 土霉素、新霉素、安普霉素、卡那霉素、恩诺沙星、头孢唑肟、青霉素钠、链霉素、多西环素、氟苯尼考、利福昔明、头孢噻唑、阿莫西林、林可霉素、泰乐菌素、黏杆菌素药敏纸片均购自齐鲁制药有限公司, DMEM/F12、胰酶均购自美国赛默飞世尔科技有限公司, ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix Q711、Annexin V-FITC/PI Apoptosis Detection Kit 试剂盒均购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司。

1.2 警犬呼吸道与消化道细菌感染情况监测

用肛拭子和鼻拭子分别对病犬消化道和呼吸道进行多次采样后, 样本由江苏省奶牛生产性能测定中心进行测定, 经过细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取 DNA, 用核酸检测试剂盒 TaqMan 荧光探针定量 PCR 检测警犬呼吸道和消化道细菌情况,

PCR 反应体系 25 μ L: 含细菌 DNA 的滤液 2.5 μ L, 100 μ mol/L Mix1、Mix2、Mix3、Mix4 (含有 TaqMan 探针) 21.5 μ L, 5 U/ μ L 混合酶 1 μ L。PCR 最佳反应模式为: 50 $^{\circ}$ C 去污变性 3 min, 然后 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 95 $^{\circ}$ C 扩增 10 s, 60 $^{\circ}$ C 延伸 40 s 并收集荧光信号, 去污与预变性为 1 个循环, 扩增与延伸共 40 个循环。

1.3 细菌分离、培养和鉴定

实时荧光定量 PCR 检测后剩余的样品进行选择培养, 然后根据细菌菌落形态, 在超净台中用酒精灭菌后的接种环挑选单菌落并加入对应培养基于各个培养皿中, 再放置于 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 的恒温摇床中进行 12~18 h 的增殖培养。完成增殖培养后, 利用 TaqMan 探针实时荧光定量 PCR 技术的核酸检测试剂盒, 使用 16S rRNA 通用引物, 分别位于 16S rRNA 1 522~1 540 bp (DG74) 和位于 16S rRNA 1 170~1 189 bp (RW01) 来检测细菌, 16S rDNA 测序结果通过 BLAST 比对确定细菌种属。上游引物序列为: 5'-AGGAGGTGATCCAACCGCA-3', 下游引物序列为: 5'-AACTGGAGGAAGGTGGGGAT-3'。

具体的 PCR 反应体系: 总体系 20 μ L, 菌液 1 μ L, 100 μ mol/L 16S rRNA 细菌, 通用上、下游引

物 0.24 μL , 5 U/ μL TaqDNA 聚合酶 10 μL , ddH₂O 8.52 μL 。PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳进行鉴定, 若为阳性, PCR 扩增产物将被送至苏州金唯智生物科技有限公司进行测序, 剩余菌液进行 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。待测序结果返回后, 将序列在 NCBI 上与 GenBank 中的序列进行序列比对。所有菌种均加入对应培养液中并加入甘油, 贴上标签注明日期时间, 按细菌种类进行分类保存并放置于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 供后续药敏试验、细胞侵染试验使用。

1.4 药敏试验

采用药敏纸片琼脂扩散法测定分离菌株, 敏感程度的评判标准应基于抑菌圈直径的大小 (以 mm 为单位)。抑菌圈直径在 20 mm 以上被定义为高度敏感, 16~20 mm 为中度敏感, 而 16 mm 以下则表示耐药性, S 代表敏感, I 代表中度敏感, R 代表耐药。针对不同的菌株以及不同种类的抗生素纸片, 应参考 NCCLS 的标准或 CLSI 标准, 以获取具体指导。根据细菌检测结果, 选择易于培养的无乳链球菌以及研究较少的肺炎克雷伯氏菌进行试验。取出在 -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存的无乳链球菌菌种和肺炎克雷伯氏菌菌种, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 的台式恒温振荡器中复苏菌液, 培养 12~18 h。活化菌液 2 至 3 次后, 采用琼脂平板活菌计数法和菌落计数仪检测菌液浓度 (分别测得无乳链球菌浓度为 4.79×10^{13} CFU/mL, 肺炎克雷伯氏菌浓度为 4.65×10^{12} CFU/mL)。用无血清的 DMEM/F12 培养液, 将菌液稀释至 10^5 CFU/mL、 10^6 CFU/mL、 10^8 CFU/mL。70 $^{\circ}\text{C}$ 金属浴灭活 30 min, 最后利用血平板鉴定无菌落生长, 即可作为热灭活菌液使用。

