

牛旁检测诊断产后初期奶牛亚临床酮病研究

张志刚¹, 刘国文¹, 李小兵¹, 孙国权^{1,2}, 王哲¹, 郭昌明¹, 高瑞峰³

(¹ 吉林大学畜牧兽医学院, 长春 130062; ² 内蒙古民族大学动物科技学院, 通辽 028042;

³ 吉林农业大学动物科技学院, 长春 130118)

摘要: 酮病是奶牛的一种重要的营养代谢病。采用酮粉法、尿液分析试纸条、乳汁分析试纸条、试剂盒分别对乳酮、尿酮和血酮含量进行检测, 以血清 β -羟丁酸含量 $1200\mu\text{mol/L}$ 作为健康奶牛和亚临床酮病奶牛的诊断标准。乳汁检测试纸条和尿液分析试纸条的诊断标准分别为 $200\mu\text{mol/L}$ 和 15mg/dl ($1470\mu\text{mol/L}$)。酮病牛血清 β -羟丁酸和葡萄糖的浓度分别为 $726\pm 43\mu\text{mol/L}$ 、 $3.42\pm 0.05\text{mmol/L}$, 健康牛血清 β -羟丁酸和葡萄糖的浓度分别为 $2563\pm 238\mu\text{mol/L}$ 、 $2.78\pm 0.07\text{mmol/L}$, 差异显著 ($P<0.05$)。乳汁分析试纸条的敏感性和特异性分别为 67% 和 92%, 尿液分析试纸条的敏感性和特异性分别为 57% 和 85%, 酮粉的敏感性和特异性的敏感性和特异性分别为 60% 和 94%。使用乳汁分析试纸条牛旁检测是一种有效的奶牛亚临床酮病诊断方法。

关键词: 奶牛; 亚临床酮病; 酮体; 牛旁检测

中图分类号: S854.4 文献标识码: A

Research of Cowside Tests for the Detection of Subclinical Ketosis in Cows during Early Lactation Period

Zhang Zhigang¹, Liu Guowen¹, Li Xiaobing¹, Sun Guoquan^{1,2}, Wang Zhe¹,

Guo Changming¹, Gao Ruifeng³

(¹College of Animal Science and Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130062;

²College of Animal Science and Technology, Inner Mongolia Nationality University, Tongliao 028042;

³College of Animal Science and Technology, Jilin Agricultural University, Changchun 130118)

Abstract: Ketosis is a common nutrition metabolic disease of dairy cows. Using ketone powder, urine analysis strip, milk analysis strip, kit detected the ketone concentration in milk and serum of dairy cows respectively, serum β -hydroxybutyrate $1200\mu\text{mol/L}$ as the threshold for normal cows and subclinical ketosis. Urine analysis strip and milk analysis strip diagnosis standard were $200\mu\text{mol/L}$ and 15mg/dl respectively. Serum β -hydroxybutyrate and glucose concentration of healthy cows were $726\pm 43\mu\text{mol/L}$, $3.42\pm 0.05\text{mmol/L}$ respectively, subclinical ketosis cows were $2563\pm 238\mu\text{mol/L}$, $2.78\pm 0.07\text{mmol/L}$, difference was significant ($P<0.05$). Sensitivity and specificity of milk analysis strip were 67% and 92%, urine analysis strip were 57% and 85%, ketone powder were 60% and 94% respectively. It was an effectual method that cowside test diagnose the dairy cows subclinical ketosis with milk analysis strip.

Key words: dairy cows, subclinical ketosis, ketone, cowside test

第一作者简介: 张志刚, 男, 1981 年出生, 内蒙古和林格尔县人, 博士, 研究方向为兽医临床诊断学。通信地址: 130062 长春市西安大路 5333 号吉林大学畜牧兽医学院临床兽医系。E-mail: zzgsuc@yahoo.com.cn。

