

团体标准

T/ NAIA×××-××××

牛子宫内膜炎诊断与防治技术规程

Technical regulations for diagnosis, prevention and treatment of
bovine endometritis

(征求意见稿)

××××-××-××发布

××××-××-××实施

宁夏化学分析测试协会 发布

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

专利免责声明：本文件的某些内容可能涉及专利，本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由宁夏回族自治区科技厅提出。

本文件由宁夏回族自治区化工学会归口。

本文件起草单位：宁夏农林科学院动物科学研究所、宁夏回族自治区动物疾病预防控制中心、宁夏大学、宁夏回族自治区兽药饲料监察所、宁夏回族自治区畜牧工作站、。

本文件起草人：王建东、于有利、郭亚男、梁小军、郭延生、岳康、康晓冬、侯鹏霞、高海慧、张久盘、施安、张坤。

牛子宫内膜炎诊断与防治技术规程

1 范围

本文件规定了牛子宫内膜炎诊断与防治技术的术语和定义、诊断、预防和治疗。

本文件适用于规模化牛场子宫内膜炎的防治。其他牛场参照执行。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法。

GB/T 39759 实验动物 术语。

GB/T 14926.42 实验动物 细菌学检测 标本采集。

GB/T 14926.43 实验动物 细菌学检测 染色法、培养基和试剂。

NY/T 3234 PCR检测方法。

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 牛子宫内膜炎 Bovine endometritis

是指母牛分娩时或产后由于致病性病原微生物感染或胎衣不下、难产等产科疾病或环境因素、围产期营养调控水平等因素引起的子宫黏膜炎症。

3.2 MHA 培养基 Mueller-Hinton Agar

是一种广泛用于细菌抗菌敏感性测试 (AST) 的培养基。

3.3 麦康凯培养基 MacConkey Agar Medium

具有中等强度选择性，主要抑制革兰阳性菌，用于分离鉴定细菌的培养基。

3.4 伊红美蓝培养基 Eosin Methylene Blue Agar

一般用于检测大肠杆菌。

3.5 KF 链球菌培养基 KF Streptocococcus Agar

主要用于多种病原菌的分离和培养。

4 诊断

4.1 流行病学

牛子宫内膜炎主要是病原感染、饲养管理、环境卫生、机械性损伤、营养因素、操作技术等可诱发牛子宫内膜炎的发生。（发病原因见附录 A）

4.1.1 感染途径

病原菌侵入子宫的途径可分为上行性感染(阴道感染)和下行性感染(血源性或淋巴源性感染)两种，但以上行性感染较为常见。

4.1.2 易感性群体

分娩过程中或者分娩之后的牛易感。

4.2 临床症状

临床症状分为四种（具体见附件A）：急性化脓性子宫内膜炎；黏液脓性子宫内膜炎；隐性子宫内膜炎；慢性脓性子宫内膜炎。

4.3 病理变化

切开子宫时，可见子宫腔内积有混浊、数量不等、粘稠而呈灰白色渗出物，或混有血液而呈褐红色的渗出物，子宫内膜有时出血和水肿，呈弥漫性或局灶性潮红肿胀，其中有散在性出血点和出血斑；重症有时可见子宫阜充血（见附录C）。镜下：初期黏膜毛细血管充血和渗出，黏膜浅层的子宫腺管周围或腺腔内有明显的中性粒细胞、淋巴细胞、巨噬细胞的浸润。黏膜上皮和部分浅层子宫腺管上皮细胞，发生变性坏死脱落，可有红细胞和纤维素渗出(假膜形成)（见附录C）

4.4 子宫内膜炎诊断方法：

4.4.1 直肠检查

通过触摸直肠，子宫角增大，子宫壁增厚，子宫呈面团样感觉，子宫收缩反应减弱，子宫体有波动感。慢性子宫内膜炎的子宫壁增厚，弹性减弱，厚薄不均匀。

4.4.2 阴道检查

进行阴道触诊检查前，先将牛外阴清洗干净，触诊者手带干净手套，涂满润滑剂，后伸入牛阴道，至少停留30 s以上，对侧面、腹面和背面阴道壁至宫颈口进行触诊，退出时对阴道内的性状和粘液量进行检查。子宫颈肿胀充血，有触痛，则为急性子宫内膜炎；子宫颈松弛，黏膜充血，宫颈口张开，有白色、灰白色或淡黄色的黏稠渗出物流出，则为慢性子宫内膜炎。

