

文章编号: 1001-411X (2002) 04-0075-03

奶山羊实验性乳房炎病理模型

刘涤洁, 石伟, 庄伟东, 冯淇辉, 陈杖榴

(华南农业大学兽医学院, 广东 广州 510642)

摘要: 通过在健康奶山羊一侧乳区内接种 1 mL (10^6 cfu/mL) 金黄色葡萄球菌悬液复制乳房炎病理模型, 其模型指标有: 临床症状、体温变化、乳中体细胞数测定、乳牛乳腺炎电子检测仪检测、病原菌分离培养及病理组织学变化。结果表明按上述方法乳房内接种金黄色葡萄球菌可复制出典型的奶山羊急性乳房炎病理模型。

关键词: 金黄色葡萄球菌; 乳房炎; 病理模型; 奶山羊

中图分类号: S852.2

文献标识码: A

乳房炎是一种危害性很大的疾病。它降低奶产量, 影响食品卫生, 并造成了饲料的浪费以及药费的增加, 给乳业生产带来巨大的损失^[1]。乳房炎的发生是由多种非特定的病原微生物引起的, 据报道其病原有细菌、支原体、真菌、病毒等, 多达 80 种, 80%~90% 的细菌性病例是由葡萄球菌和链球菌感染所致。在葡萄球菌属中, 引起乳房炎的主要原因是金黄色葡萄球菌, 其所致乳房炎多见于泌乳高产期, 常为慢性, 也可是急性^[2~4]。本实验研究的目的是复制金黄色葡萄球菌感染奶山羊乳房炎的病理模型, 为进一步进行药物在疾病动物的药动学研究及评价药物的疗效提供试验模型基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

15 头健康泌乳期奶山羊, 年龄 2.5~3.5 岁, 体质量 (36.47 ± 1.99) kg, 购自广东省丰顺县养殖户, 经检查无乳房炎, 奶山羊每天挤奶 1 次, 白天放牧, 晚上圈内饲养并补饲, 自由饮水。动物购买后观察 1 周再进行实验。

1.2 菌种

金黄色葡萄球菌(简称金葡菌, 以下同), 编号 28001, 由中国兽药监察所提供的, 经小白鼠复壮后由第一军医大学制作冻干菌保存。

1.3 试剂

普通肉汤, Baird-Parker 培养基(以下简称 B-P 培养基), 亚碲酸钾、十二烷基磺酸钠、氢氧化钠、溴甲酚紫、氯化钠均为分析纯。

1.4 加州乳房炎试验(CMT)液配制

称取十二烷基磺酸钠 4 g, 氢氧化钠 1.5 g, 溴甲

酚紫 0.01 g 于 100 mL 容量瓶中, 加水定容至刻度, 室温保存。

1.5 实验动物接种程序

在 B-P 培养基上挑取单个金葡菌菌落于普通肉汤中, 培养 15 h, 菌液浓度达 10^8 cfu/mL , 用无菌生理盐水稀释至 10^6 cfu/mL 。接种前, 尽可能将奶山羊乳房内乳汁挤净, 将注射器针头连接一段长约 10 cm 的无菌塑料管, 插入乳池内, 接种量为 1 mL。

1.6 疾病模型指标

1.6.1 临床检查 根据接种前后奶山羊的精神状况的变化, 观察乳房外观, 触诊乳房热、痛、肿胀、硬度, 测定乳汁 pH 值, 判断乳房炎发生及其类型。

1.6.2 体温监测 接种前及接种后 0、2、4、6、8、10 及 22 h, 分别测直肠体温 1 次。

1.6.3 乳中体细胞数测定 根据 CMT 间接测定乳中体细胞数。在接种前及接种后各时间点取 2 mL 乳样于白色圆盘内, 加入 2 mL CMT 液, 并作同心圆摇动, 使乳汁和试液充分混合, 经 10~30 s, 即在盘底出现不同程度和不同量的粘性或胶性凝集物, 其判定标准为阴性(-), 可疑(±), 弱阳性(+), 阳性(++) 和强阳性(+++) 5 个等级。