通讯作者: 王哲, 男, 1951 年出生, 辽宁清原人, 教授, 博导, 研究方向为动物营养代谢病、生物毒素及重金属检测。现任亚洲兽医内科学会副理事长, 国务院学位委员会兽医专业学位教育指导委员会委员, 主持国家“863”计划项目一项。获省部级科技进步二等奖以上成果 6 项, 主编、参编专著、编著 9 部, 其中《兽医内科学》被国家新闻出版署评为全国优秀图书二等奖。1993 年享受国家特殊津贴, 2000 年获解放军总后勤部科技银星奖, 2002 年获总后勤部优秀科技人才建设伯乐奖。

收稿日期: 2008-04-24, 修回日期: 2008-05-21。

奶牛酮病主要由能量负平衡引起, 产后 2 个月内的奶牛多发。中国奶牛酮病发病率为 15%~30%, 且呈逐年上升趋势。研究表明, 奶牛酮病可降低产奶量, 与围产期奶牛的许多疾病有关, 如胎衣不下、子宫内膜炎、皱胃变位^[1,2]、生产瘫痪等, 影响奶牛的繁育性能^[3]。按是否出现临床症状可将酮病分为临床酮病和亚临床酮病。临床酮病具有典型的临床症状, 如食欲骤减、呼出气体有酮味、产奶量急剧下降或出现神经症状等, 不难做出诊断。亚临床酮病无明显的临床症状, 发病率 10~20 倍于临床酮病, 给奶牛养殖业造成的经济损失尤为巨大。亚临床酮病的诊断主要依靠检测体内酮体含量, 只有对其实施有效的早期诊断, 从而进行合理的防治, 才能减少由此病所导致的巨大损失^[4]。本试验对目前国内外常用乳酮半定量牛旁 (cowside test, CST) 检测一酮粉法以及血清 β -羟丁酸定量检测方法加以研究。

1 材料与方法

1.1 试验时间、地点

本试验于 2007 年 12 月在长春市实习奶牛场取样。

1.2 试验材料

1.2.1 被检奶牛 被检荷斯坦奶牛 85 头, 取自校教学实习牛场, 日粮配给按照围产期奶牛营养需要标准供应。取样牛均为产后 6w 内奶牛, 经产胎次为 1~7w。对初次检出的阳性牛及可疑牛在 3d 后再次取样检测, 最后采集到 115 个样品。

1.2.2 主要试剂与仪器 亚硝基铁氰化钠、无水碳酸钠、硫酸铵, 北京化学试剂公司, 均为分析纯。尿液分析试纸条, 北京东方联鸣有限公司; 乳汁分析试纸条 (ketolac BHB), 日本名古屋 Sanwa Kagaku Kenkyusho 公司。血清 β -羟丁酸检测试剂盒, 英国 RANDOX 公司。血糖测定试剂盒, 北京九强生物技术有限公司。7170A 全自动生化分析仪, 日本 HITACHI 公司。FA1004N 型电子天平, 上海精密科学仪器有限公司。TGL-16C 型台式高速离心机, 上海安亭科学仪器厂。

1.3 试验方法

1.3.1 样品采集 早晨用玻璃试管采集新鲜尿液。每天早晨于饲喂前采集血样, 颈静脉采血, 血样装于不加抗凝剂的 5ml 离心管内, 立即放入冰盒内, 在室温中静置 30min, 3500r/min 离心 20min, 收集血清保存在 -20℃ 待测。在挤奶厅采集新鲜乳样, 盛放于 5ml 离心管中, 放入冰盒保存待检。尿液自然接, 盛放于玻璃试管中, 放入冰盒保存待检。

1.3.2 酮粉 参照郭定宗方法配制酮粉^[5], 亚硝基铁氰化钠 3g, 硫酸铵 100g, 无水碳酸钠 50g。准确称量各试剂分别研细成粉末, 充分混合后干燥保存。操作时取上述粉末少许在载玻片上, 加乳汁数滴, 约 3min 后判读结果。

1.3.3 试纸条 尿液分析试纸条(检测乙酰乙酸)操作方法如下: 用手拿纸末端的塑料部分, 切忌接触试纸测试区, 将试纸条测试区浸入尿样中, 反应 40s 后移开, 在容器的边缘将试纸条上多余的尿液清除掉, 将试纸条测试区与瓶子标签上的比色区相对照, 颜色稳定性差, 要及时判读。乳汁检测使用 Ketolac BHB 试纸条(检测 β -羟丁酸), 用移液器或玻璃棒加牛奶于试纸条的反应垫上, 3min 后甩去多余的乳汁, 将试纸条反应区与瓶子上试纸条包装瓶上的标准比色区对照判读检测结果^[6]。

