点击此处添加 ICS 号
点击此处添加中国标准文献分类号

贵　州　省　地　方　标　准

奶牛隐性乳房炎 QMT 检测规程

QMT test procedure for latent mastitis in dairy cows in Guizhou Province

（征求意见稿）

贵州省市场监督管理局 发布

目　次

1 范围.....1
2 规范性引用文件.....1
3 术语定义.....1
3.1 奶牛隐形乳房炎.....1
4 诊断方法.....1
4.1 病原学检查.....1
4.1.1 基础材料.....1
4.1.2 样品采集.....2
4.1.3 病原菌分离培养.....2
4.1.3.1 培养特性观察.....2
4.1.3.2 形态特征观察.....2
4.1.4 病原菌鉴定.....3
4.1.4.1 金黄色葡萄球菌鉴定.....3
4.1.4.2 链球菌鉴定.....3
4.1.4.3 致病性大肠杆菌鉴定.....4
4.2 乳汁体细胞检查法.....5
4.2.1 显微镜直接检查法.....5
4.2.1.1 原理.....5
4.2.1.2 试剂.....5
4.2.1.3 仪器.....5
4.2.1.4 染色溶液制备.....5
4.2.1.5 样品采集与处理.....6
4.2.1.6 检查方法.....6
4.2.1.7 结果判定.....6
4.2.2 美国加州乳房炎检测(CMT)法.....6
4.2.2.1 原理.....6
4.2.2.2 试剂.....7
4.2.2.3 仪器.....7
4.2.2.4 CMT 试剂配制.....7
4.2.2.5 检测方法.....7
4.2.2.6 结果判定.....7
4.3 乳汁 pH 值测定法—溴麝香草酚蓝(BTB)法.....7
4.3.1 原理.....7
4.3.2 试剂.....8
4.3.3 仪器.....8
4.3.4 BTB 试剂配制.....8
4.3.5 检测方法.....8
4.3.6 结果判定.....8
4.4 乳汁导电性检测法.....8
4.4.1 原理.....8
4.4.2 仪器.....8
4.4.3 检测方法.....9
4.4.4 结果判定.....9

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》规定起草。

本文件由贵阳市动物疫病预防控制中心提出并归口。

本文件起草单位：贵阳市动物疫病预防控制中心、贵州大学。

本文件主要起草人：徐春志、岳 筠、蔺俐仲、程振涛、景书灏、杨 源、张 海、刘 艳、邓珊珊、方 英、文 明、王开功、周碧君、杨 峰、袁翠霞、袁 林、袁 标、胡 焱、龙国荣。

奶牛隐性乳房炎 QMT 检测规程

1 范围

本文件规定了奶牛隐性乳房炎 QMT 检测规程。

本文件适用于奶牛隐性乳房炎的诊断、检疫和流行病学调查以及疑似隐性乳房炎鲜乳的检测。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本文件的引用而成为本文件的条款。凡是注明日期的引用文件，其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准，然而，鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注明日期的引用文件，其最新版本适用于本标准。

GB/T 14926.43-2001　实验动物 细菌学检测 染色法、培养基和试剂

NY/T 800-2004　生鲜牛乳中体细胞测定方法

NY/T 1172-2006　生鲜牛乳质量管理规范

NY/T 1749-2006　鲜乳中菌落总数快速测定 阻抗法

NY/T 2692-2015 奶牛隐性乳房炎快速诊断技术

NY/T 2962-2016　奶牛乳房炎乳汁中金黄色葡萄球菌、凝固酶阴性葡萄球菌、无乳链球菌分离鉴定方法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 奶牛隐性乳房炎

一种奶牛常发的亚临床型乳房炎，表现为乳腺组织发生炎症，炎症细胞向乳汁中浸润，但乳房组织和乳汁无肉眼可见异常，而乳汁的理化性质已发生改变，该疾病在降低了奶牛产奶量的同时威胁着奶制品质量安全，它的发生与微生物因素、奶牛自身因素、管理因素以及遗传因素密切相关。

