

奶牛子宫内膜炎血常规分析及病原分离鉴定

牛 晖^{1,2},徐照学³,王二耀³,冯亚杰³,陈付英^{3*},张嘉保^{1*}

(1. 吉林大学 动物医学学院,吉林 长春 130062; 2. 河南省肉牛工程技术研究中心有限公司,河南 郑州 450003; 3. 河南省农业科学院 畜牧兽医研究所,河南 郑州 450002)

摘要:为探讨血常规检验在奶牛子宫内膜炎临床诊断中的意义,分析了患病奶牛的血常规数据,同时分离鉴定其子宫内病原微生物。结果表明,与正常奶牛的血常规数据相比,患病奶牛的白细胞计数极显著增高($P<0.01$);中性粒细胞百分比和中性粒细胞绝对值均极显著增加($P<0.01$),淋巴细胞百分比极显著降低($P<0.01$),说明患病组奶牛可能患有由细菌感染引起的子宫内膜炎。经过纯化鉴定,从患牛子宫内分离出15种(54株)细菌,其中,主要为大肠杆菌和金黄色葡萄球菌,其次是奥斯陆莫拉菌和蜡样芽孢杆菌,且以混合感染为主。

关键词:血常规;子宫内膜炎;奶牛;病原菌

中图分类号: S857.2 文献标志码: A 文章编号: 1004-3268(2015)08-0141-04

Blood Routine Examination and Pathogen Isolation and Identification of Dairy Cattle with Endometritis

NIU Hui^{1,2},XU Zhaoxue³,WANG Eryao³,FENG Yajie³,CHEN Fuying^{3*},ZHANG Jiabao^{1*}

(1. College of Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130062, China;
2. Research Center of Beef Cattle Engineering and Technology of Henan Province Co. Ltd., Zhengzhou 450003, China;
3. Research Institute for Animal Husbandry and Veterinary, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: To investigate the clinical diagnosis value of blood count in the dairy cattle with endometritis, the blood count of the dairy cattle with endometritis were analyzed and the pathogenic microorganism were isolated from the uterus. Compared with the healthy individuals, the white blood cell count increased greatly in the illness dairy cattle ($P<0.01$), the percentage of the neutrophilic granulocyte and absolute neutrophil increased at the same time ($P<0.01$), and the lymphocyte percentage decreased greatly ($P<0.01$). The results suggested that the illness may be caused by bacterial infection. 15 species (54 strains) bacteria were isolated from uterine secretion samples of dairy cattle, among which the *E. coli* and *S. aureus* were major pathogenic bacteria, followed by *M. osloensis* and *B. cereus*, with the fixed pathogen infections as the major, fungi and virus was not isolated.

Key words: blood routine; endometritis; cow; pathogen

血液常规生理指标的变化通常是多种疾病状态和发展阶段的有效反映,能直观地反映出疾病的变化及进程,其检验结果为疾病的诊断和护理提供科学依据。目前,血常规检验在宠物疾病的临床诊断

和预后中得到广泛应用,但在奶牛疾病的临床诊断上应用很少^[1-6]。奶牛子宫内膜炎是发生在奶牛子宫内膜上的炎症,是奶牛最常见的产科疾病,该病在全世界范围内广泛存在,给畜牧业带来严重的损失。

收稿日期:2015-04-22

基金项目:国家肉牛牦牛产业技术体系项目(CARS-38);河南省肉牛产业技术体系项目(S2013-08);河南省农业科学院自主创新项目

作者简介:牛 晖(1974-),男,河南遂平人,在读博士研究生,研究方向:兽医技术服务。E-mail:huiniu2004@163.com

* 通讯作者:陈付英(1973-),女,河南南阳人,助理研究员,博士,主要从事动物遗传学研究。E-mail:fychen2004@sina.com

张嘉保(1963-),男,黑龙江肇州人,教授,博士,主要从事动物遗传育种及繁殖调控研究。
E-mail:zjb@jlu.edu.cn

正常情况下,牛的子宫是一个相对无菌的封闭环境,在分娩过程中或者产褥期间病原微生物侵入子宫,引起子宫内膜上的急性炎症^[7-8]。当牛患子宫内膜炎时,炎性反应物进入血液,血液常规生理指标会发生相应的变化。为了探讨血常规在奶牛临床诊断中的意义,本研究将血常规检查和奶牛子宫内膜炎病原鉴定相结合,研究奶牛子宫内膜炎发生发展过程中的血液学变化规律,结合患子宫内膜炎奶牛子宫分泌物细菌分离鉴定,旨在为奶牛子宫内膜炎的早期治疗提供参考依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

