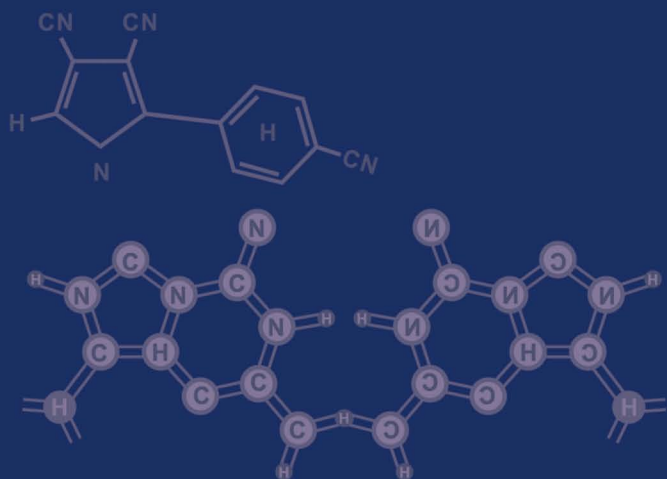


奶牛隐性乳房炎 诊断液LMT的研究与应用

NAINIU YINXING RUFANGYAN ZHENDUANYE LMT DE YANJIU YU YINGYONG

李新圃 罗金印 李宏胜 潘虎 著

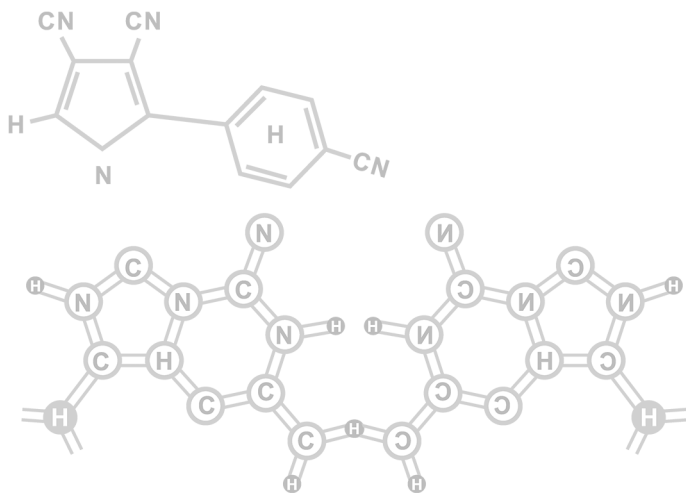



甘肃科学技术出版社

奶牛隐性乳房炎 诊断液LMT的研究与应用

NAINIU YINXING RUFANGYAN ZHENDUANYE LMT DE YANJIU YU YINGYONG

李新圃 罗金印 李宏胜 潘虎 著



 甘肃科学技术出版社

图书在版编目 (C I P) 数据

奶牛隐形乳房炎诊断液LMT的研究与应用 / 李新圃等著. -- 兰州 : 甘肃科学技术出版社, 2017. 10
ISBN 978-7-5424-2116-6

I. ①奶… II. ①李… III. ①乳牛—乳房炎—诊断—研究 IV. ①S858. 23

中国版本图书馆CIP数据核字(2017)第233875号

奶牛隐形乳房炎诊断液 LMT 的研究与应用
李新圃 罗金印 李宏胜 潘虎 著

责任编辑 韩 波
封面设计 魏士杰

出 版 甘肃科学技术出版社
社 址 兰州市读者大道 568 号 730030
网 址 www.gskejipress.com
电 话 0931-8774536 (编辑部) 0931-8773237 (发行部)
京东官方旗舰店 [https://mall. jd. com/index-655807.html](https://mall.jd.com/index-655807.html)

发 行	甘肃科学技术出版社	印 刷	兰州万易印务有限责任公司
开 本	787mm×1092mm 1/16	印 张	9 字 数 210 千
插 页	1		
版 次	2018 年 10 月第 1 版 2018 年 10 月第 1 次印刷		
印 数	1~500		
书 号	ISBN 978-7-5424-2116-6		
定 价	35.00 元		

