

王 军,彭永帅,霍 军,等. 郑州市奶牛隐性乳腺炎病原菌的分离与鉴定[J]. 江苏农业科学,2016,44(9):254-256.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.09.071

郑州市奶牛隐性乳腺炎病原菌的分离与鉴定

王 军,彭永帅,霍 军,石冬梅,皇甫和平

(河南牧业经济学院,河南郑州 450046)

摘要:为了掌握郑州市奶牛隐性乳腺炎发病情况,为奶牛隐性乳腺炎病的预防提供参考依据,结合 LMT 检测方法进行隐性乳腺炎细菌学分析,对郑州市泌乳期 960 头奶牛进行细菌的分离和鉴定。结果表明,感染的细菌主要有金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、凝固酶阴性葡萄球菌、无乳链球菌、停乳链球菌、大肠杆菌、乳房链球菌、革兰氏阳性杆菌和酵母菌等 27 个菌株,其中 3 个乳区为混合感染。结果显示,郑州市奶牛隐性乳腺炎感染普遍存在,葡萄球菌和大肠杆菌是奶牛隐性乳腺炎的主要致病菌。

关键词:奶牛;隐性乳腺炎;病原菌;分离;鉴定

中图分类号: S858.237.2⁺6 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)09-0254-03

奶牛养殖业是绿色、高效、节粮型养殖业,世界各国都高度重视奶牛养殖业的发展,把发展乳业作为提高国民营养水平、增强国人体质的大事来抓^[1]。我国乳业随着贮运加工技术的提高和市场经济的带动,最近几年发展较快。国家有关部门为了提高国民身体素质,尤其是针对青少年和老年人的健康状况,提出改变饮食习惯的“一杯奶”工程,宣传鼓励对乳及乳制品消费,对乳业发展起到了推动作用^[2-3]。虽然我国人均乳及乳制品消费与世界平均水平仍有较大差距,但在科技进步带动下,人们的认识不断提高,不断改变生活饮食习惯,使市场对乳及乳制品需求日益增长,形成巨大的市场潜力。在良好的市场环境中,我国乳业发展正快速进入品种优良化、集约化、规模化的生产进程,使奶牛产量和乳品总产量大幅提高。然而在努力加快乳业发展步伐和集约化、规模化饲养、追求高产时,疾病防治措施的相对滞后已成为主要问题。各种疾病相应增多,隐性乳腺炎在牛群中的流行更为普遍,由于隐性乳腺炎不出现乳房发热、肿胀和疼痛等临床症状,易被饲养者忽视,成为产奶量降低的主要因素^[4-5]。而了解和掌握该病的发生、流行现状和致病因素是有效的防治隐性乳腺炎的主要措施,也是乳业健康发展的保障^[6]。因此,为了掌握郑州市奶牛隐性乳腺炎的发病情况,2014 年 5 月至

2015 年 4 月,抽取郑州市区不同养殖场泌乳期阳性奶牛奶样 100 份进行细菌学分析,为奶牛隐性乳腺炎病的防控提供理论依据,引导人们科学健康地养殖奶牛。

1 材料与方法

1.1 试验牛

2014 年 5 月至 2015 年 4 月,对郑州市 10 个奶牛场随机取样共 960 头泌乳期奶牛奶样 3 833 份,用于奶牛隐性乳腺炎细菌分离和鉴定。

1.2 试验器材

奶牛隐性乳腺炎诊断液(LMT),由中国农科院兰州中兽医研究所生产,性能类似美国加州奶牛隐性乳腺炎诊断试剂(CMT);无菌操作台 1 架;奥林巴斯 CKX41-A32RC 型显微镜;载玻片、盖玻片、血琼脂培养基、普通琼脂培养基、普通肉汤培养基、麦康凯琼脂平板培养基、培养皿、无菌试管若干、酒精灯、接种环、压力锅、恒温培养箱、电冰箱、药敏片和染色液等。