1.1.1 样品采集 供试 61 头成年母牛来自郑州郊区某奶牛场,样品分为 2 组,其中以确诊患子宫内膜炎(且没有其他外伤、没有乳房炎等疾病)的 32 头母牛为试验组,其余 29 头正常母牛为对照组。所有参试奶牛用含 EDTAK₂ 抗凝剂的负压采血管采集尾动脉血。采用直肠把握法采集试验组奶牛子宫内容物,置于低温肉汤 A 培养基中带回实验室进行病原菌鉴定。

1.1.2 主要试验器材与试剂 检测血常规的器材与试剂:pocH-100i 型自动血球计数仪(Sysmex 公司,日本),Sysmes 配套的稀释剂、清洗剂、含 EDTAK₂ 抗凝剂的负压采血管。用于病原菌鉴定和分离的试剂:肉汤培养基、液体硫乙醇盐培养基、血液琼脂基础培养基、胰蛋白胨大豆琼脂、麦康凯琼脂培养基、厌氧琼脂、MH 肉汤,均为青岛高科园海博生物技术有限公司产品。

1.2 方法

1.2.1 血常规测定 应用 pocH-100i 型自动血球

计数测定采集到的血液样本的白细胞计数、淋巴细胞百分比、中性粒细胞百分比、淋巴细胞绝对值、中性粒细胞绝对值、红细胞计数、平均红细胞体积等相关血常规生理指标。

1.2.2 细菌的分离纯化与鉴定 将采集到的子宫内容物接种于肉汤 A 培养基,置于 37℃ 恒温培养箱中培养 18~24 h 后,取一部分划线接种于血液琼脂平板和双抗琼脂平板,放入 37℃ 恒温箱中培养 18~24 h;另外再取一部分,划线培养于改良沙氏琼脂平板、厌氧琼脂平板,放入 25~30℃ 的培养箱并保持一定的湿度(在培养箱底层放 1 盆水)进行培养。挑取生长状态不同的菌落,进行革兰氏染色和镜检,根据菌落的染色特性并结合菌落形态和生长特征,进行判断和分类^[9-11]。

1.3 数据统计与分析

试验数据的平均值和标准差采用 Excel 软件进行统计,成对数据之间的差异显著性采用 *t* 检验进行分析。

2 结果与分析

2.1 血常规检测结果

从表 1 可以看出,患子宫内膜炎奶牛的白细胞计数高于参考范围,与对照组相比,差异极显著($P < 0.01$);中性粒细胞比例也发生了变化,与对照组相比,患病组奶牛的中性粒细胞百分比极显著增高($P < 0.01$),中性粒细胞绝对值极显著增高($P < 0.01$),淋巴细胞百分比极显著降低($P < 0.01$),淋巴细胞绝对值没有发生显著变化($P > 0.05$)。患病组奶牛与正常组奶牛的红细胞计数、平均红细胞体积差异均不显著($P > 0.05$),但平均红细胞体积均低于参考范围。

表 1 血常规相关指标

测定项目	对照组	患病组	参考范围 ^[1-3]
白细胞计数/($\times 10^3/\mu\text{L}$)	7.66 \pm 1.43 ^{Bb}	13.33 \pm 1.56 ^{Aa}	6~12
淋巴细胞百分比/%	45.76 \pm 7.94 ^{Aa}	29.76 \pm 5.40 ^{Bb}	52~81
中性粒细胞百分比/%	54.24 \pm 7.94 ^{Bb}	70.34 \pm 8.40 ^{Aa}	15~45
淋巴细胞绝对值/($\times 10^3/\mu\text{L}$)	3.52 \pm 0.93 ^{Aa}	4.05 \pm 1.00 ^{Aa}	2.5~7.5
中性粒细胞绝对值/($\times 10^3/\mu\text{L}$)	4.14 \pm 0.95 ^{Bb}	9.32 \pm 0.98 ^{Aa}	0.6~4.0
红细胞计数/($\times 10^3/\mu\text{L}$)	6.24 \pm 0.76 ^{Aa}	6.19 \pm 0.51 ^{Aa}	6.1~10.7
平均红细胞体积/fL	42.27 \pm 9.98 ^{Aa}	42.40 \pm 3.62 ^{Aa}	62~78