3.2 革兰氏染色

利用细菌细胞壁化学物质组成差异，先后使用草酸铵结晶紫、碘液、95%酒精和沙黄进行染色，细菌会呈现出紫色和红色两种，紫色细菌被分类为革兰氏阳性细菌 G^+，红色细菌被分类为革兰氏阴性细菌 G^-。

3.3 生化鉴定

利用细菌对营养物质分解能力的不同及其代谢产物的差异对细菌进行鉴定的方法。

4 诊断方法

4.1 细菌学诊断

4.1.1 培养基配制

4.1.1.1 营养肉汤：按 GB/T 14926.43-2001 中 4.2 规定配制。

4.1.1.2 营养琼脂平板：按 GB/T 14926.43-2001 中 4.3 规定配制。

4.1.1.3 鲜血琼脂平板：按 GB/T 14926.43-2001 中 4.4 规定配制。

4.1.1.4 血清肉汤：按 GB/T 14926.43-2001 中 4.5 规定配制。

4.1.1.5 麦康凯琼脂平板：按 GB/T 14926.43-2001 中 4.8 规定配制。

4.1.1.6 糖发酵管：按 GB/T 14926.43-2001 中 5.1 规定配制。

4.1.1.7 蛋白胨水：按 GB/T 14926.43 中 5.4 规定配制。

4.1.2 试剂

4.1.2.1 新洁尔灭(0.2%)

4.1.2.2 乙醇(70%)

4.1.2.3 过氧化氢(3%)

4.1.2.4 兔血浆

4.1.3 仪器

普通光学显微镜(含油镜)

4.1.4 样品采集

选取疑患隐性乳房炎奶牛，先用温水，然后用 0.2%新洁尔灭清洗乳房，再用 70%乙醇擦拭乳头。每个乳区先挤弃 2 把～3 把奶后，再收集奶汁于洁净的带塞三角瓶中，每头奶牛约 10 mL，应在 3 h 内进行细菌分离培养。

4.1.5 病原菌分离培养

4.1.5.1 培养特性观察

将采集的乳汁样品轻轻摇匀后，分别吸取 100 μL～200 μL 接种于营养琼脂平板、鲜血琼脂平板和麦康凯琼脂平板上，置于 37 ℃温箱培养 24 h～48 h，观察平板细菌生长情况。然后挑取可疑菌落接种到血清肉汤中，置于 37 ℃温箱培养 24 h～48 h，观察肉汤细菌生长情况。

表 1　金黄色葡萄球菌、链球菌和大肠杆菌培养特性

可疑菌落	营养琼脂平板	鲜血琼脂平板	麦康凯琼脂平板	血清肉汤
金黄色葡萄球菌	圆形、隆起、表面光滑的金黄色菌落。	圆形、隆起、呈明显 β-溶血、金黄色的大菌落。	圆形、隆起、光滑、湿润的金黄色菌落。	呈均匀浑浊生长，管底有少量白色沉淀物。
链球菌	未见菌落生长。	圆形、隆起、表面光滑、半透明、灰白色、溶血或不溶血的小菌落。	未见菌落生长。	培养初期为均匀浑浊，后期管底絮状沉淀，上清清亮。
大肠杆菌	圆形隆起、光滑湿润、半透明、灰白色菌落。	不溶血或 β-溶血。	圆形扁平、光滑湿润的红色菌落。	呈均匀浑浊生长，管底有粘性沉淀，液面管壁有菌环。