1.3 统计学方法

资料输入计算机,经核对后用 SPSS 19.0 统计分析软件进行统计分析,计量资料采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 时差异显著, $P < 0.01$ 差异极显著。

1.4 方法

1.4.1 病原菌分离方法

1.4.1.1 奶样采集 奶样采集与 LMT 检测结合进行,奶牛乳房和乳头清洗消毒后,经 LMT 检测出现阳性乳区时,取灭菌 10 mL 试管采取该乳区奶样 5~8 mL,采乳样时试管尽量不接触乳头,采后立即盖上管塞,对采样试管进行标号,于当

收稿日期:2015-07-30

基金项目:河南省高等学校重点科研项目(编号:15A230015);河南省重点科技攻关(编号:82102130014)。

作者简介:王 军(1977—),男,博士,讲师,从事兽医临床教学及奶牛疾病研究。E-mail:iamwangjun1977wj@163.com。

通信作者:石冬梅,教授,从事兽医临床教学及奶牛疾病研究。E-mail:dongmeishi126@126.com。

[7]韦受庆,赖 彬. 中国龙虾叶状幼体营养初步试验[J]. 海洋通报,2000,19(2):36-41.

[8]陈政强,陈昌生,黄永春,等. 中国龙虾生长特点及促生长途径的探讨[J]. 海洋科学,2006,30(12):25-31.

[9]游克仁. 海水龙虾人工养成技术[J]. 特种经济动植物,2004,7(2):16-17.

[10]王春琳,梅文骧. 中国龙虾雌性繁殖习性的初步研究[J]. 浙江海洋学院学报,1999,12(4):291-295.

[11]福建省水产厅养殖处. 福建海水名优种类养殖[Z]. 福州:福建省水产厅养殖处,1994.

[12]陈政强,陈昌生,吴仲庆,等. 中国龙虾人工养殖饵料的初步研究[J]. 上海水产大学学报,2000,9(4):308-312.

日送回实验室进行病原菌分离培养。

1.4.1.2 细菌分离培养 细菌培养前,将采集好的奶样混合均匀,按照无菌操作的方法将奶样分别接种于普通琼脂培养基、普通肉汤培养基、血琼脂培养基,置于 37 ℃ 恒温箱进行增殖培养 24 h,观察培养物生长情况和菌落形态特征,并进行记录。对菌落进行涂片、火焰固定、革兰氏染色后镜检,根据培养物镜检结果,选择特征性菌落接种血琼脂培养基和普通琼脂培养基、普通肉汤培养基、麦康凯琼脂平板培养基,置恒温箱 72 h 重新培养,供细菌鉴定使用^[7]。

1.4.1.3 细菌涂片、革兰氏染色和镜检 火焰灼烧接种环,取少量蒸馏水于载玻片,然后取少量菌落在水中混合后涂匀,干燥后进行火焰固定,抹片上滴加草酸铵结晶紫溶液 1 min 水洗,加革兰氏碘液媒染 1 min 水洗,加 95% 乙醇 10~30 s 水洗脱色,再滴加石碳酸复红复染 30 s 水洗,自然干燥镜检。

1.4.2 细菌鉴定方法

1.4.2.1 细菌培养特性鉴定 将细菌接种培养基培养后,观察有无菌落生长以及菌落的形态、大小、特征、颜色等。链球菌在普通琼脂培养基上生长不良或不生长,在血琼脂上生长为细小光滑、扁平或突起、边缘整齐的白色菌落,并进行记录。肉汤接种培养后,观察肉汤透明度、浑浊程度、管底是否有沉淀物、沉淀物特征、管壁是否有附着物,是否出现菌膜、菌环等。在肉汤中除乳房链球菌使肉汤一致混浊外,无乳、停乳链球菌在管底形成絮状沉淀。肠杆菌在肉汤中呈均匀混浊,管底有黏性沉淀,液面管壁有菌环,然后进行记录。血琼脂培养后,除观察菌落生长情况外,重点观察其是否溶血及溶血特性^[8]。 α 型溶血,在菌落周围形成不透明的草绿色溶血环,停乳链球菌为 α 溶血; β 型溶血,在菌落周围形成完全透明溶血环; γ 型溶血,乳房链球菌为 γ 型溶血,菌落周围无溶血现象。

