

基于体细胞数的奶牛乳腺炎检测方法研究进展

崔传金¹,张磊²,张学超¹

(1. 河北联合大学电气工程学院,河北唐山 063009;2. 河北联合大学现代技术教育中心电教中心,河北唐山 063009)

摘要 奶牛乳腺炎的检测方法有很多,其中检测精度较高、实际应用较多的是直接或间接检测牛奶中体细胞含量的方法。介绍了检测奶牛乳腺炎的常用方法,并对基于体细胞数的检测方法和技术进行了综述,指出了这些方法存在的问题和不足,最后展望了基于体细胞数的检测方法和技术的发展趋势及应用前景。
关键词 奶牛;乳腺炎;体细胞;检测方法
中图分类号 S823.9⁺1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)07-02974-02

Cow Mastitis Detection Methods Based on Somatic Cell Count
CUI Chuan-jin et al (College of Electrical Engineering, Hebei United University, Tangshan, Hebei 063009)
Abstract There are a lot of cow mastitis detection methods, one of the accurate and mostly used methods is detecting the somatic cell content in fresh milk directly or indirectly. First the common cow mastitis detection methods were briefly introduced, then detection methods and techniques which based on detecting somatic cell count were reviewed, problems and deficiencies of these methods were analyzed. Finally, suggestions for somatic cell count based on detection methods and its application prospects were put forward.
Key words Cow; Mastitis; Somatic cell; Detection method

奶牛乳腺炎(Cow mastitis)是指奶牛乳腺组织由病原微生物感染所引起的炎症反应,是奶牛所有疾病中发病率最高、危害最严重的一种疾病,美国每年因奶牛乳腺炎造成的经济损失高达20亿美元^[1-2]。

目前国内外对奶牛乳腺炎的检测有多种方法,包括病原微生物检测法^[3-4]、细胞学检测法^[5]、牛奶电导率(Electrical conductivity,EC)和pH检测法^[6]、酶类检测法^[7]、光谱分析检测法^[8-9]、乳清电泳检测法^[10]、蛋白检测法^[11]、牛奶成分直接检测法^[12]、乳房温度检测法^[13]、牛奶颜色检测法^[14]、被毛微量元素检测法^[15]等检测方法。其中,细胞学检测方法较为常用。笔者对基于细胞含量的检测方法和技术进行综述,并分析这些方法的优缺点,最后展望这些方法和技术的发展趋势及应用前景。

1 直接细胞计数检测法

1.1 直接显微镜细胞计数(DMSCC)法 1946年, Little和Plastrige发明了直接显微镜计数法(DMSCC)^[16-17]。直接显微镜细胞计数法是体细胞含量检测的标准方法,将牛奶的涂片经过脱脂、固定、染色后再进行镜检。

该方法准确度高,需要的设备简单,是标定其他计数仪器的标准,尤其适合小样本快速、准确计数。但是,操作太繁琐,工作量大,连续计数时间过长,容易因视觉疲劳而出错。

在上述镜检的基础上经过改进得到了荧光显微镜计数法^[18],用特制的染液进行样品处理,然后用装有合适滤色镜的荧光显微镜进行计数,最后计算出细胞含量。该方法改进点是荧光细胞很容易与周围背景相区别,视野中的细胞容易被识别。但是,制片的过程仍然繁琐费时,不能解决大量样品集中测试的问题。

1.2 荧光电子细胞计数法 牛奶中的细胞进行荧光染色处

理后,让其通过1个狭窄的流路系统,让体细胞逐个通过,牛奶样品在观察室里暴露出蓝色的光,蓝色光激发荧光染色,使得体细胞发出红色光,红色光放大就可以被光电倍增器作为光脉冲计数出来^[19]。该方法的优点是速度快、操作简单、重复性好,可集中测定大量样品,是大型牧场监控牛群健康状况的很好方法。目前市场上已有此类仪器出售,并得到成功地应用,如丹麦Foss公司的Fossomatic系列牛乳体细胞分析仪、荷兰的Delta牛奶体细胞测定仪、美国Bently计数仪等。但是,价格昂贵,一般每台售价在5万美元以上,另外荧光染色剂有致癌的作用。