1.3.4 血液 β -羟丁酸和葡萄糖含量测定 采用 β -羟丁酸检测试剂盒^[7]和葡萄糖测试试剂盒, 分别用日立 7170A 全自动生化分析仪测定。

1.4 亚临床酮病的诊断标准

本次试验中, 血清 β -羟丁酸浓度 >1200 μ mol/L 诊断为亚临床酮病。Ketolac BHB 试纸条的比色区共分 5 个范围, 判读结果分 4 个等级, 见表 1。尿液分析试纸条的比色卡分 6 个色阶, 阴性、微量 (5mg/dl, 490 μ mol/L)、小 (15mg/dl, 1470 μ mol/L)、中等 (40mg/dl, 3920 μ mol/L)、大 (80mg/dl, 7840 μ mol/L)、较大 (160mg/dl, 15700 μ mol/L), 本次试验中以 >15mg/dl 为诊断标准。酮粉检测的结果判定根据颜色变化, 无颜色变化即阴性, 变紫色者极为阳性。

表 1 乳汁 β -羟丁酸浓度与判读结果对照表

β -羟丁酸浓度 / (μ mol/L)	判读结果
0-99	正常(-)
100-199	可疑(+/-)
200-499	阳性(+)
500 以上	强阳性(++)

1.5 数据统计分析

经 Microsoft Office Excel 2003 和 SPSS13.0 软件对试验结果统计分析, t 检验。

2 结果与分析

2.1 奶牛血清 β - 羟丁酸和葡萄糖含量

采用血清 β - 羟丁酸浓度 $>1200\mu\text{mol/L}$ 作为诊断标准, 115 个血清样品中亚临床酮病牛采集的样品占 27% (30 个), 国外有学者采用相同的诊断标准报道亚临床酮病在加拿大安大略省的发病率为 16.4%, 在荷兰为 14%^[6]。Geishhauser 等采用血清 β - 羟丁酸 $1400\mu\text{mol/L}$ 诊断围产期奶牛亚临床酮病, 检出率为 12%^[8]。本次试验采集的样品数有限, 这个结果只能作为该牛场产后初期奶牛亚临床酮病发病率的参考, 由于初次检测血清 β - 羟丁酸浓度 $1200\mu\text{mol/L}$ 左右的奶牛在 3d 后又测定了一次, 这样本身就可能过高估计了亚临床酮病的发病率。

健康牛和亚临床酮病牛的血清 β - 羟丁酸和糖的浓度差异显著 ($P<0.05$), 见表 2, 这与 Padilla 等结果基本相近^[9]。

2.2 乳汁分析试纸条、尿液分析试纸条和酮粉检测结果

血液 β - 羟丁酸浓度 $>1200\mu\text{mol/L}$ 作为亚临床酮病的诊断标准, 乳汁分析试纸条、尿液分析试纸条、酮粉 3 种方法检出的阳性结果分别为 27、25、23, 真正的阳性分别为 20、17、18。分析 3 种检测方法各自的敏感性 (真正的阳性样品被检出为阳性的百分率) 和特异性 (真正的阴性结果被检出为阴性的百分率)^[6,10], 见表 3, 乳汁分析试纸条检出的敏感性 67%, 特异性 92%; 酮粉检测的特异性最高, 为 94%, 但敏感性较乳汁分析试纸条低; 尿液分析试纸条的敏感性和特异性最低 (57% 和 85%)。这些结果可能与检测样品数、试剂的稳定性及操作过程有关。

表 2 115 个样品血清 β -羟丁酸和葡萄糖含量

	健康牛	亚临床酮病
奶牛数 / 头	85	30
β - 羟丁酸 / ($\mu\text{mol/L}$)	726 ± 43	2563 ± 238 ^a
葡萄糖 / (mmol/L)	3.42 ± 0.05	2.78 ± 0.07 ^a