1.4.2.2 细菌染色镜检和生化鉴定 细菌涂片后,使用革兰氏染色法染色,将染色后的涂片镜检,革兰氏阳性菌呈紫色,革兰氏阴性菌呈红色,用以区分细菌类别。染色后进行病原体镜检,主要观察细菌形态特征,根据病原菌大小、形态、有无荚膜、芽孢等特征进行细菌鉴定^[9]。对经培养特性、形态学检查初步鉴定的菌株进行进一步的生化鉴定。

2 结果与分析

2.1 奶牛隐性乳腺炎 LMT 检测结果

在做细菌分离鉴定的同时,采用 LMT 检测方法的进行奶牛隐性乳腺炎的调查,在不同规模的 10 个奶牛场检测奶牛 960 头,检出 LMT 阳性奶牛 490 头,平均阳性率为 51.04%。其中,阳性率最低的规模化养殖场,阳性率为 30.30%,养殖小区牛场阳性率最高,达到 66.67%,普通养殖场的阳性率为 56.67%。检测结果表明,郑州市奶牛场乳腺炎感染较为普遍,不同奶牛场乳腺炎阳性率差异极显著($P < 0.01$),尤其以养殖小区最为严重。

2.2 隐性乳腺炎阳性乳区细菌检测结果

隐性乳腺炎阳性乳区细菌检测结果见表 1 所示,根据 LMT 检测基础上,共采集阳性乳区奶样 100 份,共有 84 份乳样检出细菌,检出率 84.00%,其中养殖小区检出率最高,可达 94.44%,普通养殖场检出率为 80.00%,规模化养殖场检出率最低为 75.00%。

表 1 隐性乳腺炎阳性乳区细菌检测结果

奶牛场	乳区奶样数 (份)	检出菌乳区 奶样数(份)	检出率 (%)
规模化养殖场	24	18	75.00
普通养殖场	40	32	80.00
养殖小区	36	34	94.44
合计	100	84	84.00

2.3 细菌鉴定结果

由表 2 可知,对 100 份乳样进行细菌分离鉴定,共检出细菌 27 株,其中有 3 株为金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和革兰氏阳性杆菌混合感染,混合感染率为 11.11%。检出菌中,金黄色葡萄球菌 9 株,占 33.33%;表皮葡萄球菌 3 株,占细菌总数的 11.11%,凝固酶阴性葡萄球菌 2 株,占细菌总数的 7.41%;无乳、停乳和乳房链球菌各检出 3、2、1 株,分别占检出细菌总数的 11.11%、7.41%、3.70%;革兰氏阳性杆菌共检出 2 株,占 7.41%;检出酵母菌 1 株,占总检出率的 3.70%;金黄色葡萄球菌和大肠杆菌占 54%,为奶牛隐性乳腺炎的主要致病菌。

表 2 分离细菌鉴定结果

细菌种类	检出菌数 (株)	检出率 (%)	混合感染数 (株)	混合感染率 (%)
金黄色葡萄球菌	9	26	3	11.11
表皮葡萄球菌	3	7	0	0
凝固酶阴性葡萄球菌	2	4	0	0
无乳链球菌	3	13	0	0
停乳链球菌	2	8	0	0
大肠杆菌	4	28	3	11.11
乳房链球菌	1	4	0	0
革兰氏阳性杆菌	2	6	3	12.00
酵母菌	1	4	0	0
总计	27	100	3	11.11