前 言

乳房炎是奶牛的一种普通多发性疾病，按临床症状，可分为临床型乳房炎和隐型性乳房炎。临床型乳房炎发病率占 20%左右，而隐性乳房炎发病率则占 80%左右。隐性乳房炎不仅发病率高，而且不表现肉眼可见的临床症状，极易被忽视，造成病原扩散和发展，降低奶产量和质量，影响奶牛业发展。隐性乳房炎可使泌乳牛年产奶量降低 10%左右，乳汁氨基酸总量降低 21%左右，乳糖、酪蛋白、脂肪、 Ca^{2+} 、 P^{3-} 、 K^{+} 等有益成分含量亦降低，病原菌检出率明显升高。我国奶牛隐性乳房炎发病率为 11.3%~62.70%，每年因乳房炎造成的经济损失达 150~450 亿元，其中 70%左右的损失是由隐性乳房炎引起的奶产量下降。对于隐性乳房炎的防控，国内外均主张常规诊断，及时防控。

LMT (Lanzhou Mastitis Test, 兰州乳房炎试验) 技术是我所科研人员根据国际标准诊断技术 CMT (California Mastitis Test) 的诊断机理，经过技术改进，利用

国产原材料资源，研发的首个国产奶牛隐性乳房炎诊断液，通过现场检测乳汁，快速诊断隐性乳房炎，方便、安全、经济，适合各种规模和管理条件的奶牛场使用，便于在我国普及使用。LMT 诊断液的研究应用引领了国产诊断液的研究发展，在我国奶牛乳房炎流行病学调查和综合防治技术研究中发挥了重要作用。使用 LMT 诊断技术，先后在我国不同地区 30 多个城市 150 多个各种规模奶牛场，对上百万头奶牛，进行了隐性乳房炎流行病学调查和综合防治技术研究。上世纪 80 年代，我国奶牛隐性乳房炎平均头发病率高达 70%，随着我国奶牛业的发展和管理水平的提高，发病率明显在降低。但由于地区经济发展水平的差异，奶牛饲养管理水平亦存在差异，目前我国奶牛隐性乳房炎的平均头发病率在 40% 左右，乳区发病率在 20% 左右。隐性乳房炎病因病原复杂，乳汁细菌检出率高达 85%，其中包括各种病原菌。隐性乳房炎可导致乳汁体细胞数上升 30 万/mL 左右，降低奶产量 10% 左右，减少乳脂率和蛋白率分别在 0.62% 和 0.21% 左右。在 2012 到 2016 年的 5 年时间，使用 LMT 技术在全国各地各种规模奶牛场累计检测 482.15 万头次奶牛，通过隐性乳房炎诊断，及时了解发病动态，掌握病因病原情况，采

取相应防控措施，平均可降低隐性乳房炎头发病率 12.06%、临床型乳房炎头发病率 2.74%、奶牛淘汰率 0.055%，提高奶产量 5.20%，经中国农业科学院农业经济与发展研究所测算，产生的经济效益可达 28.02 亿，平均年经济效益达 5.6 亿，获得十分显著的经济效益和社会效益。

农业部在 2010 年印发了农医发 [2010] 29 号文件“奶牛乳房炎防治技术指南（试行）”，其中包括隐性乳房炎常规诊断，并且推荐使用 LMT 诊断技术；并于 2015 年颁布了由我所制定的农业行业标准《奶牛隐性乳房炎快速诊断技术》，从制备、使用和技术指标等方面规定规范了我国奶牛隐性乳房炎诊断液的技术标准。由此可见，奶牛隐性乳房炎快速诊断技术符合我国奶牛业发展需要。LMT 诊断技术的研究、应用和发展经历了半个世纪，这期间离不开老一代科研工作者的研究基础，也离不开在职科研工作者的深化研究和技术凝练，更离不开研究所的科技平台和科研经费。本书以 LMT 诊断液的研究应用作为引子，对半个世纪以来我们开展的奶牛乳房炎流行病学调查研究进行了较为系统的总结分析，希望能够保留这份研究积累，并且能够提供给从事这方面研究工作的同仁们一些启发和

帮助。由于笔者的水平有限，加上本书涉及的内容时间跨度较长，纰漏和不足之处在所难免，恳请各位读者批评指正。在这里我们要对所有支持和帮助过我们工作的人们表示衷心的感谢！还要特别感谢曾经在奶牛乳房炎调查研究工作中做出重要贡献的老一辈科学家张礼华、王兴亚、杨玉英、刘绪川、袁永隆、刘纯传等老师！

