高静雯,曾宗波,武 磊,等. 新疆某规模化驴场奶驴乳房炎的临床及实验室诊断[J]. 江苏农业科学,2019,47(20):196 - 199.
doi:10.15889/j.issn.1002 - 1302.2019.20.045

新疆某规模化驴场奶驴乳房炎的临床及实验室诊断

高静雯[1], 曾宗波[1], 武 磊[2], 张 莉[1], 齐亚银[1]
(1. 石河子大学动物科技学院,新疆石河子 832000; 2. 克拉玛依瑞恒畜牧开发有限责任公司,新疆克拉玛依 834000)

摘要:为查明导致新疆某规模化驴场奶驴乳房炎的主要致病菌及其发病原因,首先进行了现场流行病学调查,后对 20 头奶驴(13 头患乳房炎、7 头健康)的血常规进行检测,并无菌采集 13 头临床型奶驴乳房炎的奶样,采用常规微生物学方法进行病原菌的分离鉴定及药敏试验。研究结果表明,本次乳房炎的发生与奶驴营养不良和养殖环境差息息相关,其中乳房炎组与健康组相比,血红蛋白、红细胞、淋巴细胞、粒细胞比例等均有所下降,其余指标变化不明显。同时,从乳汁中共分离鉴定到 16 株细菌,其中大肠杆菌 13 株,链球菌 3 株;药敏试验结果表明,大肠杆菌对链霉素、恩诺沙星、氟苯尼考的敏感率都在 75% 以上,对 β - 内酰胺类药物耐药率在 60% 以上;链球菌对青霉素、氨苄西林、氟苯尼考的敏感率都在 60% 以上,但对恩诺沙星耐药率达到 100%。研究结果揭示,尽管关于奶驴乳房炎发病率的报道较少,但通过本次试验发现,在生产环节中各种细菌对奶驴乳房炎的威胁不容小觑,且本次分离到的病原菌已经表现出比较严重的耐药性。

关键词:驴;乳房炎;生化鉴定;药敏试验;血细胞分析
中图分类号: S858.22 **文献标志码:** A **文章编号:**1002 - 1302(2019)20 - 0196 - 04

乳房炎是奶牛和奶山羊的常见高发病,产奶驴也有发生,以乳房发热、肿胀、疼痛、乳汁不通为主[1]。驴乳房炎,主要是由于驴乳腺受微生物、物理、化学和环境等因素刺激从而产生的一类炎症反应。驴和其他马属动物一样,哺乳期能产奶,奶驴泌乳期一般可达到 7 ~ 8 个月,驴的产乳量:驴产奶因品种不同标准不一,产后 1.5 ~ 4 个月处于高产期,日单产最高可达 3.5 ~ 4.0 kg,平均 1.5 ~ 1.8 kg[2]。驴奶具有较高的开发利用价值,Malacarne 等发现驴奶具有极高的营养价值,其主要成分与人奶非常相近,可作为人乳的替代品,同时还具有较高的药用价值,《本草纲目》中记载:“驴乳,气味甘,冷利,无毒,热频饮之可治气郁,解小儿热毒,不生痘疹”[3]。因此,驴乳房炎不仅对养殖户造成严重的经济损失,更对动物性食品安全与畜牧行业的发展造成了巨大的安全隐患。

2018 年 6 月,新疆某规模化驴场在采集驴奶时发现驴奶出现异常,其中有 13 头驴出现典型乳房炎症状,奶汁呈絮状,黄褐色泛黑。驴乳房炎给驴场带来了奶产量和奶质量降低、驴奶的废弃,甚至患驴的淘汰等较大的经济损失。本研究对该规模化驴场中病驴进行驴乳房炎致病菌的分离鉴定,并对这 13 头采样驴和 7 头健康驴进行血细胞成分分析测定,旨在明确引起驴乳房炎的主要病原菌种类,并探讨乳房炎患驴和健康驴血细胞成分的关系。