1.5 细菌互作小鼠乳腺 (MECs) 上皮细胞系

通过利用细菌互作小鼠 MECs 上皮细胞系, 通过激光共聚焦与胞内菌落计数的方法来确定细菌入侵细胞, 试验以甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 作为内参, 最后用荧光定量 PCR 检测炎症因子凋亡相关斑点样蛋白 (ASC) 的表达。具体操作如下: 将复苏的

小鼠 MECs 上皮细胞传代至 4~6 代后, 用 0.5 g/L 胰酶消化悬浮细胞, 在倒置显微镜下进行计数, 按 1×10^5 个/mL 的密度接种于 6 孔细胞培养板中, 待细胞培养板底部铺满单层细胞后, 用无血清 DMEM/F12 培养液饥饿培养 2 h。对照组加无血清的培养液, 试验组分别加入不同浓度的热灭活无乳链球菌和肺炎克雷伯氏菌 (分别为 10^5 CFU/mL、 10^6 CFU/mL、 10^8 CFU/mL), 分别培养 4 h、8 h、12 h、24 h 后收集细胞并在倒置显微镜下观察细胞形态, 试验组分别加入 10^5 CFU/mL 浓度的热灭活无乳链球菌菌液和肺炎克雷伯氏菌, 对照组与试验组各做 3 个重复, 分别培养 8 h 后收集细胞。按照 Annexin V-FITC/PI Apoptosis Detection kit 试剂盒说明书对细胞进行核染色处理, 并在激光共聚焦显微镜下拍摄被染色细胞, 计算各组的细胞凋亡率。

检测 ASC 的 PCR 体系同 1.3 中 PCR 体系, ASC 上游引物序列为 5'-TGAGCAGCTGCAAACGACTA-3', 下游引物序列为 5'-CACGAACTGCCTGGTACTGT-3'。

1.6 数据统计分析

检测数据由 YR-8000 及 GraphPad Prism 9.0 软件统计分析生成, 药敏试验数据通过游标卡尺测量得到, 细胞试验数据采用 $2^{\Delta\Delta\text{Ct}}$ 计算基因的相对表达量, 通过单因素方差分析法进行组间基因表达量的差异显著性检验, 结果以“平均值 \pm 标准差”表示, $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著。

2 结果

2.1 警犬呼吸道和消化道细菌的感染情况

在呼吸道内 β -内酰胺酶抗性基因菌、金黄色葡萄球菌、无乳链球菌检出率为 40%、21%、15%, 是主要细菌 (表 1); 消化道内大肠杆菌、 β -内酰胺酶抗性基因菌、支原体为 33%、27%、24%, 是主流菌 (表 2)。

表 1 呼吸道菌群分布

项目	β -内酰胺酶 抗性基因	无乳链球菌	绿脓杆菌	克雷伯氏菌属	停乳链球菌	支原体	金黄色 葡萄球菌	大肠杆菌
数量	19	7	3	5	2	0	10	2
占比/%	39.58	14.58	6.25	10.42	4.17	0	20.83	4.17

表 2 消化道菌群分布

项目	β -内酰胺酶 抗性基因	无乳链球菌	绿脓杆菌	克雷伯氏菌属	停乳链球菌	支原体	金黄色 葡萄球菌	大肠杆菌
数量	12	0	3	2	1	11	1	15
占比/%	26.67	0.00	6.67	4.44	2.22	24.44	2.22	33.33

2.2 细菌分离培养及其鉴定

针对2份样品进行了分离,获得了2个菌株。16S rDNA 测序结果通过 BLAST 比对验证细菌种属,从测序结果中鉴定出无乳链球菌和肺炎克雷伯氏菌,序列结果如表3所示。