注:同行数据肩标不同大写字母表示差异极显著($P < 0.01$),不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

2.2 细菌的分离纯化鉴定结果

由表 2 可知,从 32 头奶牛子宫内容物中共分离出 15 种(54 株)细菌,其中革兰氏阳性菌 29 株,占 53.7%(29/54),革兰氏阴性细菌 25 株,占 46.3%

(25/54)。从细菌的形态上分类,球菌 17 株,杆菌 37 株。说明该奶牛场产后子宫内的菌群以革兰氏阳性细菌为主,细菌形态上以杆菌为主。在分离出细菌的 32 份样品中,23 份样品为混合感染,占样品

数的71.9% ;单一细菌感染 9 份,占 28.1% 。在单一细菌感染的病例中,由大肠杆菌引发的 4 例,占单一细菌感染的 44.4% ,由金黄色葡萄球菌引发的 2 例,占单一细菌感染的 22.2% 。在混合感染病例中,大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的检出率较高,共检

出 16 株,占混合感染株数的 35.6% ,其次是奥斯陆莫拉菌 (5 株, 11.1%) 和蜡样芽孢杆菌 (4 株, 8.9%) 。通过以上数据分析显示,该奶牛场的子宫内膜炎主要是由大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、奥斯陆莫拉菌和蜡样芽孢杆菌引起。

表 2 奶牛子宫内膜炎病原菌分离鉴定结果

病原名称	感染类型		特性		检出率/%
	单独感染率/%	混合感染率/%	革兰氏染色	形状	
大肠杆菌	44.4(4/9)	20.0(9/45)	阴性	短杆菌	34.4(11/32)
金黄色葡萄球菌	22.2(2/9)	15.6(7/45)	阳性	球菌	21.9(7/32)
产吡啶金黄杆菌	0	6.7(3/45)	阴性	杆菌	9.4(3/32)
浅黄色单胞菌	0	2.2(1/45)	阴性	杆菌	3.1(1/32)
奥斯陆莫拉菌	11.1(1/9)	11.1(5/45)	阳性	杆菌	18.8(6/32)
蜡样芽孢杆菌	11.1(1/9)	8.9(4/45)	阴性	杆菌	15.6(5/32)
停乳链球菌	0	2.2(1/45)	阳性	球菌	3.1(1/32)
表皮葡萄球菌	0	4.4(2/45)	阳性	球菌	6.3(2/32)
玫瑰色库克菌	0	4.4(2/45)	阳性	球菌	6.3(2/32)
棒状杆菌属	0	2.2(1/45)	阳性	杆菌	3.1(1/32)
尿肠球菌	0	4.4(2/45)	阳性	球菌	6.3(2/32)
乳房链球菌	0	6.7(3/45)	阳性	球菌	9.4(3/32)
成团泛菌	0	4.4(2/45)	阴性	杆菌	6.3(2/32)
苏云金芽孢杆菌	0	6.7(3/45)	阳性	杆菌	9.4(3/32)
产碱假单胞菌	11.1(1/9)	0	阴性	杆菌	3.1(1/32)