4.1.5.2 形态特征观察

挑取可疑菌落进行涂片后，按照 GB/T 14926.43-2001 中 3.1 规定的革兰氏染色步骤执行，于普通光学显微镜下观察分离细菌的形态特征。

表 2　金黄色葡萄球菌、链球菌和大肠杆菌形态特征

可疑菌落	菌　体　特　征
金黄色葡萄球菌	革兰氏染色阳性(蓝紫色)，菌体为球状，呈葡萄串状排列，无芽孢，无鞭毛。
链球菌	革兰氏染色阳性(蓝紫色)，菌体为球状，呈短链状或长链状排列，无芽孢，无鞭毛。
大肠杆菌	革兰氏染色阴性(红色)，菌体为杆状，呈短杆状排列，无芽孢，有鞭毛。

4.1.6 病原菌鉴定

4.1.6.1 金黄色葡萄球菌鉴定

4.1.6.1.1 生化鉴定

4.1.6.1.1.1 触酶试验　挑取适量可疑细菌培养物于洁净的玻片上，然后加入 3%过氧化氢，若有大量气泡产生则为阳性，无则为阴性。

4.1.6.1.1.2 凝固酶试验　取 0.5 mL 可疑细菌的 24 h 营养肉汤培养物于小试管中，加入 0.5 mL 兔血浆，充分混匀后，置于 37 ℃温箱孵育，每 30 min 观察一次，连续观察 6 h，若倾斜或倒置小试管时内容物不流动，则判为阳性；若内容物流动，则判为阴性。同时作阴阳性对照。

4.1.6.1.1.3 糖发酵试验　挑取金黄色葡萄球菌可疑菌落的纯培养物接种到各种糖发酵管中，置于 37 ℃温箱培养 24～48 h，观察结果。

4.1.6.1.2 毒力测定

取金黄色葡萄球菌分离物的纯培养物用灭菌生理盐水适当稀释后，腹腔注射小白鼠，0.5 mL/只，观察一周，若小白鼠死亡或其内脏出现脓肿，并能重新分离到原接种细菌，即可确定该细菌有毒力。

4.1.6.1.3 生化结果判定

表 3　金黄色葡萄球菌鉴定结果

细菌	触酶试验	凝固酶试验	乳糖	葡萄糖	麦芽糖	蔗糖	甘露醇	七叶苷	靛基质	硝酸盐	毒力检测
金黄色葡萄球菌	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+

4.1.6.2 链球菌鉴定

4.1.6.2.1 生化鉴定

4.1.6.2.1.1 CAMP 试验　取鲜血琼脂平板，先用金黄色葡萄球菌接种划线为一条直线，然后与之垂直划线接种各种可疑的链球菌培养物，但不要接触(相距 5 mm 左右)，同时各可疑链球菌线间间距 10 mm~20 mm。置于 37 ℃温箱培养 24 h 观察，若两划线交界处出现箭头样溶血区域，则判定为阳性。

4.1.6.2.1.2 糖发酵试验　挑取链球菌可疑菌落的纯培养物接种到糖发酵管中，置于 37 ℃温箱培养 24 h～48 h，观察结果。

4.1.6.2.2 致病性鉴定

取链球菌分离物的 18 h 血清肉汤培养物，腹腔注射小白鼠，0.5 mL/只，观察一周，若小白鼠死亡，并在其内脏重新分离到原接种细菌，即可确定该细菌具有致病性。

4.1.6.2.3 生化结果判定

表 4　链球菌鉴定结果

细菌	CAMP 试验	溶血现象	乳糖	甘露醇	七叶苷	山梨醇	马尿酸钠	水杨苷	菊糖	海藻糖	动物试验
无乳链球菌	+	β 溶血	+	—	—	—	+	(+)	—	+	—
停乳链球菌	—	α 溶血	+	—	—	—	—	—	—	+	+
乳房链球菌	—	α 或 γ 溶血	+	+	+	+	+	+	+	+	—

4.1.6.3 致病性大肠杆菌鉴定

4.1.6.3.1 生化鉴定

挑取大肠杆菌可疑菌落的纯培养物接种到各种糖发酵管以及三塘铁琼脂、蛋白胨水中，置于 37 ℃温箱培养 24 h～48 h，按照 GB/T 4789.28 规定操作，观察结果。