著者

2018年5月

目 录

第一章 奶牛隐性乳房炎诊断防控的研究意义	001
第一节 隐性乳房炎的发病机理	001
第二节 隐性乳房炎的诊断意义	013
第三节 隐性乳房炎的诊断方法	020
第四节 隐性乳房炎诊断液 LMT	029
第二章 奶牛隐性乳房炎诊断液 LMT 的技术质量标准	032
第一节 隐性乳房炎简易乳汁检测法	032
第二节 LMT 诊断液的研究制备	045
第三节 LMT 诊断液的诊断机理	056
第四节 LMT 诊断液的含量测定	066
第五节 LMT 诊断液的质量标准	075
第六节 LMT 诊断液的技术指标	080
第三章 LMT 技术在奶牛生理和病理学研究中的应用	088
第一节 LMT 反应等级与奶牛泌乳期变化	088
第二节 LMT 反应等级与奶牛生理状态变化	093

第三节	LMT 反应等级与乳汁细菌学分布	100
第四节	LMT 反应等级与乳汁病原菌感染	108
第五节	LMT 反应等级与乳汁病理学变化	112
第四章	LMT 技术在奶牛乳房炎综合防控措施	
研究中的应用		122
第一节	LMT 检出隐性乳房炎的乳汁细菌学分布	122
第二节	LMT 检出个体户奶牛隐性乳房炎的主要致病菌	128
第三节	LMT 检出兰州地区奶牛隐性乳房炎的发病情况	135
第四节	LMT 检出隐性乳房炎的病因、病原和病理学特点	141
第五节	LMT 检出隐性乳房炎的流行病学特点	154
第六节	LMT 诊断监测隐性乳房炎的综合防治措施	162
第五章	奶牛隐性乳房炎快速诊断技术的标准化研究	169
第一节	LMT 诊断液的敏感性研究	169
第二节	LMT 诊断液的特异性研究	176
第三节	LMT 诊断液的符合率研究	186
第四节	LMT 诊断液的临床应用研究	192

第五节	LMT 诊断液的稳定性研究	199
第六节	LMT 诊断液的安全性分析	203
第七节	“奶牛隐性乳房炎快速诊断技术”标准研究	206
第六章	附件	221
附件 1	农业行业标准《奶牛隐性乳房炎快速 诊断技术》	221
附件 2	农医发[2010]29 号文件《奶牛乳房炎 防治技术指南(试行)》	230
附件 3	奶牛隐性乳房炎快速诊断技术的经济 效益预测报告	246
附件 4	奶牛隐性乳房炎快速诊断技术的查新 报告	256

第一章

奶牛隐性乳房炎诊断防控的研究意义

第一节 隐性乳房炎的发病机理

乳房炎是奶牛的普通多发性疾病,严重影响奶牛业的发展。近 30 年的调查研究结果显示,我国奶牛乳房炎平均头发病率为 50%~70%,平均乳区阳性率为 20%~40%。随着我国养殖技术和管理水平的不断提高,乳房炎发病率有所下降,但仍然属于奶牛的高发性疾病^[1-4],分析原因主要有以下几方面因素:随着生活水平的提高,人类食用牛奶等乳制品的需求量增大,使得奶牛养殖业发展过于迅速,奶牛管理水平的发展难以跟上步伐,造成乳房炎不能得到及时有效的防控^[5,6];人类近 40 年来不断进行高产奶牛的选育,一些国家奶牛的产奶量已经增加了 3~4 倍,一头牛每年平均有 300 天的泌乳期,产奶量高达 10000kg^[7],由于奶牛乳腺组织长期高负荷运作,对抗病原菌的免疫力和抵抗力降低,增加了乳房炎的发病率^[8,9];近年的研究发现,与奶牛乳房炎发病率密切相关的金黄色葡萄球菌、链球菌和大肠杆菌等^[10],均能在受感染的组织形成一种具有高度组织

性的多细胞复合体生物被膜,将自身包裹在里面,建立一个几乎能抵抗所有抗菌剂的内在屏障,破坏抗生素的抗菌作用,损害吞噬细胞的吞噬功能,并且还能从生物被膜表层不断释放游离细菌,形成持续性感染,导致病原菌的耐药性增加,造成乳房炎久治不愈和反复发作,严重影响抗生素的防治疗效,日益凸显抗生素的耐药性和残留性^[11-14]。针对这种情况,国内外学者不断深入研究奶牛乳腺的防御功能,了解乳房炎的发病机理,探索发现防治乳房炎的新途径。