表3 部分细菌序列比对结果

样品编号	GenBank 登录号	同源性/%	BLAST 比对结果
1	MH071375.1	99	无乳链球菌
2	FN689724.1	99	肺炎克雷伯氏菌

2.3 药敏试验

选用土霉素、新霉素、安普霉素、卡那霉素等20种药敏纸片进行试验,对这两种病原菌进行了药敏试验。按表4所示,肺炎克雷伯氏菌已经对12种抗生素产生了耐药性,对头孢喹肟、大观霉素、头孢噻唑等抗生素仍然保持敏感;无乳链球菌已经对10种抗生素产生了耐药性,对恩诺沙星、多西环素、金霉素、头孢喹肟、大观霉素、头孢噻唑等抗生素仍然保持敏感。其他病原菌也都表现出了对不同抗生素的耐药性。

表4 药敏结果统计

药物	肺炎克雷伯氏菌 (样品编号2)		无乳链球菌 (样品编号1)	
	抑菌圈直径/mm	敏感度	抑菌圈直径/mm	敏感度
阿西莫林	0	R	14	R
庆大霉素	15	R	0	R
红霉素	0	R	0	R
恩诺沙星	17	I	20	S
林可霉素	0	R	0	R
多西环素	17	I	23	S
头孢氨苄	18	I	14	
氨苄西林	0	R	0	R
青霉素	0	R	0	R
新霉素	13	R	17	I
乙酰螺旋霉	0	R	16	I
金霉素	15	R	23	S
头孢喹肟	29	S	38	S
苯唑西林	0	R	0	R
大观霉素	27	S	30	S
链霉素	11	R	0	R
泰乐菌素	0	R	0	R
头孢噻唑	25	S	25	S
卡那霉素	16	I	19	I
土霉素	17	I		

注:“S”、“I”、“R”分别代表敏感、中度敏感、耐药。

2.4 主要细菌互作细胞情况

由图1的结果可发现,当不同浓度的无乳链球菌和肺炎克雷伯氏菌互作小鼠 MECs 上皮细胞系4h时,细胞形态和状态并未发生任何变化,与对照组正常培养的上皮细胞无异,细胞形状规则,但互作时间达到8h时,细胞形态开始发生变化,变为不规则形状,出现细胞死亡,当互作时间达到12h和24h时,细胞由于营养和细菌互作而出现大量死亡,部分存活细胞与对照组细胞形态无异。

选择浓度为 10^5 CFU/mL的无乳链球菌和肺炎克雷伯氏菌分别对小鼠 MECs 上皮细胞系互作8h进行

细胞凋亡试验。研究结果如图2所示,对照组中细胞正常死亡,凋亡细胞占总细胞数的0.52%;经过无乳链球菌互作后的凋亡细胞占总细胞数的4.08%;而经过肺炎克雷伯氏菌互作后的凋亡细胞占总细胞数的13.47%。

图3显示,与对照组相比,无乳链球菌互作细胞后,可以显著加速细胞的凋亡($P<0.05$);肺炎克雷伯氏菌互作细胞后,可以极显著加速上皮细胞凋亡($P<0.01$),促进炎症因子的释放,扩大机体的炎症反应。