1.6.4 乳牛乳腺炎电子检测仪检测 乳腺炎电子检测仪购自山西农业大学, 通过此仪器测定可将乳汁分为最佳健康乳(I)、一般健康乳(II)、次健康乳(III)、疑似乳(T)、隐性轻度(+)、中度(++)、重度(+++) 乳房炎乳等 7 个等级。以 CMT 为对照, 其符合率为 95%, 检测时间为 5 s。

1.6.5 病原分离培养及病理组织学检查 奶山羊按上述方法接种后, 无菌操作取奶样, 根据金葡菌耐盐, 有氧无氧均能发酵甘露醇、产酸的特点, 进行糖

发酵试验和高盐肉汤培养,在B-P培养基和 φ 为5%的兔血平板上培养,革兰氏染色并镜检。在感染后第10d剖杀2只奶山羊,取健康和病变部位的乳腺组织制作病理切片。

2 结果与讨论

2.1 临床症状

15头奶山羊,单侧乳房内接种 10^6 cfu 金葡萄,约3h后乳房即出现明显肿胀并有块状硬物,触压有痛感,温热,24h后乳房肿胀程度下降,但乳头下端皮

肤增厚,仍有痛感。接种后12h乳汁为水样或豆腐渣样,乳内含有大量凝乳块,奶量明显下降,pH升高至7.0~7.2,而未接种侧乳房则未出现上述变化,动物精神状况无大异常,食欲、饮欲无明显改变。

2.2 体温

接种前后奶山羊直肠温度变化见表1。一般在接种后4h起体温开始升高,在6~8h达高峰,而后缓慢下降,22h已基本接近正常。体温变化虽不是乳房炎诊断的特征性指标,但可反映疾病发生时的全身反应。

表1 奶山羊一侧乳房内接种金葡萄后体温(℃)变化

Tab. 1 Body temperature changes (°C) after inoculation of *Staphylococcus aureus*

in one side of udder of lactating goats (n=15)

t/h	动物编号 animal number														$\bar{x} \pm S$	
	5	13	49	10	7	1	4	8	78	722	2	24	188	726	0	
0	39.2	38.3	38.9	39.0	39.0	38.8	39.0	39.0	39.0	38.8	38.6	38.9	38.9	39.1	38.9	38.9±0.07
2	39.7	38.8	39.2	39.2	39.2	39.2	38.9	39.0	39.4	38.9	38.5	39.0	39.0	39.0	39.1	39.1±0.07
4	41.1	39.8	40.2	40.8	40.8	39.9	39.6	40.5	40.5	39.3	39.1	39.2	40.8	40.5	39.3	40.1±0.17
6	41.6	40.7	40.3	41.6	41.6	40.7	40.5	41.2	41.0	40.5	40.3	40.3	41.1	40.9	39.6	40.8±0.13
8	40.3	41.1	40.5	41.5	41.5	40.1	40.7	41.0	41.1	40.8	40.8	40.5	40.7	40.1	39.9	40.7±0.11
10	41.1	40.7	40.6	40.8	40.8	39.2	40.7	39.9	40.8	40.5	39.9	40.6	39.9	41.3	39.3	40.3±0.62
12	40.4	40.2	39.7	40.4	40.4	39.2	40.7	39.7	41.2	40.3	39.0	40.0	40.0	39.8	39.9	40.0±0.14
22	39.3	40.4	38.8	40.3	40.3	38.9	40.9	38.9	40.8	40.7	38.9	39.2	39.1	38.9	38.6	39.5±0.21

2.3 乳中体细胞数

参照加州乳房炎试验,3h时奶样即为++或+++,盘底沉淀较多且粘稠,呈蓝紫色,旋转圆盘时凝集物成团块状且难以散开,提示细胞数在 8×10^5 ~ 5×10^6 /mL。

CMT测定的原理是病畜患乳房炎时乳汁中体细胞(白细胞、腺上皮细胞、淋巴细胞等)数目增多,乳汁中细胞在阴离子表面活性剂和碱性药物作用下,脂类物质乳化,细胞被破坏,细胞蛋白随之形成灰白或灰黄色粘性沉淀或胶状团块,乳汁中细胞含量愈多,粘性或胶状物质形成愈多。此外,乳房炎发生时乳汁pH升高,pH>6.8,溴甲酚紫呈紫蓝色或深紫红色^[4]。