收稿日期:2018 - 07 - 05
基金项目:国家自然科学基金(编号:31760737)。
作者简介:高静雯(1994—),女,新疆伊犁人,硕士,动物传染病预防与防治。E - mail:993447409@qq.com。
通信作者:齐亚银,博士,副教授,主要从事动物传染病诊断与防治工作。E - mail:qiyayin@163.com。

[24] Nei M, Li W H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1979, 76(10):5269 - 5273.
[25] Tajima F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism[J]. Genetics, 1989, 123(3): 585 - 595.
[26] Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis[J]. Evolutionary Bioinformatics Online, 2007, 23:47 - 50.
[27] Slatkin M. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies[J]. Genetics, 1995, 139(1):457 - 462.
[28] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0[J]. Molecular Biology and Evolution, 2007, 24(8):1596 - 1599.
[29] Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences[J]. Journal of Molecular Evolution, 1980, 16(2):111 - 120.
[30] 刘占江. 水产基因组学技术[M]. 鲍宝龙,王志勇,张士璀,等译. 北京:化学工业出版社,2011:44 - 47.
[31] 单云晶,鲁翠云,李 超,等. 基于线粒体 *CO I* 基因序列的 5 种鲤养殖品种遗传多样性研究[J]. 中国水产科学,2013,20(5): 931 - 938.
[32] 何福玲,凌正宝,肖 俊,等. 两个人工选择奥利亚罗非鱼群体系统发育及其遗传多样性分析[J]. 南方农业学报,2017,48(2):341 - 349.
[33] 顾万春. 统计遗传学[M]. 北京:科学出版社,2004:191 - 192.
[34] Dong Z, Zhou E. Application of the random amplified polymorphic DNA technique in a study of heterosis in common carp, *Cyprinus carpio* L.[J]. Aquaculture Research, 1998, 29(8):595 - 600.

1　试验材料

1.1　病料来源

采集新疆某规模化驴场明显发作驴乳房炎的 13 头驴的奶样。采集时,先对乳头进行消毒,弃掉前 5 ~ 10 mL 驴乳后无菌采集乳样 5 mL 左右。

1.2　主要试剂和仪器

培养基:LB 肉汤、LB 琼脂、伊红 - 美兰琼脂(EMB);麦康凯培养基(MAC)均购自北京奥博星生物科技有限责任公司;脑心浸出液肉汤(BHI)(青岛高科园海博生物技术有限公司);羊血琼脂;链球菌选择培养基。

鉴定用培养基及试剂:硫化氢、苯丙氨酸、葡萄糖酸盐、蛋白胨水、葡磷胨水、枸橼酸盐、尿素、赖氨酸、鸟氨酸、棉子糖、山梨醇、侧金盏花醇、木胶糖、七叶苷(青岛高科技生物园海博生物有限公司)。

药敏纸片:包括 β - 内酰胺类 3 种:青霉素(10 μg,P)、氨苄西林(10 μg,AMP)、阿莫西林(10 μg,AMC);氨基糖苷类 2 种:庆大霉素(10 μg,GEN)、链霉素(10 μg,STR);喹诺酮类 1 种:恩诺沙星(15 μg,ENR);酰胺醇类 1 种:氟苯尼考(30 μg,FFC);大环内酯类 1 种:红霉素(10 μg,E);均购自杭州微生物试剂有限公司。

仪器:显微镜(型号 CX21FS1),血细胞分析仪(XFA6100A 型),隔水式恒温培养箱(北京市永光明医疗仪器厂),净化工作台(上海鸿都电子科技有限公司)。

2　试验方法

2.1　现场流行病学调查及血常规分析

2.1.1　现场流行病学调查　采用现场流行病学调查的手段和方法,查找导致该次奶驴乳房炎暴发的主要因素,包括天气、环境、饲养、挤奶情况以及发病率、死亡率等。

2.1.2　血常规检测　从该标准化驴场通过颈静脉采血的方法[4],采集 13 头发病驴的血液和 7 头健康母驴的血液进行血细胞成分的检测。

判定标准:参考《兽医检验》[5] 和姜生成等的研究中驴的血细胞成分标准[6] 进行分析(表 1)。

表 1　驴的血细胞成分标准

血细胞	标准
血红蛋白	11.9 g/100 mL
红细胞总数	6.5(5.00 ~ 7.00) × 10^6 个/mm^3
白细胞总数	14.4(7.00 ~ 19.50) × 10^3 个/mm^3
粒细胞比率	22.3%
淋巴细胞比率	56.5%
单核细胞比率	4.1%
血小板总数	(200 ~ 900) × 10^3 个/mm^3