4.1.6.3.2 **致病性鉴定**

取大肠杆菌分离物的纯培养物用灭菌生理盐水适当稀释后，腹腔注射小白鼠，0.5 mL/只，观察一周，若小白鼠出现腹泻或死亡，并在其内脏能重新分离到原接种细菌，即可确定该细菌具有致病性。

4.1.6.3.3 **生化结果判定**

表 5　大肠杆菌鉴定结果

细菌	葡萄糖	乳糖	麦芽糖	甘露醇	蔗糖	VP	H2S	柠檬酸盐	甲基红	靛基质	动物试验
大肠杆菌	+	+	+	+	+	—	—	—	+	+	+

4.2 **乳汁体细胞检查法**

4.2.1 **显微镜直接检查法**

4.2.1.1 **原理**

奶牛患有隐性乳房炎后，可诱导多形核白细胞进入乳腺细胞，同时损伤脱落的上皮细胞进入乳中，导致生鲜牛乳中体细胞增加，而这些细胞的细胞核可被亚甲基蓝清晰染色，在显微镜油镜下可进行计数判定。

4.2.1.2 **试剂**

4.2.1.2.1 乙醇(95%)

4.2.1.2.2 乙醇(70%)

4.2.1.2.3 四氯乙烷($C_2H_2Cl_4$)或三氯乙烷($C_2H_2Cl_3$)

4.2.1.2.4 亚甲基蓝($C_{16}H_{18}ClN_3S\cdot 3H_2O$)

4.2.1.2.5 冰醋酸(CH_3COOH)

4.2.1.2.6 硼酸(H_3BO_3)

4.2.1.2.7 新洁尔灭(0.2%)

4.2.1.3 **仪器**

4.2.1.3.1 显微镜：放大倍数×500 或×1000，带刻度目镜、测微尺和机械台。

4.2.1.3.2 微量注射器：容量 0.01mL。

4.2.1.3.3 载玻片：具有外槽圈定的范围，可采用血球计数板。

4.2.1.3.4 水浴锅：65 ℃±5 ℃

4.2.1.3.5 水浴锅：35 ℃±5 ℃

4.2.1.3.6 电炉：40 ℃±10 ℃

4.2.1.3.7 砂芯漏斗：孔径≤10 μm

4.2.1.3.8 干发型吹风机

4.2.1.3.9 恒温箱：恒温 40 ℃～45 ℃

4.2.1.4 **染色溶液制备**

取 250 mL 三角瓶，加入 54.0 mL 95%乙醇和 40.0 mL 四氯乙烷，摇匀；65 ℃水浴锅加热 3 min；取出，加入 0.6 g 亚甲基蓝，振摇溶解，降温后置入冰箱冷却至 4 ℃；取出，加入 6.0 mL 冰醋酸，混匀后用砂芯漏斗过滤，装入试剂瓶，常温保存。

4.2.1.5 **样品采集与处理**

4.2.1.5.1 选取疑患隐性乳房炎奶牛，先用温水，然后用 0.2%新洁尔灭擦洗乳房，再用 70%乙醇擦拭乳头。每隔乳区先挤弃 2 把～3 把奶后，再收集奶汁于洁净的带塞试管中，每头奶牛约 5 mL，置于 2 ℃～4 ℃冰箱保存待测；若 6 h 内未测定，应加 0.1 mg/100 mL 硼酸进行防腐，但贮存时间不超过 24h。

4.2.1.5.2 将采集的生鲜牛乳样品置于 35 ℃水浴锅中加热 5 min，摇匀后冷却至室温。

4.2.1.5.3 用乙醇将载玻片洗净，无尘拭镜纸擦干或火焰烤干，冷却。

4.2.1.5.4 取洁净的微量注射器，抽取生鲜牛乳样品，用无尘拭镜纸擦净针头外残样，平整地注入载玻片上，立即置于恒温箱中，水平放置 5 min，使形成均匀厚度样膜；取载玻片于电炉上烤干后，浸入染色溶液 10 min；取出晾干，若室内湿度较大，可用干发型吹风机吹干；然后将染色的载玻片浸入水中，洗去多余的染色溶液，干燥后防尘保存。