2.4 不同奶牛场隐性乳腺炎感染细菌的优势菌群

在 10 个不同的牛场乳样中,养殖小区场检出菌 19 株,金黄色葡萄球菌 7 株、表皮葡萄球菌 2 株、凝固酶阴性葡萄球菌 1 株、链球菌 4 株、大肠杆菌 3 株、革兰氏阳性杆菌和酵母菌各 1 株,细菌种类较杂,其优势菌群为葡萄球菌、链球菌和大肠杆菌。普通养殖场检出菌共 13 株,其中金黄色葡萄球菌 3 株、凝固酶阴性葡萄球菌 2 株、无乳链球菌 1 株、停乳链球菌 2 株、大肠杆菌 3 株、革兰氏阳性杆菌 1 株,其优势菌群为金黄色葡萄球菌、凝固酶阴性葡萄球菌停乳链球菌和大肠杆菌。规模化养殖场共检出菌 7 株,金黄色葡萄球菌 3 株,表皮葡萄球菌 2 株,无乳链球菌和大肠杆菌各 1 株,可见优势菌为金黄色葡萄球菌(表 3)。

3 结论与讨论

奶牛乳腺炎的致病因素中,病原微生物感染是最重要的致病因素,本试验在做细菌分离鉴定的同时,采用 LMT 方法进行奶牛隐性乳腺炎的调查,在不同规模的 10 个奶牛场检测奶牛 960 头,检出 LMT 阳性奶牛 490 头,平均阳性率为 51.04%。其中阳性率最低的规模化养殖场,阳性率为 30.30%,养殖小区牛场阳性率最高,达到 66.67%,说明奶牛隐性乳腺炎的发生率与饲养管理和环境卫生条件差密切相关

表 3 不同奶牛场细菌感染优势菌群检测结果

细菌种类	养殖场检出菌数(株)			养殖场细菌检出率(%)		
	规模化养殖场	普通养殖场	养殖小区	规模化养殖场	普通养殖场	养殖小区
金黄色葡萄球菌	3	3	7	42.86	23.08	36.84
表皮葡萄球菌	2	1	2	28.57	7.69	10.53
凝固酶阴性葡萄球菌	0	2	1	0	15.38	5.26
无乳链球菌	1	1	3	14.29	7.69	15.79
停乳链球菌	0	2	0	0	15.38	0
大肠杆菌	1	3	3	14.29	23.08	15.79
乳房链球菌	0	0	1	0	0	5.26
革兰氏阳性杆菌	0	1	1	0	7.69	5.26
酵母菌	0	0	1	0	0	5.26
合计	7	13	19	100.00	100.00	100.00

关,饲养管理和环境卫生差的养殖小区要比规模化养殖场隐性乳腺炎感染率高。

本试验通过 LMT 检测,在被确定为隐性乳腺炎患牛的阳性乳区,采样共 100 份,经细菌学分离培养,共有 84 份乳样检出细菌,检出率 84%,其中养殖小区检出率最高,为 94.44%,普通养殖场检出率为 80.00%,规模化养殖场检出率最低为 75%,高出国内学者的报道 60% 和 63.48%,说明此次调查的养殖场,尤其是养殖小区应采取措施,加强饲养管理降低隐性乳腺炎的发生率。

引起隐性乳腺炎的生物性致病因素中,病原种类多达 150 多种,奶牛隐性乳腺炎的检测方式有很多^[10],也有人认为,隐性乳腺炎诊断是以牛奶中体细胞含量为标准判定,本试验结果可能与所取病料相关,取病料时有的奶牛因机体防御系统清除了乳腺中的病原微生物,但组织损伤尚未修复,奶中体细胞含量仍维持在较高水平,这一类隐性乳腺炎病例,奶样中检测不到细菌,也有可能有些细菌采用的分离培养方法要求比较高,无法获得细菌,也不能排除有特殊病原体感染的可能性^[9-11],还有可能是物理化学因素影响引起隐性乳腺炎的发生,所以隐性乳腺炎细菌阳性率低于 LMT 阳性率,这还有待于进一步研究。