1.3 库尔特计数仪计数法 库尔特计数仪内设有2个电极,当牛奶中的粒子通过电极狭缝时,由于电阻增加而改变了原来液体的高导电性,电阻增加,电压上升,产生了一个相当于粒子大小的电脉冲,而脉冲的数量则反映了通过狭缝的粒子数量^[20]。因为原先已经设定了脉冲的临界水平,所以只有高于该水平的脉冲才被自动记录下来。库尔特计数仪可直接读出每毫升样品中的体细胞数。该方法检测时间短,结果准确。但是,该计数仪在使用前需要进行校正,还必须保证每份样品的测定时间相同,并且前处理繁琐且时间较长。

2 间接细胞计数检测法

2.1 CMT检测法及其衍生检测法 美国加州奶牛乳腺炎检测方法(California mastitis test,CMT)^[21],是一种常用的方法,其检测原理为:乳汁细胞表面活性物质—烷基或烃基硫酸盐在碱性药物作用下,脂类物质被乳化,细胞被破坏,释放出的DNA和RNA与测试剂相互作用产生沉淀或形成凝块,根据牛奶中沉淀或凝块的多少间接判定乳汁中细胞数的含量范围,从而达到诊断的目的。该方法对乳腺炎的检出率较高,可在现场使用,具有快速、敏感、价格便宜,试验所需设备少、方法简单,结果较为准确,适用于大范围推广,但是其检测结果只是体细胞的相对数量,操作人员也需要一定的技能。根据这个原理也衍生出了许多类似的方法,美国威斯康

辛州奶牛乳腺炎检测法(Wisconsin mastitis test, WMT)、日本的 PL 法;北京的 BMT 法、上海的 SMT 法、黑龙江的 HMT 法、兰州的 LMT 法、杭州的 HMT 法、吉林的 JMT 法等^[22]。

2.2 DNA 含量测定方法 牛奶体细胞被破坏后,释放出的 DNA 含量和体细胞数成正比。Urbanova 等^[23]研究了 DNA 含量与体细胞含量之间的关系。通过孔径为 2~5 μm 的硝化纤维膜将体细胞从牛奶中分离出来,用二苯胺等吡啶试剂对分离膜进行处理,让体细胞中的 DNA 释放出来。利用分光光度计测定 DNA 的含量,并用 8 mg DNA 相当于 100 万个体细胞的数量关系将 DNA 转化为体细胞数。该方法测定的结果与标准显微镜检测结果的相关系数达到了 0.997。这种方法与 CMT 法不同之处在于检测的精度有了较大的提高,但是这种方法操作比较繁琐,而且只能在实验室内进行,现场应用较为困难。

2.3 粘度测试法 粘度测试法^[24]与 CMT 法的原理类似,将细胞裂解后释放出来的 DNA 和组蛋白跟牛奶会形成一种胶状的混合物质,这种混合物的粘度和细胞含量成正比,通过检测粘度可以计算出细胞含量。Alan^[25]等研究也发现 DNA 的浓度与牛奶的粘度呈正比。唐平^[26]等研究了牛奶体细胞数、温度、处理时间和缓冲液 pH 值对牛奶粘度的影响,结果表明细胞含量对粘度影响最大,5 个不同的温度下牛奶粘度与体细胞数都存在良好的线性关系,线性相关系数都在 0.99 以上。

粘度检测方法一般在实验室内进行,对样品前期处理比较繁琐,而现场应用则比较困难。

2.4 ATP 生物发光技术检测法 ATP 生物发光法技术是基于细胞内的 ATP 在荧光素酶的作用下荧光素与 ATP 结合产生的荧光和 ATP 浓度成正比来定量测定 ATP 的浓度,再根据体细胞中 ATP 的浓度与体细胞数成正比的关系,推算出牛奶中的体细胞数^[27]。这种检测方法的影响因素较多,还存在检测精度低的问题。