4.2.1.6 **检查方法**

4.2.1.6.1 将载玻片固定在显微镜载物台上，可用自然光源或电光源。

4.2.1.6.2 单向移动显微镜螺旋钮，在油镜下观察 100 个视野内或在视野内显示一半以上形体的体细胞并计数，计数的体细胞不应少于 400 个。（体细胞形态）

4.2.1.7 **结果判定**

被检乳样体细胞数量按式(1)计算

$$X = \frac{100 \times N \times S}{a \times d} \quad \text{----------(1)}$$

式中：

X——乳样中体细胞数，单位为个每毫升(个/mL)；

N——显微镜体细胞计数，单位为个；

S——样膜覆盖面积，单位为平方毫米(mm^2)；

a——单向移动显微镜载物台进行计数的长度，单位为毫米(mm)；

d——显微镜视野直径，单位为毫米(mm)。

判定标准：单位体积内乳汁体细胞大于 8×10^5 个小于 5×10^6 个为弱阳性；大于 5×10^6 为强阳性。

4.2.2 乳汁改良 CMT 检测方法

4.2.2.1 原理

生鲜牛乳中的体细胞在表面活性物质和碱性药物作用下，释放出 DNA 并使乳汁形成产生沉淀或形成凝胶。若牛乳体细胞数量越多，形成的沉淀或凝胶就越多，从而间接地诊断隐性乳房炎并能反映其炎症程度。

4.2.2.2 试剂

4.2.2.2.1 氢氧化钠(NaOH)

4.2.2.2.2 烷基硫酸钠($C_{12}H_{25}$-OSO_3Na)：可用烷基硫酸钾、烷基烯丙基硫酸钠或烷基烯丙基钾替代。

4.2.2.2.3 溴甲酚紫($C_{21}H_{16}Br_2O_5S$)

4.2.2.3 仪器

乳白色塑料皿：深 1.5 cm、直径 5 cm

4.2.2.4 试剂配制

称取十二烷基硫酸钠 30 g~50 g、氢氧化钠 15 g 和溴甲酚紫 0.1 g，加入到 2000 mL 烧杯中，加 1000 mL 蒸馏水，充分溶解后，装入试剂瓶，常温保存。

4.2.2.5 检测方法

按 4.2.1.5.1 采集生鲜牛乳，取乳样 2 mL 置于乳白色塑料皿中，加入 CMT 试剂 2 mL，用玻璃棒或牙签缓慢作同心圆搅拌 15 min，观察结果。

4.2.2.6 结果判定

表 6　乳样检测和结果判定标准

反应判定	被检乳样	反应状态	体细胞数(千个/毫升)
—	阴性	混合物呈液体状，倾斜检验盘时，流动流畅，无凝块。	0~200
±	可疑	混合物呈液体状，盘底有微量沉淀物，摇动时消失。	200~500
+	弱阳性	盘底出现少量粘性沉淀物，未全部形成凝胶块，摇动时沉淀物散布于盘底，有粘性。	500~800

++	阳性	全部呈凝胶块，有一定粘性，旋转检验盘时，凝胶物向心集中，不易散开。	800~5000
+++	强阳性	全部形成胶状沉淀物，粘稠，旋转检验盘时，沉淀集于中心，难易散开。	>5000

4.3 乳汁 pH 值测定法—溴麝香草酚蓝(BTB)法

4.3.1 原理

当奶牛发生隐性乳房炎时，可导致乳汁的 pH 值升高，而升高的程度取决于隐性乳房炎的炎症程度。因此，可通过检测乳汁的 pH 值来判断奶牛是否患有隐性乳房炎。

4.3.2 试剂

4.3.2.1 乙醇(47.5%)