本试验为细菌学鉴定,因受各种因素的影响,只能采用综合判定方法,本次试验采用兽南京农业大学陆承平编写的兽医微生物学和伯杰氏细菌鉴定手册(第八版)资料中的方法进行试验,结果表明,对 100 份乳样进行细菌分离鉴定,共检出细菌 27 株,其中有 3 株为金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和革兰氏阳性杆菌混合感染,混合感染率为 11.11%。检出菌中,金黄色葡萄球菌 9 株,占 33.33%;表皮葡萄球菌 3 株,占细菌总数的 11.11%,凝固酶阴性葡萄球菌 2 株,占细菌总数的 7.41%;无乳链球菌、停乳链球菌、乳房链球菌各检出 3、2、1 株,分别占检出细菌总数的 11.11%、7.41%、3.70%;革兰氏阳性杆菌共检出 2 株,占 7.41%;检出酵母菌 1 株,占总检出率的 3.70%;金黄色葡萄球菌和大肠杆菌占 54%,为奶牛隐性乳腺炎的主要致病菌,这为以后隐性乳腺炎的预防提供了有力的科学依据。

奶牛隐性乳腺炎病原微生物的传播方式可分为传染性和环境性两大类,传染性病原菌主要有金黄色葡萄球菌、大肠杆

菌、无乳链球菌和停乳链球菌,这类菌主要经挤奶过程的各个环节通过挤奶器、挤奶工的手、擦洗乳房过程所用的毛巾、水等传播,给奶牛业造成严重损失。本次试验中分离出 27 株病原菌,金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的检出率为较高,结果表明郑州市区奶牛隐性乳腺炎主要由传染性病原菌感染传播为主,所以在今后的隐性乳腺炎预防中要想降低奶牛隐性乳腺炎的发病率,必须在挤奶环节强化卫生消毒措施,降低病原在奶牛间的相互传播概率。

参考文献:

[1] 杨正涛. 奶牛乳腺炎金黄色葡萄球菌 5 型荚膜多糖模拟肽的研究[D]. 长春:吉林大学,2010.

[2] 王春璇. 奶牛疾病防治治疗学[M]. 北京:中国农业出版社,2013.

[3] 李静杰. 哈尔滨周边地区奶牛隐性乳腺炎的流行病学调查[J]. 养殖技术顾问,2015(1):58.

[4] 唐德琦. 奶牛隐性乳腺炎检测及其发生规律[J]. 中国畜牧兽医文摘,2014,30(7):73,28.

[5] 陈玉霞,林 峰. 3 种奶牛乳腺炎主要病原菌 PCR 检测方法的建立[J]. 中国农学通报,2012,28(17):105-108.

[6] 孙淑霞. 我国部分地区奶牛乳腺炎流行病学调查及 *IRAK2* 基因与乳腺炎相关性分析[D]. 长春:吉林大学,2013.

[7] 胡菊梅,温嘉琪,郑晓培,等. 奶牛乳房炎病原分离鉴定及其治疗方法研究[J]. 畜牧兽医杂志,2012,31(1):16-19.

[8] Deb R, Kumar A, Chakraborty S, et al. Trends in diagnosis and control of bovine mastitis; a review[J]. Pakistan Journal of Biological Sciences, 2013, 16(23):1653-1661.

[9] Jamali H, Radmehr B, Ismail S. Short communication: prevalence and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine clinical mastitis[J]. Journal of Dairy Science, 2014, 97(4):2226-2230.

[10] 刘长彬,钟发刚,卢春霞,等. 新疆石河子地区隐性乳房炎致病菌调查及分离鉴定[J]. 江苏农业科学,2014,42(5):181-184.

[11] Wang P Z, Li Z D, Yu H T, et al. Elevated serum concentrations of inflammatory cytokines and chemokines in patients with haemorrhagic fever with renal syndrome[J]. The Journal of International Medical Research, 2012, 40(2):648-656.