4.4.3 B型超声波诊断

通过将探头伸入直肠对子宫进行超声探查，对子宫内膜厚度，子宫角直径，卵巢等进行观察，判断子宫内是否有积液及积液量。子宫发生炎症时，宫腔膨胀，轮廓不清并伴有部分回声，存在片状物。

4.4.4 实验室诊断

4.4.4.1 样本采集

采集子宫分泌物的用具严格消毒。先用温水清洗患子宫内膜炎的牛外阴部位，再用0.1%新洁尔灭溶液消毒，然后按直肠把握法把输精管送入子宫，用一次性注射器通过输精管抽取子宫分泌物1~2 mL，立即注入备好的无菌瓶内，封盖，标记，冷藏保存。如果24 h内不能送达实验室，-20℃保存待用。样品解冻时，置于38℃~40℃水浴解冻。

4.4.4.2 分离培养

绵羊血琼脂培养基、MHA培养基、麦康凯培养基、伊红美蓝培养基和KF链球菌培养基，实验用水应符合GB/T6682规定。

取子宫分泌物，涂于5%绵羊血琼脂培养基上，并对其进行划线，放入37℃恒温箱培养18h~24 h后。观察菌落的状态，根据菌落的形态、大小、颜色等进行大致分类，然后在显微镜下观察细菌的形态、革兰氏染色特点仔细进行分类。将挑选出来的细菌进一步纯培养。纯化培养物作革兰氏染色（见附录D）、镜检，根据不同的培养特征、染色形态特征和其生化鉴定（见附录E）来综合判定。

4.4.4.3 PCR 鉴别诊断

4.5 结果判定

符合4.1、4.2、4.3的特征判断为疑似病例。

同时符合4.4的特征判断为确诊病例。

5 预防和治疗

5.1 预防

预防性清宫：在母牛产后，无论是否发病，提前用药物灌注、肌注，去干预或预防子宫内膜炎的发生，预防时机在产后前三天为宜。

治疗性清宫：恶露的清洗，用0.1%的高锰酸钾溶液，灌注抗生素，如链霉素、林可霉素等，注射缩宫素，通过促进子宫的收缩，来促进子宫恶露的排除。

综合预防：日常加强饲养管理，遵守操作规程，定期消毒，定期监测。避免从病发较高的地区引进母牛，且牛群引进后应隔离观察并采取应激预防措施，确保无病后方可混群。加强母牛产前产后护理，尤其注意产犊季节。合理控制温、湿度、规范工作人员的操作、围产前期科学饲养、一胎双犊的预防、规范接产、做好产后保健、以及合理利用智能设备。

5.2 治疗

5.2.1 西药治疗

主要使用抗生素药物，结合药敏试验进行治疗，使用剂量参照说明书。

5.2.2 中药治疗

可使用生化汤汤煎剂（组方：当归、川芎、白芍、炮姜、蒲公英、金银花、连翘、甘草）或者健宫散等，疗效较好。使用剂量参照说明书。

5.2.3 中西药联合用药治疗

西药选择硫酸庆大霉素注射液，中药选择生化汤汤煎剂，使用剂量参照说明书。

5.2.4 其他疗法

子宫给药治疗，激素治疗，微生物制剂治疗等。

附录 A

(规范性附录)

发病原因

A.1 病原微生物感染

大部分为化脓杆菌、葡萄球菌和链球菌所引起其次为大肠杆菌、胎儿滴虫、胎儿弯曲菌、坏死杆菌和恶性水肿杆菌引起；结核杆菌、布氏杆菌及马副伤寒流产杆菌也可引起子宫内膜炎。另外，一些真菌、病毒、支原体、霉形体和寄生虫也会引起牛子宫内膜炎。

A.2 继发因素

其他疾病继发的产科疾病，例如难产、胎衣不下、阴道炎、子宫蓄脓、卵巢囊肿、阴道脱出；人为的引产、助产、子宫检查和剥离胎衣的过程中，容易造成牛产道的机械性损伤感染，引起子宫内膜炎；频繁的人工输精或灌注药物会损伤子宫黏膜，子宫防御屏障被破坏，诱发子宫受到感染。

A.3 环境因素

温度过高、湿度大、卫生条件差、空气质量不佳。

A.4 营养和激素因素

围产期饲养管理不当、饲料品质不佳造成母牛营养代谢失调，如饲料中缺乏维生素A和微量元素硒导致子宫内膜细胞角质化增生；摄入的糖原、钙、磷不足诱发胎衣不下，导致子宫内膜炎。