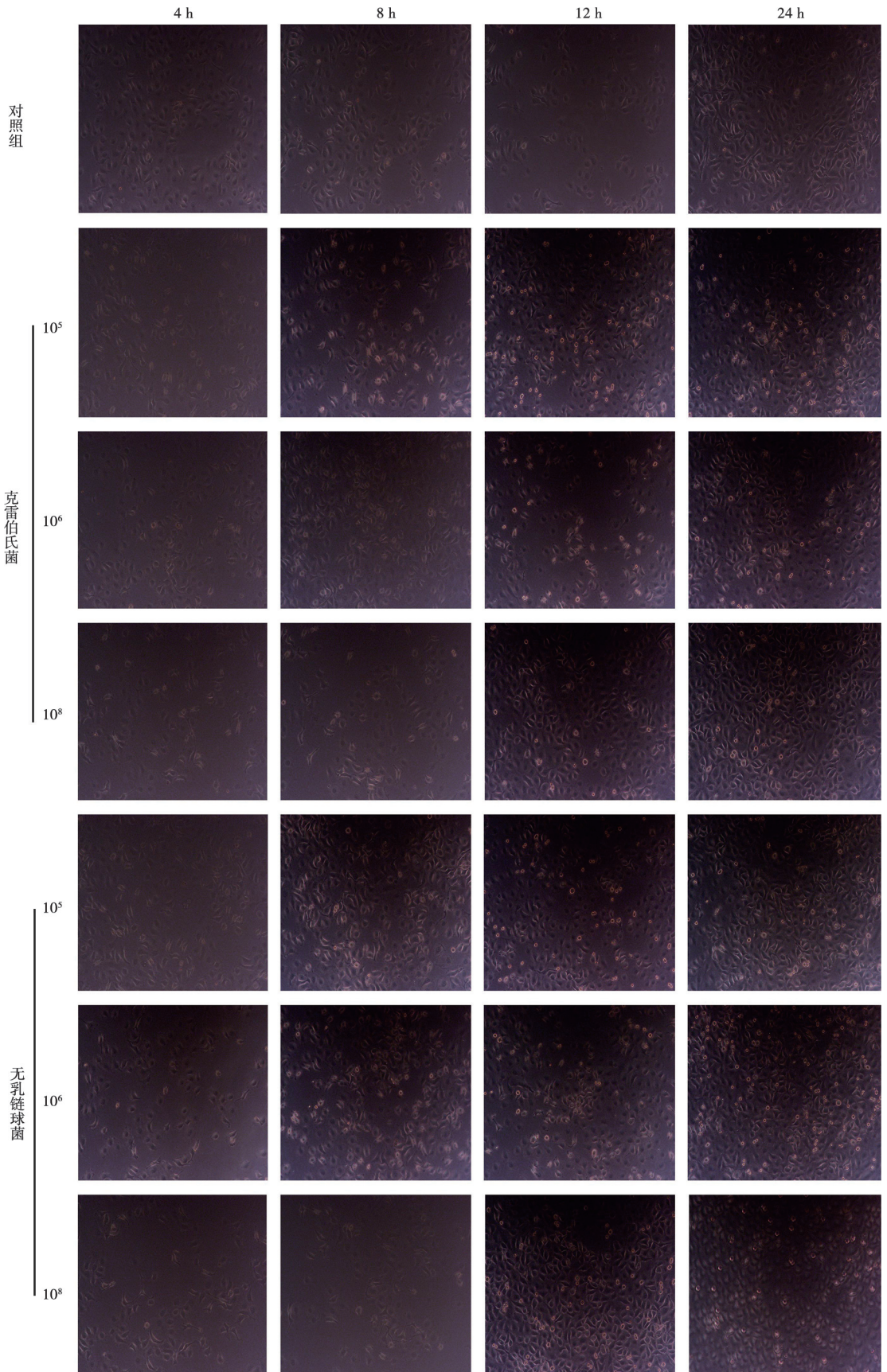


图 1 细菌互作上皮细胞形态图 (40×)