1.1 奶牛乳腺的防御机能^[15,16]

1.1.1 物理屏障

乳头管括约肌和角蛋白相互配合构成了乳腺防御的第一道防线。乳头管周围的括约肌在挤奶间隔期处于紧闭状态,能够阻止病原微生物侵入。乳头管上皮细胞分泌的角蛋白含有豆蔻酸、棕榈酸、亚油酸等脂肪酸,具有抑菌作用,并且角蛋白内层能够以静电方式与病原菌结合,增加了病原菌对渗透压反应的敏感性,从而变得易于裂解和死亡。

1.1.2 细胞防御^[17-19]

乳腺内部静止和活化的白细胞,包括巨噬细胞、嗜中性粒细胞、淋巴细胞、NK 细胞等,它们共同作用调节固有免疫和特异性免疫反应。巨噬细胞是健康牛乳腺组织和乳汁中的主要体细胞,可以利用蛋白酶和活性氧吞噬或破坏

细菌。在炎症发生时,乳腺中的巨噬细胞数量减少,但能够分泌细胞因子、前列腺素和白细胞三烯,加强局部炎症过程,并吸引嗜中性粒细胞进入乳腺发挥吞噬和消灭病原菌的作用。在妊娠最后7天,巨噬细胞数量达到最高值,但吞噬力明显下降。

嗜中性粒细胞在健康乳腺中数量很少,当乳腺受到感染时,嗜中性粒细胞在炎症诱导因子的作用下,从血液向乳腺迁移,使乳腺中的白细胞数量急剧上升,其中嗜中性粒细胞占90%左右。嗜中性粒细胞是乳腺炎症早期发挥作用的主要细胞,通过呼吸暴发过程产生超氧阴离子发挥抗菌作用。另外,嗜中性粒细胞分泌的一些小分子抗菌肽,能够杀灭多种乳房炎病原菌。在分娩时,嗜中性粒细胞的功能会降低。

淋巴细胞主要包括T淋巴细胞和B淋巴细胞。T淋巴细胞又可分为 $\alpha\beta$ T($CD4^+$ 和 $CD8^+$)和 $\gamma\delta$ T细胞。在健康牛乳腺中,主要是 $CD8^+$ 发挥功能, $CD4^+$ 的功能主要体现在外周血液中。乳房炎发生时,乳腺中的 $CD4^+$ 占优势,血液中的 $\gamma\delta$ T细胞增多,并且能够分泌生长因子,修复感染部分的上皮组织。但由金黄色葡萄球菌导致的慢性乳腺炎, $CD8^+$ 比 $CD4^+$ 更多地迁移到乳腺中,因此 $CD8^+$ 发挥重要的作用。B淋巴细胞可以生成乳汁抗体IgG1、IgG2、IgA和IgM。

NK细胞在乳腺体液免疫应答和细胞免疫应答过程中起介导作用,在对靶细胞的杀灭过程中发挥主要作用。

1.1.3 体液抗体^[20]

乳汁中的抗体主要包括 IgG1、IgG2、IgA 和 IgM，它们既由乳腺中的 B 细胞局部合成，也可以从血液中有选择的进入乳腺内，每一种抗体的浓度随着泌乳的不同阶段以及炎症的不同阶段而不断的变化。泌乳期 Ig 含量一般较低，随着干奶期和分娩的临近，乳汁中 Ig 逐渐上升，在初乳中形成很高的浓度。当乳腺感染时，乳汁中的 Ig 含量会上升。健康泌乳牛乳汁中，IgG1 是主要的抗体，但是随着炎症的发生，乳汁中的 IgG2 含量会逐渐上升。IgG1、IgG2 和 IgM 在乳汁中对病原体主要起着免疫调理作用，与病原微生物及其毒素结合直接产生抗感染免疫作用，或与补体 C3b 结合，通过增强免疫细胞吞噬病原微生物和中和细菌毒素的能力，间接性杀伤病原体或靶细胞。IgA 虽然不能调理细菌和结合补体，但是具有凝结细菌、中和毒素和防止细菌定植于乳腺上皮细胞等的作用。此外，IgG 和 IgA 还能参与抗体依赖、细胞介导的细胞毒性作用(ADCC)，特别是在 NK 样细胞对靶细胞的杀灭过程中起主要作用。