A.5 人工操作因素

工作人员未经过科学的培训，操作过程中未按规定操作，没有严格消毒，操作粗鲁，造成奶牛子宫损伤以及污染，促使了病原微生物入侵。

临床症状

A.6 急性化脓性子宫内膜炎

病牛表现精神沉郁，体温升高、食欲减退、不时努责，从阴门中排出灰白色、含有絮状或脓性的分泌物，卧下时排出量较多。

A.7 黏液脓性子宫内膜炎

病牛精神沉郁，体温略有升高，食欲减退，阴道检查时可见黏膜充血、肿胀，从阴门不断排出少量白色脓性、混浊的分泌物，并污染病牛的尾根及后躯。

A.8 隐性子宫内膜炎

病牛无明显症状，性周期、发情和排卵均正常，但屡配不孕，有的病牛虽已受孕但易发生流产。发情时从阴道中流出较多的稍混浊的黏液。

A.9 慢性脓性子宫内膜炎

病牛往往表现全身症状。病牛性周期紊乱或不发情，有时伴有贫血和消瘦症状，常见到从病牛阴门中排出脓性分泌物，尤其在卧下时排出较多，并常常在尾根及后躯形成结痂。

附录 B

（规范性附录）

四种培养基的配制

B.1 伊红美蓝琼脂培养基

蛋白胨10.0 g，乳糖10.0 g，磷酸氢二钾2.0 g，琼脂15.0 g，伊红0.4 g，美蓝0.065 g，溶于1000 mL蒸馏水中，121℃高压灭菌15 min，倾入无菌平皿，4℃保存。

B.2 麦康凯培养基

蛋白胨20.0 g，牛胆盐5.0 g，氯化钠5.0 g，琼脂14.0 g，乳糖10.0 g，中性红0.03 g，加入蒸馏水或去离子水1 L，将上述成分混合，加热溶解，校正pH，加入琼脂，煮沸溶化后再加入中性红溶液，摇匀，115℃灭菌20 min，待冷至50～55℃时倾注平皿。凝固后置4℃冰箱保存，一周内使用。

B.3 KF链球菌培养基

蛋白胨10.0 g，酵母粉10.0 g，甘油磷酸钠10.0 g，氯化钠5.0 g，麦芽糖20.0 g，乳糖1.0 g，叠氮钠0.4 g，琼脂13.0 g，溴甲酚紫0.015 g，加热溶解于1000 mL蒸馏水中，121℃高压15 min，冷却至50～60℃时，加入无菌1%TTC溶液10 mL，混匀，倾入无菌平皿，备用。

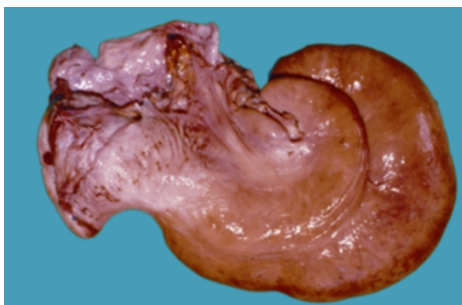
B.4 MHA培养基

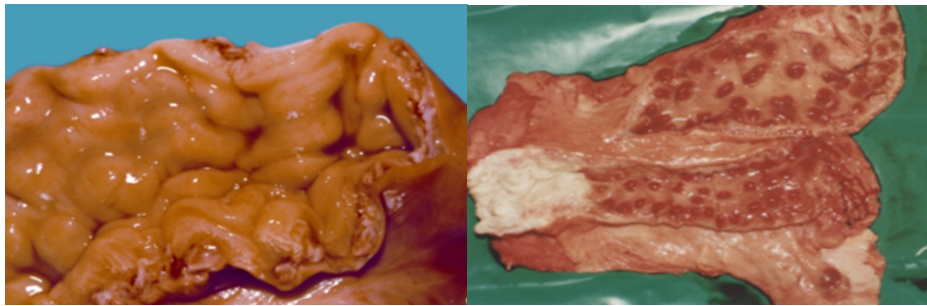
牛肉粉6.0 g，可溶性淀粉1.5 g，酸水解酪蛋白17.5 g，琼脂17.0 g，称取本品加热溶解于1000 mL蒸馏水中，121℃高压灭菌15 min，待冷至50℃，倾入无菌平皿，备用。