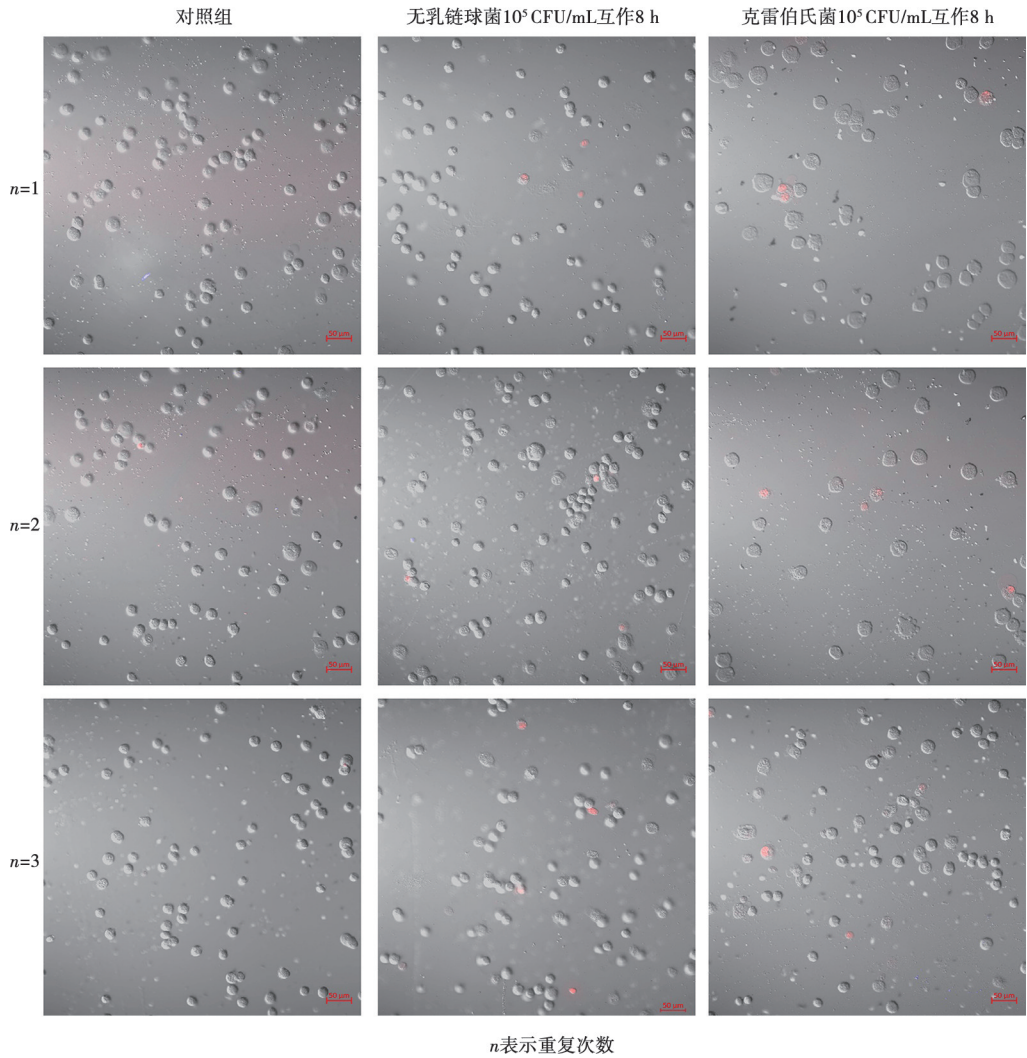


图2 无乳链球菌与肺炎克雷伯氏菌交互小鼠上皮细胞 (50×)