2.2　细菌分离、培养及纯化

首先加入适量采集的奶样到普通 LB 肉汤进行 12 h 摇床培养,然后分别接种到不同的固体培养基上,包括 LB 平板、麦康凯培养基及血平板上,置于 37 ℃温箱培养 24 h,观察菌落及菌体的形态学特征;然后挑取单个菌落进行纯化,保存菌株,待进一步进行鉴定。

2.3　细菌的生化鉴定

将纯化后的单个菌落分别接种于硫化氢、苯丙氨酸、葡萄糖酸盐、蛋白胨水、葡磷胨水、枸橼酸盐、尿素、赖氨酸、鸟氨酸、棉子糖、山梨醇、侧金盏花醇、木胶糖、七叶苷等鉴定培养基中,37 ℃培养 6 ~ 48 h,观察试验结果(表 2)。

表 2　生化鉴定标准

实验项目	结果判定		观察时间(h)
	阳性	阴性	
硫化氢	黑色	无黑色	6 ~ 24
苯丙氨酸	兰绿色环	无兰绿色环	18 ~ 24
葡萄糖酸盐	黄色或橙色	不变色	24 ~ 48
蛋白胨水	红色	不变色	18 ~ 24
葡磷胨水	红色	不变色	24 ~ 28
枸橼酸盐	兰色	淡绿色	24 ~ 28
尿素	红色	黄色	12 ~ 24
赖氨酸	紫红色	黄色	18 ~ 24
鸟氨酸	紫红色	黄色	18 ~ 24
棉子糖	黄色	紫色	8 ~ 24
山梨醇	黄色	紫色	8 ~ 24
侧金盏花醇	黄色	紫色	8 ~ 24
木胶糖	黄色	紫色	8 ~ 24
七叶苷	深棕色	浅棕色	8 ~ 24

2.4　药敏试验

药物敏感性试验按照 CLSI 推荐的 K - B(Kirby - Bauer)法进行[7],将纯化的菌株分别在 LB 肉汤培养 18 ~ 24 h,用移液枪吸取 500 μL 菌液置于普通 LB 琼脂平板上,用涂布器进行涂匀,反复、多次涂抹,待菌液快干燥时,在平板上均匀贴上 5 片不同的药敏纸片,置于温箱培养 18 ~ 24 h 后测量抑菌环的直径,根据抑菌圈的大小判断其对抗菌药的敏感性。判定标准见表 3。

表 3　药敏试验判定标准

药物	纸片含量(Ag)	抑菌环直径(mm)		
		R	I	S
青霉素	10	≤14	—	≥15
氨苄西林	10	≤13	14 ~ 16	≥17
阿莫西林	20	≤13	14 ~ 17	≥18
庆大霉素	10	≤12	13 ~ 14	≥15
链霉素	10	≤11	12 ~ 14	≥15
恩诺沙星	15	≤15	16 ~ 20	≥21
氟苯尼考	30	≤12	13 ~ 17	≥18
红霉素	15	≤13	14 ~ 22	≥23

注:R 为耐药,I 为中度敏感,S 为高度敏感。

3　试验结果

3.1　现场流行病学调查结果

养殖规模:挤奶驴 872 头,公驴 23 头。

发病时间:2018 年 6 月份。

挤奶设备:移动式手工辅助挤奶设备,主要依靠人工挤奶,挤奶时未做消毒处理。

发病率与死亡率:13 头驴出现典型乳房炎症状,奶汁呈絮状,黄褐色或者黑色;无奶驴死亡。

饲养方式及营养比例:半舍饲化饲养,主要饲喂玉米秸

秆、玉米及少量苜蓿,均采用自由采食方式。

3.2　血常规检测结果

检测发病驴和健康驴的血液,由表 4 可知,健康驴的血细胞的数据都是在驴血细胞标注的数据范围内有小幅度波动;发病驴的血细胞大部分数量相比下降了,红细胞、血红蛋白、粒细胞比率及淋巴细胞比率均有所下降。