注: a: 同行差异显著 ($P<0.05$)。

表 3 试纸条和酮粉的敏感性和特异性

检测方法	阳性 / n	敏感性 / %	特异性 / %
乳汁分析试纸条	27	67	92
尿液分析试纸条	25	57	85
酮粉	23	60	94

3 讨论

使用 β - 羟丁酸检测试剂盒定量检测奶牛血清 β - 羟丁酸检测效率高, 尤其适用于大批量样品的测定, 是一种实用和值得推广的方法。本次试验中所使用酮粉组成 (亚硝基铁氰化钠、硫酸铵、无水碳酸钠) 的比例为 3:100:50, 国内有文献报道不同的比例, 目前对于 3 者的不同配比对其检测结果的影响尚缺少有力的研究证明, 有待于进一步深入研究。奶牛亚临床酮病的诊断指标在国外也不尽相同, 有 1000、1200 和 $1400\mu\text{mol/L}$ 三种提法, 究竟哪个最为合理, 仍有待于进一步研究^[11]。综合便捷性、敏感性和特异性考虑, 乳汁分析试纸条诊断奶牛亚临床酮病是一种较好的方法。单纯使用任何一种牛旁检测方法都可能存在漏检或多检, 若乳汁分析试纸条和酮粉结合使用将提高检

测的敏感性和特异性。目前国内尚没有也买不到商品化的用于诊断奶牛亚临床酮病的乳汁分析试纸条 (本试验所用为从国外购买产品, 售价较高), 期待不久的将来能有商品化的国产乳汁分析试纸条上市。

参考文献

[1] LEBLANC S J, LESLIE K E, DUFFIELD T F. Metabolic Predictors of Displaced Abomasum in Dairy Cattle [J]. J Dairy Sci, 2005, 88: 159-170.
 [2] SEN I, OK M, COSKUN A. The level of serum ionised calcium, aspartate aminotransferase, insulin, glucose, betahydroxybutyrate concentrations and blood gas parameters in cows with left displacement of abomasum [J]. Pol J Vet Sci, 2006, 9(4): 227-32.
 [3] WALSH R B, WALTON J S, KELTON D F, et al. The effect of subclinical ketosis in early lactation on reproductive performance of postpar-

- tum dairy cows[J].J Dairy Sci,2007,90(6):2788-2796.
- [4] NIELSEN N I,FRIGGENS N C,CHAGUNDA M G,et al.Predicting Risk of Ketosis in Dairy Cows Using In-Line Measurements of β -Hydroxybutyrate:A Biological Model [J].J Dairy Sci,2005,88(7): 2441-2452.
- [5] 郭定宗.兽医内科学[M].北京:高等教育出版社,2005:258-262.
- [6] JORRITSMA R, BALDEE S J,SCHUKKEN Y H,et al.Evaluation of a milk test for detection of subclinical ketosis [J].Vet Q,1998,20(3): 108-110.
- [7] Melendez P, Goff J P,Risco C A,et al.Incidence of subclinical ketosis in cows supplemented with a monensin controlled-release capsule in Holstein cattle, Florida, USA [J].Preventive Veterinary Medicine, 2006,73(1):33-42.
- [8] GEISHAUSER T,LESLIE K,TENHAG J,et al.Evaluation of eight cow-side ketone tests in milk for detection of subclinical ketosis in dairy cows[J].J Dairy Sci,2000,83:296-299.
- [9] PADILLA L,SHIBANO K,INOUE J,et al.Plasma vitamin C concentration is not related to the incidence of ketosis in dairy cows during the early lactation period[J].J Vet Med Sci,2005,67(9):883-886.
- [10] CARRIER J,STEWART S,GODDEN S,et al.Evaluation and use of three cow-side tests for detection of subclinical ketosis in early post-partum cows[J].J Dairy Sci,2004,87(11):3725-3735.
- [11] HEUER C,LUINGE H J,LUTZ E T G,et al.Determination of acetone in cow milk by fourier transform infrared spectroscopy for the detection of subclinical ketosis[J].J Dairy Sci,2001,84(3):575-582.