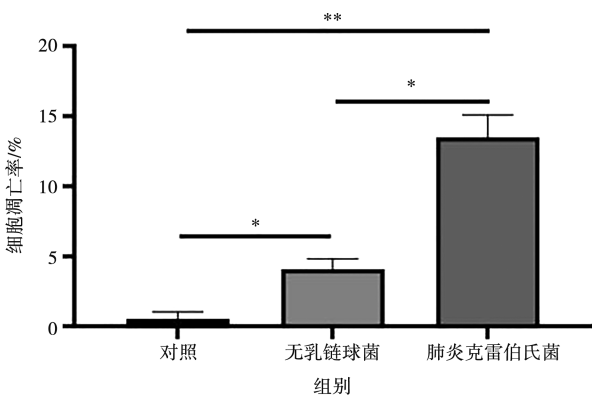


图3 无乳链球菌与肺炎克雷伯氏菌交互小鼠上皮细胞凋亡情况

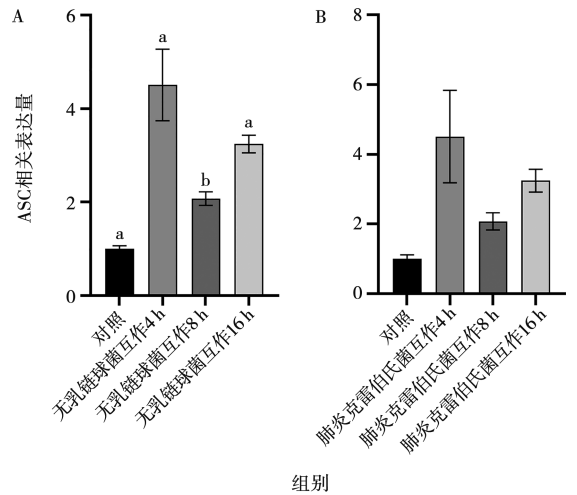


图4 无乳链球菌 (A) 和肺炎克雷伯氏菌 (B) 交互细胞后炎症因子 ASC 的变化

2.5 细菌交互细胞后炎症因子 ASC 的变化

如图4所示, 无乳链球菌、肺炎克雷伯氏菌交互细胞后 0~4 h 内炎症因子 ASC 上升。

3 讨论

3.1 警犬细菌感染情况分析

通过本研究发现,在病犬的消化道和呼吸道分别检出了不同的细菌,消化道中以大肠杆菌、 β -内酰胺酶抗性基因细菌、支原体为主要菌;呼吸道内以 β -内酰胺酶抗性基因菌、金黄色葡萄球菌、无乳链球菌为主要菌,这与卫昱君等^[7]的研究结果一致,说明消化道和呼吸道菌群分布一致,但菌落占比不同,体现了这两个部位的优势菌群。卫昱君等^[7]相关报道证明,大肠杆菌感染后会引发腹泻和肠出血, β -内酰胺酶(ESBLs)是指一类能水解青霉素类、头孢菌素类和单环 β -内酰胺类抗生素的酶^[8],含有 β -内酰胺酶抗性基因的菌类可以对相关的抗生素产生耐药性,病原性支原体主要位于动物泌尿生殖道、呼吸道、消化道黏膜表面,从而造成相应的疾病。金黄色葡萄球菌是一种在人畜中常见的条件性致病菌,感染后会引发肺炎、心肌炎、乳房炎等一系列疾病^[9]。呼吸道感染无乳链球菌有可能导致肺炎疾病发生,会引起咳嗽及咳痰的症状,可能造成胸闷和气喘,并伴有发热和头晕头痛,会造成精神倦怠和精神萎靡^[10-11]。但需要注意的是,大肠杆菌、无乳链球菌通常是机体正常的消化道、呼吸道菌群的一部分,而且在某些情况下,它可能是无症状携带者。所以未来在研究这类细菌时,可进一步探究警犬携带细菌量达到多少时和哪些毒力因子参与调控,会引起相应疾病的发生。

3.2 药敏试验结果分析

选择易于培养的无乳链球菌以及研究较少的肺炎克雷伯氏菌进行药敏试验,肖海霞等^[12]研究表明,头孢菌素是一种在临床上广泛应用的半合成抗生素,源于对冠头孢菌素C的改良,该抗生素具有杀菌广谱、对厌氧菌有效等特点。其作用机理是通过抑制细菌细胞壁的合成,从而实现杀菌效果。属于繁殖期杀菌药物。李亚非等^[13]研究指出头孢菌素类抗生素临床使用的不良反应较少,也是当前开发较快的一类抗生素。我们药敏试验结果与前人的研究结果一致^[10-13],肺炎克雷伯氏菌已经对12种抗生素产生了耐药性,对头孢唑肟、大观霉素、头孢噻唑等抗生素仍然保持敏感;无乳链球菌已经对10种抗生素产生了耐药性,对恩诺沙星、多西环素、金霉素、头孢唑肟、大观霉素、头孢噻唑等抗生素仍然保持敏感,可见两种细菌都对头孢类抗生素较为敏感。因此,在之后处理警犬等动物的相关病菌的感染性疾病时,可以减少使用已产生耐药的抗生素,使用大观霉素、头孢类抗生素等敏感性较高的抗生素。在之后处理警犬等

动物的相关病菌的感染性疾病时,这些结果可以很好的提供用药指导。这进一步为细菌感染提供了机制上的说明,为研发相关疾病新型药物提供一些参考。

3.3 细菌互作细胞试验结果分析

不同浓度的两种细菌互作小鼠MECs上皮细胞系4h时,细胞形态和状态并未发生任何变化,与对照组正常培养的上皮细胞无异,ASC却在0~4h增加,在4h达到最高,可能是细菌互作小鼠上皮细胞先引起ACS的增加,金龙腾等^[14]研究表明ASC是一种炎症因子,是一种与凋亡相关的斑点样蛋白,在免疫调节中发挥关键作用,特别是在炎症体的形成中,它通过形成AIM2炎症复合体参与了自身免疫性疾病和机体抵御病原体的过程,因此可作为体现炎症反应变化的风向标。通过ASC在机体的反应体现在细胞层面需要一段时间,故互作时间达到8h时,细胞形态才开始发生变化,变为不规则形状或是发生扭曲且开始出现细胞死亡,当互作时间达到12h和24h时,细胞由于营养和细菌互作而出现大量死亡,因此,互作8h时是细胞自然死亡最少且受到细菌互作后细胞有一定免疫应答的最佳时间。从浓度上看,两种细菌最低浓度时(10^5 CFU/mL时)细胞发生反应最为剧烈,形态和状态发生改变的细胞最多,这进一步为细菌感染提供了机制上的说明,为研发相关疾病新型药物提供一些参考。同时,低浓度的细菌互作比高浓度更易使细胞发生免疫反应,选择浓度 10^5 CFU/mL的无乳链球菌和肺炎克雷伯氏菌互作细胞8h进行细胞凋亡试验。