表 4　发病驴与健康驴血细胞检测结果

血细胞	正常($n=7$)	发病($n=13$)
血红蛋白(g/100 mL)	12.4 ±2.0	10.2 ±2.0
红细胞总数(个/mm^3)	(6.6 ±0.6) ×10^6	(5.7 ±0.6) ×10^6
白细胞总数(个/mm^3)	(9.6 ±2.0) ×10^3	(21.5 ±2.0) ×10^3
粒细胞比率(%)	25.3 ±1.1	18.4 ±1.3
淋巴细胞比率(%)	52.9 ±1.7	49.9 ±2.6
单核细胞比率(%)	4.11 ±0.13	3.97 ±0.2
血小板总数(个/mm^3)	(256 ±30.5) ×10^3	(223 ±15.1) ×10^3

注:结果以“平均值 ±标准差”($\bar{x} \pm s$)表示。

3.3　细菌分离纯化及形态学结果

将 13 份奶样进行接种培养,分离出 16 株可疑菌株,通过麦康凯培养基、伊红 - 美蓝培养基、以及链球菌选择培养基的培养,观察其菌落及菌体的形态,其中 13 株菌疑似大肠杆菌(图 1),3 株疑似链球菌(图 2)。所有株菌在普通 LB 培养基上都长出边缘光滑且规则的菌落,其中 13 株菌落较大 1.0 ~ 2.5 mm,3 株菌落较小直径为 1.0 ~ 1.5 mm;13 株菌在麦康凯培养基上长出粉红色圆滑的菌落(图 3),在伊红 - 美蓝培养基上长出具有金属光泽的菌落(图 4),革兰氏染色镜检可见革兰氏阴性、粉红色、两端钝圆的短杆状菌[8];剩余 3 株菌在链球菌选择培养基上长出了圆形、隆起、光滑、湿润、露滴状菌落(图 5),同时在血平板上长出了光滑、伽马 - 溶血状、半透明边缘的菌落[9](图 6)。