附录 C

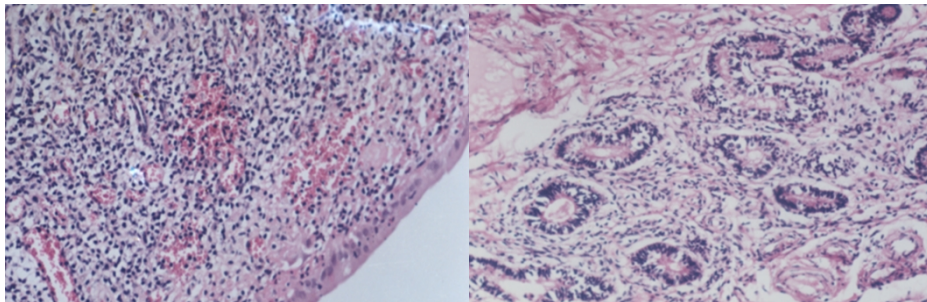
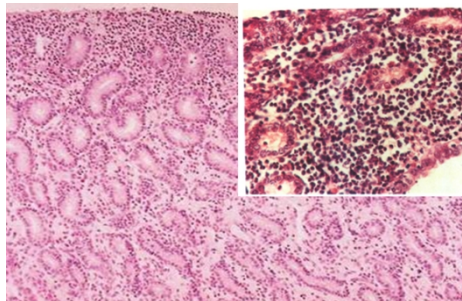
病理剖检子宫形态

C.1 病理子宫剖检眼观形态





C.2 局部病理子宫组织镜下结构



附录 D

(规范性附录)

D.1 革兰氏染色：

- 1) 涂片
- 2) 晾干
- 3) 固定 手执载玻片一端，菌膜朝上，通过火焰2-3次，固定。
- 4) 结晶紫染色 将载玻片置于废液缸上，加适量（以盖满细菌涂面）的染液染色1 min。
- 5) 水洗 倾去染色液，用水小心冲洗。
- 6) 媒染 滴加卢哥氏碘液，媒染1 min。

- 7) 水洗 用水洗去碘液。
- 8) 脱色 倾斜载玻片，连续滴加95%乙醇脱色 20~25 s，至流出液无色，立即水洗。
- 9) 复染 滴加石炭酸复红染5 min。
- 10) 水洗 用水洗去染色液。
- 11) 晾干 将染好的涂片放在空气中晾干或者用吸水纸吸干。
- 12) 镜检 先低倍，后高倍，最后用油镜观察。

附 录 E

（规范性附录）

PCR 诊断方法

E.1 取4.4.4.2培养物2 mL，12000 r/min 离心10 min，用细菌基因组DNA提取试剂盒对沉淀物进行基因组DNA的提取。以菌液DNA为模板，采用通用引物（16S rRNA），对细菌16S rRNA基因进行PCR扩增，将扩增产物进行测序。引物序列如下：

16SF 5, -AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3 ,

16SR 5, -ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT-3 ,

E.2 50 μ L反应体系

反应条件如下: PCR反应体系为50 μ L体系: 模板2 μ L，27F、1492R各1 μ L（20 μ mol/L），2 $\times$ Taq PCR Mix 25 μ L，ddH₂O 21 μ L；16S rRNA PCR反应条件为：95℃预变性5 min，94℃变性50 s，57℃退火1 min，72℃延伸90 s，30个循环，72℃终延伸10 min，4℃结束反应。

PCR扩增完成后，扩增的基因产物进行凝胶电泳试验，将PCR扩增产物进行1%凝胶电泳，反应条件：120V，30 min。将带有目的条带的PCR扩增产物进行测序。

E.3 测序后的序列结果通过NCBI进行BLAST序列比对，从而确定菌种。

附 录 F

附录 F

（规范性附录）

（1）革兰氏染色试验：细菌涂片用革兰氏染色液进行染色后，显微镜下10 $\times$ 100倍观察，革兰氏阳性细菌呈蓝紫色，革兰氏阴性细菌呈粉红色。

（2）溶血试验：用划线法将待检菌落接种于血液平板，置37℃培养18~24 h后观察，在菌落周围形成不透明的绿色轮晕为 α 型溶血；菌落周围形成无色透明的溶血环为 β 型溶血；菌落周围不产生溶血现象的为 γ 型溶血。

（3）触酶试验：采用玻片法，在玻片上滴1滴无菌生理盐水，用接种环挑取细菌在生理盐水中混匀，然后加1滴3%过氧化氢后进行观察，有气泡产生者为阳性（+）。做过氧化氢酶试验不宜用血琼脂平板上的菌落，因红细胞含有触酶，会出现假阳性反应，最好用营养琼脂或适宜培养基。做

触酶试验必须用18~24 h的培养物，陈旧培养物可能失去触酶活性，而出现假阴性。试验用双氧水必须新鲜配制，否则也易导致假阴性。

(4) 血浆凝固酶试验：采用玻片法，于玻片上滴加1滴生理盐水，挑取菌落浮于生理盐水中，然后滴加1滴兔血浆，混匀，若细菌凝集成块为阳性(+)。

(5) 三糖铁试验：用接种环挑取少量细菌，接种时先涂布斜面，后穿刺底层，置37℃恒温箱培养24 h，观察其反应情况。产酸(+)培养基变黄；产酸产气($\oplus$)培养基变黄有气泡；培养基变红(Δ)；硫化氢阳性或阴性反应(+/-)。