4.3.2.2 氢氧化钠(5%)

4.3.2.3 溴麝香草酚蓝($C_{27}H_{28}Br_2O_5S$)

4.3.3 仪器

试管(10 mL)

4.3.4 BTB 试剂配制

取 1000 mL 三角瓶，加入 47.5%乙醇 500 mL 和溴麝香草酚蓝 1 g，充分溶解后，加入 5%氢氧化钠 1.5 mL，充分混匀后调节 pH 至 7.0。若偏酸，则滴加碳酸氢钠溶液；若偏碱，则滴加盐酸。装入试剂瓶，常温保存。

4.3.5 检测方法

按 4.2.1.5.1 采集生鲜牛乳，取乳样 5 mL 置于 10 mL 试管中，沿管壁缓慢滴加 BTB 试剂 1 mL，观察乳样与 BTB 试剂接触面的颜色结果。

4.3.6 结果判定

表 7　乳样 BTB 法检测结果判定标准

反应判定	被检乳样	反应状态	pH 值
—	阴性	黄绿色	6.0～6.5
±	可疑	绿色	6.6
+	阳性	蓝绿色或青绿色	>6.6

4.4 乳汁导电性检测法

4.4.1 原理

当奶牛发生隐性乳房炎时，导致其乳汁中的 Na^+、Cl^-等离子浓度升高，表现为导电性增强。因此，可通过检测生鲜牛乳导电性的变化来判定奶牛是否患有隐性乳房炎，但要注意确定牛群正常乳汁的导电性阀值。

4.4.2 仪器

XND-A 型奶检仪（可用 ZRD 型奶牛乳腺炎电子检测仪、CN 型乳房炎诊断仪、SX-I 型乳房炎诊断仪、AHI 型乳房炎检测仪或 DDB-11T 型便携式电导率仪等替代）。

4.4.3 检测方法

按 4.2.1.5.1 采集生鲜牛乳，取 5 mL～10 mL 乳样置于检测杯中，采用 XND-A 型奶检仪进行检测，记录被检乳样的导电率值，判定结果。

4.4.4 结果判定

采用乳汁导电性检测法进行隐性乳房炎诊断时，首先确定该奶牛场正常乳汁的导电阀值，若被检乳样的导电率≥正常乳汁导电阀值的 120%，即可判定为隐性乳房炎乳汁。

附件 2：

《奶牛隐性乳房炎 QMT 检测规程》编制说明

（一）项目背景

贵州省是奶牛养殖和乳制品生产大省，现存产奶牛有约 1.5 万头，对奶牛疫病尤其是人畜共患传染病的防控，对于我省产业发展至关重要。奶牛隐性乳房炎是一种奶牛群常发的动物疫病，主要因为奶牛的乳腺组织发生炎症所致，它的发生与病原微生物、奶牛自身因素、管理因素以及遗传因素密切相关。其中由病原微生物，如链球菌、致病性大肠杆菌、金黄色葡萄球菌等感染所致的具有传染性的奶牛隐性乳房炎最为多见。奶牛隐性乳房炎在降低了牛奶产量的同时，其病原也可感染人而引起公共卫生安全事件，奶牛隐性乳房炎往往由于无明显的临床症状，而更容易被忽视，造成的危害也更为巨大，同时若不治疗及时，会发展为临床性乳房炎，造成损失，因此准确诊断是进行早期治疗的关键，同时也是防控该病的重要前提。

我国奶牛乳房炎的发病率很高，隐性乳房炎的发病率更高、危害性更大。根据国际奶牛联合会的统计，20 世纪 70 年代，奶牛乳房炎的发病率是 2%，隐性乳房炎患病率为 50%以上；据王应安等调查，青海某奶牛场牛隐性乳房炎的乳头患病率和乳区患病率分别为

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：https://d.book118.com/927162020103006151