3.4　生理生化鉴定结果

对分离纯化的细菌进行生理生化特性鉴定,进一步探究细菌的特性,观察鉴定试剂的颜色变化情况以及是否有产酸产气情况等,结果见表 5。

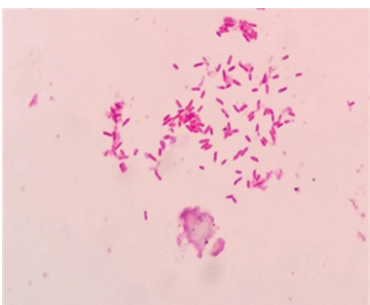

图1　大肠杆菌

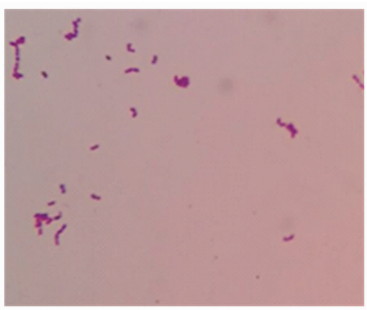

图2　链球菌

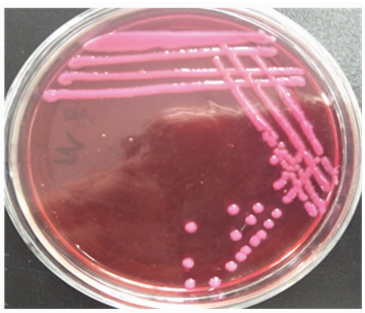

图3　麦康凯培养基

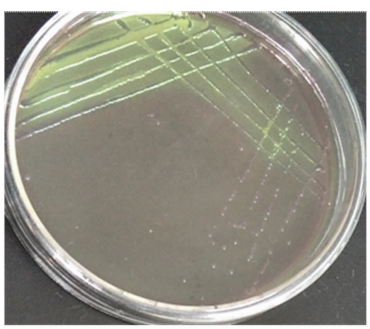

图4　伊红-美蓝培养基

图5　链球菌选择培养基

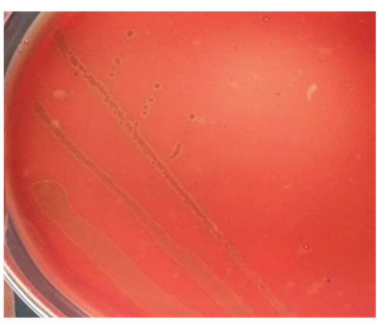

图6　血培养基

由表 5 可知,疑似为大肠杆菌的 13 株菌生化鉴定结果基本一致,有产酸产气现象,蛋白胨水和葡磷胨水都变成红色阳性,赖氨酸脱羧酶试验阳性,能发酵山梨醇、棉子糖、侧金盏花醇和木胶糖,其生化特性符合大肠杆菌的特性[10];另外 3 株菌的生化鉴定显示其能发酵山梨醇、棉子糖、木胶糖,并且不能使七叶苷水解,其特性基本符合链球菌的特征。

3.5　药敏试验结果

由表 6 可知,2 类菌同时对链霉素和氟苯尼考都是高敏的;大肠杆菌对氟苯尼考最敏感,敏感率 92%;对恩诺沙星和链霉素敏感率分别 84.6% 和 76.9%;对 β - 内酰胺类药物较为耐药,氨苄西林和阿莫西林耐药率均是 61.5%,青霉素更是 100% 耐药。链球菌则是对氨苄西林、阿莫西林和氟苯尼考有 100% 的高度敏感率;对青霉素和链霉素也较为敏感,敏感率为 66.7%;对恩诺沙星则完全耐药。

4　分析与讨论

导致各种动物乳房炎的最直接原因主要是病原微生物的感染[11],例如葡萄球菌、链球菌、大肠埃希菌、变形杆菌、沙门氏菌、肠杆菌属、棒状杆菌属、酵母菌、支原体等[12]。其中大肠杆菌性乳房炎常引起急性炎症,使乳房炎从隐性乳房炎转变为临床型[13],链球菌性乳房炎往往是由于饲养环境造成的。试验结果表明,发病驴血红蛋白和红细胞数量相对减少,淋巴细胞不具有吞噬作用,其比例下降说明自身免疫力下降;粒细胞比率下降,白细胞数量明显增多,说明由于有炎症反应,导致其产生抗体来抵抗病原菌,这与张银亮关于乳房炎的

表 5　纯化的细菌生化鉴定结果对比

试验项目	结果判定		观察时间
	13 株菌	3 株菌	(h)
硫化氢	−	+	12
苯丙氨酸	−	−	24
葡萄糖酸盐	−	+	24
蛋白胨水	+	−	24
葡磷胨水	+	−	24
枸橼酸盐	−	−	24
尿素	−	−	24
赖氨酸	+	+	24
鸟氨酸	+	+	24
棉子糖	+	+	12
山梨醇	+	−	12
侧金盏花醇	+	+	12
木胶糖	+	+	12
七叶苷	−	−	24

注:“ + ”为 90% 以上菌株阳性,“ − ”为 90% 以上菌株阴性。

发生与免疫力之间相关性的内容相符[14]。同时该驴场的饲养管理差、环境不良、营养水平低也是导致发生乳房炎的诱因,而且对发病驴群也没有采取隔离措施,挤奶设备也没有分开使用。