(6) CAMP试验：在血液平板上先接种一条金黄色葡萄球菌的划线，与此线垂直接种被检的细菌，在有金黄色葡萄球菌产物存在的情况下，可产生明显溶血现象的为阳性(+)。

(7) 6.5%NaCl试验：用划线法将菌种接种到NaCl平板琼脂培养基上，置37℃恒温培养18~24 h后观察结果，有细菌生长的为阳性反应(+)。

(8) 硫化氢试验：采用醋酸铅琼脂法，在融化的琼脂内加入硫代硫酸钠溶液(先煮沸灭菌)，待凉至60℃，再加入醋酸铅溶液，混合均匀，无菌分装灭菌试管三指高，立即浸入冷水，使冷凝成琼脂高层。用接种针挑取培养物，沿试管壁作穿刺接种，37℃培养1~2 d后观察，培养基变黑色为阳性(+)。

(9) 尿素酶试验：将待检细菌接种到尿素酶生化管中，同时作划线及接种穿刺，37℃恒温培养24h后观察结果，培养基从黄色变红色时为阳性(+)；继续观察4天仍不变色者为阴性(-)。

(10) 柠檬酸盐试验：将少量被检菌种接种到柠檬酸盐固体斜面培养基上，37℃恒温培养2~4 d，能利用柠檬酸盐的细菌表现为有细菌生长，培养基变为蓝色者为阳性(+)；不能利用柠檬酸盐的细菌不能生长，培养基不变色为阴性(-)。

(11) 吲哚(靛基质)试验：某些细菌有色氨酸酶，能分解蛋白胨中的色氨酸，生成靛基质为无色，加入对二甲基氨基苯甲醛试剂，可形成红色的玫瑰靛基质。将被检菌接种于半固体琼脂，37℃厌氧环境培养24~48 h，沿管壁滴加欧氏试剂0.5 mL，覆盖于无症状物的表面。结果判定：阳性在交界面出现红色，阴性在交界面仍呈黄色。

(12) 甲基红(M.R)试验：接种细菌于生化管培养液(含葡萄糖、K₂HPO₄、蛋白胨)中，37℃恒温培养2~7 d，于培养物中加入几滴甲基红试剂，变红色者为阳性反应(+)。

(13) 维培(V-P)试验：用Barritt's试剂法，接种细菌于培养液(含葡萄糖、K₂HPO₄、蛋白胨)中，37℃恒温培养2~7 d，取1mL培养物，加入0.5 mL 6%甲萘酚酒精溶液和0.5 mL 6%KOH溶液，混匀，产生粉红色的为阳性(+)；置室温过夜，次日不变者为阴性(-)。

(14) 糖(醇)发酵试验：各种细菌含有不同发酵糖(醇)类的酶，所以分解糖(醇)类的能力亦异。将纯种被检菌接种在糖发酵生化管中，37℃厌氧环境培养数小时至2WK。结果判定：产酸呈黄色，产气有小气泡，阴性无变化。

(15) 明胶液化试验：明胶是一种动物蛋白质，能在20℃时凝固，高于20℃时则液化。某些菌能产生明胶酶，可使明胶分解成为多肽和氨基酸而不再凝固。取明胶培养基2管，1管穿刺接种目的菌，另1管不接种细菌作为对照，同置于37℃厌氧环境培养24~48 h，取出，同放于4℃冰箱中30 min，结果判定：阳性，明胶呈液态不凝固，并观察液化后的特殊形状，如漏斗状等；阴性，明胶不呈液态，仍凝固。

(16) 硝酸盐还原试验：某些细菌有硝酸盐还原酶，能还原硝酸盐生成亚硝酸盐。亚硝酸盐与酸作用形成亚硝酸，亚硝酸再与对氨基苯磺、酸作用，生成对重氮苯磺酸，此对重氮苯磺酸与 α -萘胺结合，生成红色的 α -萘胺偶氮苯磺酸。取硝酸盐培养基2管，1管接种被检菌，另1管不接种被检菌作为对照，同时放于37℃厌氧环境培养 24~48 h，取培养物及对照各1 mL，分别加对氨基苯磺酸及 α -萘胺溶液各3~5滴，混匀，结果判定：阳性呈红色，阴性无变化。