由凋亡细胞占比可以发现,经过细菌互作后的细胞由于发生免疫应答反应,细胞凋亡个数大量上升,肺炎克雷伯氏菌比无乳链球菌对细胞的伤害作用更为明显,细胞死亡数大约为对照组的20倍,组间差异极显著,大约为无乳链球菌组的3倍,组间差异显著。这对了解犬类受细菌互作细胞造成的危害有初步的研究。

4 结论

试验筛查了病警犬呼吸道和消化道的主流菌,通过药敏试验提出兽医用药可选择头孢类等敏感性较高的抗生素。同时证明了利用TaqMan探针—荧光定量PCR技术可以提高细菌检测效率及检测结果的准确性,该项技术已经趋于成熟,后期还可推广至宠物等中小型伴侣动物以及一些特种经济动物的细菌检测,有利于减少传染与经济损失。

参考文献:

[1] AIESSANDRA C, ANTONIETTA S M, VIOLETA D M, et al. Ap-

- plication of the micro biological survey analytical method for the determination of bacterial load in cow raw milk [J]. *Ital J Food Saf*, 2020, 9 (3): 7696.
- [2] 尹欣悦, 吴鹏, 马忠臣, 等. 一株无乳链球菌的分离鉴定与耐药性分析 [J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2020 (22): 99-101.
- [3] 希尼尼根, 李桂宇, 于景丽. 奶牛乳房炎病原菌多重 PCR 检测方法的建立 [J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2020 (12): 60-63.
- [4] 朱军伟, 杭锋, 王钦博, 等. 实时荧光定量 PCR 技术在乳品微生物学中的应用研究进展 [J]. *安徽农业科学*, 2014, 42 (15): 4764-4766.
- [5] KOSKINEN M T, HOLOPAINEN J, PYÖRÄLÄ S, et al. Analytical specificity and sensitivity of a real-time polymerase chain reaction assay for identification of bovine mastitis pathogens [J]. *J Dairy Sci*, 2009, 92 (3): 952-959.
- [6] 夏振海, 谢本华, 何生平, 等. TaqMan 探针-荧光定量 PCR 筛查奶牛乳房炎主要致病菌的研究 [J]. *中国奶牛*, 2021 (7): 42-48.
- [7] 卫昱君, 王紫婷, 徐瑗聪, 等. 致病性大肠杆菌现状分析及检测技术研究进展 [J]. *生物技术通报*, 2016, 32 (11): 80-92.
- [8] 吴同垒, 于秀建, 李巧玲, 等. 肉牛多杀性巴氏杆菌的分离鉴定及药敏分析 [J]. *中国兽医学报*, 2019, 39 (9): 1728-1734.
- [9] 毋状元, 仲荣, 李璋赟, 等. 一株牛源肺炎克雷伯氏菌的分离鉴定与药敏试验 [J]. *现代农业科技*, 2022 (6): 150-152.
- [10] 王宗海. 无乳链球菌特性及毒力相关因子研究进展 [J]. *中国乳业*, 2023 (8): 63-68.
- [11] 刘泽梁, 董爱英, 李娟. 无乳链球菌毒力因子的研究进展 [J]. *微生物学免疫学进展*, 2023, 51 (5): 74-79.
- [12] 肖海霞, 余新海. 某医院住院患者抗菌药物临床应用现状分析 [J]. *安徽医药*, 2018, 22 (7): 1405-1408.
- [13] 李亚菲, 李伟, 陈林, 等. 动物源金黄色葡萄球菌的流行特点及耐药机制研究进展 [J]. *中国抗生素杂志*, 2022, 47 (9): 894-899.
- [14] 金龙腾, 孙妍, 黄基红, 等. 原发性 EB 病毒感染患儿 AIM2 炎症小体通路的表达及与肝损伤的相关性 [J]. *温州医科大学学报*, 2022, 52 (3): 205-209.