近年,乳房炎在奶牛上为高发病,因此研究得也较为透彻,而驴的乳房炎鲜有报道。根据药敏试验及血常规分析,分离株已经表现明显的耐药性,建议该场采用中药和高敏抗炎药物相结合的方式进行该病的综合防控[1],尤其要有“防大于治”的思维,定期对驴奶进行乳液中体细胞数量检测或 CMT(加州乳房炎检测法)进行检测,避免隐性乳房炎转变为临床型乳房炎[15]。

本研究通过现场流行病学调查、血常规检测和细菌的分离鉴定及药敏相结合的方式,查明了导致新疆某规模化驴场奶驴乳房炎的发病原因,为控制该场奶驴乳房炎的蔓延提供了科学依据,同时为进一步研究驴乳房炎提供了科学支撑。

表 6　纯化的菌株药敏实验结果

药物	大肠杆菌(n = 13)			链球菌(n = 3)		
	敏感	中敏	耐药	敏感	中敏	耐药
青霉素	0	0	13(100.0%)	2(66.7%)	1(33.3%)	0
氨苄西林	0	5(38.5%)	8(61.5%)	3(100.0%)	0	0
阿莫西林	1(7.7%)	4(30.8%)	8(61.5%)	3(100.0%)	0	0
庆大毒素	1(7.7%)	6(46.2%)	6(46.2%)	0	3(100.0%)	0
链霉素	10(76.9%)	3(23.1%)	0	2(66.7%)	1(33.3%)	0
恩诺沙星	11(84.6%)	2(15.0%)	0	0	0	3(100.0%)
氟苯尼考	12(92.0%)	1(8.0%)	0	3(100.0%)	0	0
红霉素	0	1(8.0%)	12(92.0%)	0	3(100%)	0

参考文献:

[1]张谢文. 金银花治疗驴急性乳房炎[J]. 中兽医学杂志,2015(4):84.

[2]吕开龙. 奶驴精细化管理技术措施[J]. 新疆畜牧业,2016(6):24 − 26.

[3]Massiomo M, Francesca M, Andrea S, et al. Protein and fat composition of mare's milk:Some nutritional remarks with reference to human and cow' milk[J]. IntDairy J,2002,12:869 − 877.

[4]况树斌,孟建明. 常见动物采血方法及注意事项[J]. 养殖与饲料,2014(10):33 − 34.

[5]中国人们解放军兽医大学. 兽医检疫[M]. 北京:农业出版社,1977:3 − 37.

[6]姜生成,江家椿,何玛利,等. 西藏高原藏驴血细胞的观察分析[J]. 调查报告实验研究,1993,5(4):9 − 11.

[7]Clinical and Laboratory Standards Institute. M100 − S23:performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty − third informational supplement[S]. USA,2013.

[8]张星星. 北疆地区犊牛源大肠杆菌系统进化分群及耐药特性研究[D]. 石河子:石河子大学,2016.

[9]王礼伟,杨亚东,屈勇刚,等. 新疆石河子地区奶牛乳房炎链球菌的分离鉴定及药敏试验[J]. 动物医学进展,2014,35(2):124 − 127.

[10]徐继英,刘俊林,李先波,等. 我国部分地区奶牛乳房炎源大肠杆菌生物学特性及耐药性分析[J]. 农业生物技术学报,2012,20(9):1035 − 1041.

[11]张莉莉,杨　峰,王益民,等. 我国西北地区奶牛源乳房炎无乳链球菌的青霉素耐药特性研究[J]. 黑龙江畜牧兽医,2018(4):105 − 106,109.

[12]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.

[13]李林育,秦　鹏,冶冬阳,等. 英黄散水煎液对奶牛乳房炎致病菌的体外抑菌及抗炎效果的观察[J]. 中国兽医科学,2017,47(9):1193 − 1199.

[14]张银亮,陈创夫,乔　军,等. 新疆北部地区奶牛子宫内膜炎主要病原菌的分离鉴定及其血细胞成分分析[J]. 中国草食动物,2010,30(4):52 − 55.

[15]江俊峰,周玉贵,陆东林. 奶驴养殖的经济效益[J]. 新疆畜牧业,2014(12):4 − 5.