3 结论与讨论

研究表明,白细胞增多常见于细菌性感染发生时^[3,12-13],病毒性疾病在临床上多表现出白细胞总数降低,淋巴细胞数量和比例上升^[14]。本研究共检测了 32 头患子宫内膜炎奶牛的血液,同时检测正常奶牛 29 头作对照。通过对比 2 组奶牛的白细胞和红细胞部分血常规指标发现,患子宫内膜炎的奶牛白细胞数极显著增加 ($P < 0.01$),中性粒细胞百分比极显著升高 ($P < 0.01$),中性粒细胞绝对值极显著升高 ($P < 0.01$),淋巴细胞绝对值没有显著增加 ($P > 0.05$),但在白细胞中所占的比例极显著下降 ($P < 0.01$),血常规检测结果表明,本次采集样本的病例可能是由细菌感染引起的,与病原微生物的鉴定结果一致,文献[3-4]也有类似的报道。中性粒细胞在反刍动物血液中占大部分(45% 左右),中性粒细胞是抵御细菌的第 1 道防线,它们是炎症发生后最先进入炎症区域的细胞。中性粒细胞主要来源于骨髓,胞浆内含有大量既不嗜碱也不嗜酸的中性细颗粒。这些颗粒多是溶酶体,与细胞的吞噬和消化功能有关。中性粒细胞对入侵细菌的吞噬过程主要包括趋化作用、粘连、附着、摄入和消化作用。白细胞寿命短,一般只活几天,死亡后变成脓细胞,崩解后释放出溶细胞酶可使受损组织溶解形成脓汁。临床上慢性子宫内膜炎经常转为慢性脓性子官内膜炎

就是白细胞崩解释放出溶细胞酶所致。中性粒细胞增高,提示体内局部炎症的发展过程。淋巴细胞是一种免疫活性细胞,不具有吞噬功能,主要产生机体内的抗体物质。本次检测的患子宫内膜炎奶牛,淋巴细胞绝对值没有明显变化,但其所占比例极显著降低。通过血常规检测和子宫分泌物分离发现,本次采集的奶牛子宫内膜炎样本以细菌感染为主,检测到细菌主要为条件性致病菌,这反映了奶牛产后抵抗力和免疫力下降,条件性致病菌引起子宫内膜炎的现象。

本次共分离出 15 种 (54 株) 细菌,主要为一些条件性致病菌。从革兰氏染色情况来看,本次采集的奶牛子宫内膜炎样品以革兰氏阳性细菌为主 (53.7%),细菌形态上多以杆菌为主,感染方式上以混合感染为主 (71.9%),该奶牛场的子宫内膜炎主要是由大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、奥斯陆莫拉菌和蜡样芽孢杆菌引起。前人研究表明,奶牛的子宫内膜炎以混合感染为主,这与本研究结果一致。各种细菌之间的比例已有文献的报道不尽相同,甘肃某牛场分离出来的病原菌以大肠杆菌为主^[15],河南平顶山分离出的主要病原菌为蜡样芽孢杆菌^[16],广西 2 个大型牛场奶牛子宫内膜炎的主要致病菌为金黄色葡萄球菌、链球菌等细菌^[17]。本研究未检测到病毒等其他病原微生物,可能是其他病原不存在或者样本量比较少,或是受季节、环境和试验条件影

响,还需要大量的试验数据验证。

参考文献:

- [1] Margi S. Laboratory procedures for veterinary technicians [M]. Canada: Mosby, 2007: 5.
- [2] 熊年年, 陈亚宁, 周君, 等. 皖东黄牛部分血液生理生化指标的测定[J]. 安徽科技学院学报, 2014, 28(1): 19-22.
- [3] 麻延峰, 傅春泉, 王宏艳, 等. 金华地区奶牛子宫内膜炎的血常规变化研究[J]. 中国奶牛, 2007(4): 29-32.
- [4] 李德军. 奶牛隐性核临床型子宫内膜炎病理机制研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2010.
- [5] 沈辰峰, 陈世军, 喻昌盛, 等. 幼犬消化不良病例诊治[J]. 现代农业科技, 2012(20): 306-307, 309.
- [6] 温立斌, 何孔旺, 杨汉春, 等. 类圆环病毒因子 P1 感染对猪外周血 T 淋巴细胞含量和增殖活性的影响[J]. 华北农学报, 2009, 24(增刊): 1-4.
- [7] 莫慧诚. 不同配方药物治疗奶牛产后子宫内膜炎效果研究[J]. 现代农业科技, 2013(8): 251-252.
- [8] 欧肇林, 黄文忠, 梁山, 等. 奶牛子宫内膜炎病原分离鉴定及不同治疗试验比较[J]. 现代农业科技, 2010(20): 312, 317.
- [9] 周浩, 王彬, 丁光明, 等. 反刍动物源性的乳杆菌的分离鉴定[J]. 天津农业科学, 2015, 21(3): 66-70.
- [10] 周浩, 王彬, 丁光明, 等. 荷斯坦奶牛粪便中双歧杆菌的分离鉴定与耐药性分析[J]. 天津农业科学, 2015, 21(1): 37-40.
- [11] 张彬, 韩志霞, 马金玉, 等. 河南省部分地区鸡大肠杆菌的分离鉴定及耐药性研究[J]. 河南农业科学, 2015, 44(2): 127-131.
- [12] 张华, 侯绍华. 血常规检查在犬猫疾病诊断中的应用[J]. 中国动物检疫, 2009, 26(3): 55-56.
- [13] 吴俊, 杜友卫. 血常规在宠物临床上的意义[J]. 畜牧与饲料科学, 2011, 32(11): 106-107.
- [14] 陈宏梁. 犬的血常规检查与临床治疗意义[J]. 浙江畜牧兽医, 2011(3): 33-34.
- [15] 王孝武, 王旭荣, 杨志强, 等. 甘肃某牛场奶牛子宫内膜炎病原菌的分离鉴定及其耐药性分析[J]. 西北农业学报, 2014, 23(6): 16-21.
- [16] 胡文举, 宋艳画, 秦佳辰, 等. 奶牛子宫内膜炎主要致病菌的分离鉴定及药敏试验[J]. 动物医学进展, 2014, 35(5): 117-123.
- [17] 谭春萍, 陆风, 黄福标, 等. 广西奶牛子宫内膜炎致病菌的分离鉴定、耐药性分析及致病性试验[J]. 中国奶牛, 2014(5): 24-27.

(上接第 136 页)

- 酵豆粕和晶体氨基酸替代鱼粉的研究[J]. 南方水产, 2009, 5(2): 28-33.
- [3] 李惠, 黄峰, 胡兵. 发酵豆粕替代鱼粉对斑点叉尾鲷生长和饲料表观消化率的影响[J]. 淡水渔业, 2007(5): 41-44.
- [4] 冷向军, 王文龙, 李小勤. 发酵豆粕部分替代鱼粉对凡纳滨对虾的影响[J]. 粮食与饲料工业, 2007(3): 40-41.
- [5] 罗智, 刘永坚, 麦康森, 等. 石斑鱼配合饲料中发酵豆粕和豆粕部分替代白鱼粉的研究[J]. 水产学报, 2004, 28(2): 175-181.
- [6] 刘兴旺, 王华朗, 张海涛, 等. 豆粕和发酵豆粕替代鱼粉对卵形鲳鲷摄食生长的影响[J]. 中国饲料, 2010(18): 27-29, 36.
- [7] 冯占雨. 发酵豆粕替代鱼粉对断奶仔猪生产和健康的影响[J]. 养猪, 2010(5): 17-19.
- [8] 张吉鹃. 大豆肽蛋白饲料的营养特性及其作用机制[J]. 江西畜牧兽医, 2009(6): 25-27.
- [9] 于长青, 张日俊. 新型绿色饲料添加剂——大豆生物活性肽[J]. 饲料工业, 2005(2): 56-59.
- [10] 王秉栋. 动物性食品卫生理化检验手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2003.
- [11] 刘海燕, 秦贵信, 于维, 等. 发酵豆粕对仔猪生长性能、血液生化和抗氧化指标的影响[J]. 中国饲料, 2010(17): 19-21.
- [12] 闻爱友, 柳卫国, 何邦国, 等. 发酵豆粕对早期断奶仔猪生长、肠道微生物菌群及腹泻的影响[J]. 安徽科技学院学报, 2009(5): 1-6.
- [13] 李绍章, 张巍, 魏金涛, 等. 发酵豆粕部分替代鱼粉乳清粉对断奶仔猪生产性能的影响[J]. 饲料广角, 2008(14): 27-29.
- [14] 李绍章, 刘春雪, 杨雪海, 等. 无鱼粉高效仔猪饲料配方研究[J]. 饲料工业, 2006, 27(21): 23-26.
- [15] 李丹, 江连洲, 姜巍, 等. 大豆肽对白羽肉鸡生产性能及胴体品质的影响[J]. 饲料研究, 2009(2): 31-34.