2.4 乳牛乳腺炎电子检测仪检测

乳牛乳腺炎电子检测仪的原理是乳腺炎时乳中氯离子含量升高,电极电位发生改变,导电率亦改变。检查3~22h的乳汁,仪器指示为中度感染。

2.5 病原分离培养及病理组织学变化

感染乳区的乳样,在B-P培养基生长为黑色菌落,B-P培养基为金葡萄的选择培养基,细菌可长成典型的黑色菌落,其他杂菌均不生长,在高盐肉汤中

生长,发酵葡萄糖、蔗糖、乳糖、甘露醇,在 φ 为5%的兔血平板上可产生典型的溶血环,革兰氏染色镜检可见革兰氏阳性球菌,具有金黄色葡萄球菌的典型特征。

病理组织学检查发现,与健康乳区相比,感染侧乳腺腺泡腔内充满均质且布有空泡的渗出物(脂肪),混有脱落上皮和炎性细胞,间质水肿,淋巴细胞浸润,部分腺泡上皮变性脱落,上皮萎缩,间质组织增生,见图1、2。



图1 腺泡腔内充满大量中性粒细胞(H. E. 5×40)

Fig. 1 Numerous neutrophils filling acinar cavities

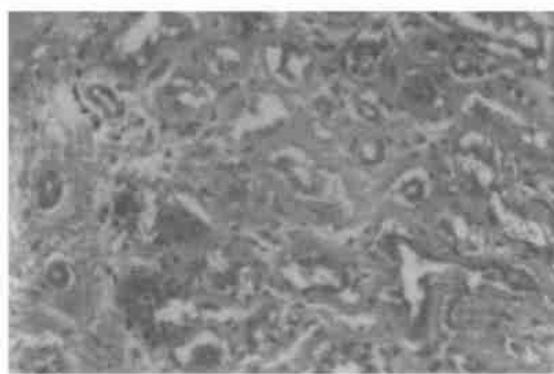


图2 部分腺泡上皮细胞变性、间质水肿、增生(H.E. 5×10)

Fig. 2 Epithelial degeneration in some acini, mesenchymal edema and hyperplasia

综上所述,按每一乳管内接种金黄色葡萄球菌悬液1 mL(10^6 cfu/mL),可复制奶山羊乳房炎的典型

病理模型.

致谢:本实验在病理切片制作和显微摄影工作中得到华南农业大学兽医学院病理教研室和华南农业大学生命科学院电镜室的大力帮助,在此表示衷心感谢!

参考文献:

- [1] 丁恩雨. 葡萄球菌、链球菌与奶牛乳房炎的关系及其对抗菌素敏感性的研究[J]. 中国兽医科技, 1992, 22(12): 11—14.
- [2] NICKERSON S C. Preventing new *Staphylococcus aureus* mastitis infections[J]. Vet Med, 1993, 88: 368—374.
- [3] JAMES S. The control, treatment and prevention of the various types of bovine mastitis[J]. Vet Med, 1993, 88: 571—580.
- [4] 陈家璞, 王志, 王建辰, 等. 乳牛疾病学[M]. 北京:农业出版社, 1992. 283—323.

Study on Mastitis Model Infected Experimentally with *Staphylococcus aureus* in Lactating Milky Goats

LIU Di-jie, SHI Wei, ZHUANG Wei-dong, FENG Qi-hui (FUNG Ki-fai), CHEN Zhang-liu
(College of Veterinary Medicine, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: *Staphylococcus aureus* [1 mL 10^6 cfu (colony forming unit)/mL] suspension was infused into one side of udder chamber of the healthy lactating milky goats. Mastitis model was identified and determined by such indices as clinical symptoms, body temperature, somatic cell count in milk, electronic mastitis detector, pathogen isolation and cultivation, and histopathological changes. The results showed that acute mastitis model can be duplicated by inoculating the above amount of bacteria in one side of udder chamber of lactating goats.

Key words: *Staphylococcus aureus*; mastitis; pathological model; lactating milky goats

【责任编辑 柴 焰】