1.1.4 乳汁抑菌物质^[21-25]

乳汁中含有多种抑菌和杀菌物质，这些物质在保证哺乳后代免受病原侵袭和维护乳房健康中发挥重要作用。

①溶菌酶是一种通过裂解细菌外膜的肽聚糖而发挥杀菌作用的调理素。细菌内毒素能够引起乳区溶菌酶表达量显著升高。

②补体蛋白是由肝细胞、其他单核细胞和组织巨噬细胞合成，主要功能是溶菌、调理和吸引吞噬细胞到达

补体活动的地方,且受补体受体的调节。泌乳期健康乳腺的补体浓度最低,初乳、干乳及炎性乳汁中补体浓度较高,其原因可能是血液中的补体渗透到乳腺中。③乳铁蛋白(lactoferrin,LF)是一种乳腺上皮细胞和白细胞所产生的铁结合性糖蛋白,主要存在于哺乳动物的乳汁、眼泪、唾液等外分泌物中。乳铁蛋白具有调理素的性质,在其影响下,中性粒细胞的吞噬活性加强。乳铁蛋白浓度在炎症期和干奶期比泌乳期高,乳房发炎时,乳铁蛋白可增加20~30倍,干奶期的主要作用是能够防止大肠杆菌感染。大肠埃希菌型乳房炎,乳铁蛋白增加的趋向较葡萄球菌型和链球菌型乳房炎显著。乳铁蛋白和IgG1协同,可阻止埃希氏大肠杆菌和肺炎克雷伯氏菌对铁の利用,但不能阻止无乳链球菌对铁の利用。④抗菌肽是生物体内存在的一种天然抗菌活性物质,与传统的抗生素相比具有分子量小、抗菌谱广、对热稳定、水溶性好、无免疫原性、抗菌机理独特等特点。抗菌肽对粪肠球菌、葡萄球菌和牛链球菌抑制作用较强,对细菌、真菌和被膜病毒有抑杀作用。牛奶中已分离出3种抗菌肽,具有抑制肠毒性大肠埃希氏菌和产单核李斯特菌作用。

另外,N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶(NAGase)通过分解细胞膜上的葡萄糖苷键削弱细胞间的接触,有利于体细胞的涌入。NAGase是反映乳腺上皮细胞破坏程度的敏感性指标,奶牛发生乳房感染和炎症时,乳汁中的NAGase含量增加6倍,在诊断隐性乳房炎方面与体细胞计数一样灵

敏、准确。NAGase 可以作为检测隐性乳腺炎的一个重要指标,而且还有一定的免疫活性,与乳铁蛋白协同作用能抑制某些病原微生物的活性。在内毒素诱发的乳腺炎发病过程中,一氧化氮合酶(NOS)活性增加,一氧化氮(NO)含量显著升高。炎症损伤诱导表达诱导型一氧化氮合酶(iNOS),能够催化精氨酸产生 NO。NO 与氧作用后生成 NO₂ 和 NO₃, 或与过氧化物相互作用转化为具有杀菌活性的过氧化亚硝酸盐。黄嘌呤氧化酶(Xanthine Oxidase,XOD)在有氧条件下,可以产生氮氧化物抑制细菌生长,还可以促进杀菌剂过氧化亚硝酸盐的产生。

1.1.5 细胞因子

细胞因子是由免疫细胞(如单核、巨噬细胞、T 细胞、B 细胞、NK 细胞等)和某些非免疫细胞(内皮细胞、表皮细胞、纤维母细胞等)经刺激而合成、分泌的一类具有广泛生物学活性的小分子蛋白质,在细胞生长、分化和免疫调节方面具有重要的作用。它们构成了机体复杂的免疫调节网络,在乳腺的非特异性免疫和特异性免疫过程中发挥着重要的作用^[26]。到目前为止,应用于奶牛乳房炎控制研究中的细胞因子主要有白细胞介素(IL)、集落刺激因子(CSF)、干扰素(IFN)和肿瘤坏死因子(TNF)等^[27]。

白细胞介素(IL)是由嗜中性粒细胞产生的一类细胞因子。IL-1 可以调节急性炎症反应、增加嗜中性粒细胞的数量以及吞噬和杀菌功能^[28]。向乳腺内注射 IL-2 可诱导血液中嗜中性粒细胞迁移到乳汁中,使乳汁体细胞量数增加;