2.5 电导率 EC 和酸碱度 pH 检测法 在电检测方法中,电导率 EC 和 pH 检测已经分别单独作为检测奶牛乳腺炎的手段,二者原理相同,都是检测牛奶中的导电离子的浓度,只是 EC 检测牛奶中多种离子的浓度,而 pH 检测法只能检测 H^+ 的浓度。Francisco 等研究了不同体细胞含量牛奶的电导率变化,但是体细胞数(SCC)和电导率 EC 的相关性却较差,相关系数仅为 0.503 6,电导率不能很好地反映牛奶体细胞的含量^[26]。

pH 检测法本身就是奶牛乳腺炎诊断的指标,但是牛奶的 pH 与细胞含量有一定的相关性。刘文进等^[28]研究了隐性乳腺炎奶牛乳汁 pH 变化与体细胞数目的关系,结果表明了牛乳汁 pH 的变化与体细胞数呈正相关,可以用 pH 来间接衡量奶牛体细胞的含量,但是 pH 值在 6.6~6.8 的牛奶不能直接以 pH 的大小判为阳性,还需要用其他方法辅助才能确诊。

2.6 介电常数法 Grillo 等^[29]用牛奶的介电常数来估计牛奶中的体细胞含量,并以此来进行乳腺炎的诊断,发现检测的结果比电导率法稍好,其原理是当体细胞处于频率较低的

极化电场时将不会被极化,体细胞的介电常数较低;当体细胞处于某个与其形态有关的频率电场下时,细胞将会被极化,细胞内的离子将随着电场震动,这会使体细胞的介电常数明显增大。通过比较在这 2 个频率下牛奶的介电常数,即可估算出牛奶中的体细胞浓度。

2.7 生物芯片或微控检测方法 近年来,随着微控流技术和生物芯片的出现和发展,生物微传感器的应用领域也越来越广泛,芯片上的实验室(Lab-on-a-chip)概念的提出也为牛奶体细胞含量的检测提供了新方法。Moon 等^[30]研发了 1 种一次性检测生物芯片并且配合便携式的细胞含量读数系统,可以实现牛奶体细胞含量的检测,其基本的检测原理是用细胞裂解液将细胞膜打破,然后用荧光对 DNA 进行染色,由虹吸作用均匀地分布在芯片内,系统对荧光进行检测细胞含量。

Garcia 等^[31]研发了 1 种快速、低成本的微流检测装置用来检测细胞的含量。牛奶加入 1 个有漏斗形管道的塑料盘中,离心后根据形成的细胞团高度来确定牛奶中细胞含量,这种检测装置的检测结果与传统的细胞检测方法有很好的相关性。

基于生物芯片或微控检测方法的牛奶体细胞含量的研究,其检测精度较高,但目前研究还仅限于实验室内,面向现场环境的应用还较少,商业化还有很长的一段路要走。

3 存在的问题及展望

3.1 存在的问题 直接细胞计数法具有细胞含量检测准确的优势,但是其主要问题是大多数检测过程较为繁琐,工作量大,自动化程度不高;而自动化程度高的检测方法设备的费用又太高,不能大范围推广,其应用主要局限在大型的检验中心和经济实力雄厚的大型奶厂和牛奶加工企业。

间接细胞计数法具有操作简单、工作量较小、检测成本低的特点,同时大多数基于这种方法的技术可以集成到自动化挤奶装置中,实现在线检测,其主要缺点是检测的精度不高,容易出现误诊。

3.2 研究展望及应用前景 随着微控流技术和生物芯片的出现与发展,将微控检测方法和生物芯片检测法应用到奶牛乳腺炎的检测上,有望很好地解决这方面的检测问题,国外的研究报道较少,国内还未见报道,进一步的开展这方面的研究具有重要的意义。特别是利用细胞的电容效应、阻抗测试等,设计不同结构的微传感器或生物芯片来降低背景噪声,极有可能解决细胞含量检测的问题。这种检测方法的优点是传感器制作成本低、检测精度高、可现场检测。因此,适用于从散养户到大型牛场的任何规模的检测,是最具有应用前景的研究方向之一。

参考文献

- [1] MUNGUBE E O, TENHAGEN B A, REGASSA F, et al. Reduced milk production in udder quarter with subclinical mastitis and associated economic losses in crossbred dairy cows in Ethiopia[J]. Tropical Animal Health and Production, 2005, 37(6): 503-512.
- [2] VIGUIER C, ARORA S, GILMARTIN N, et al. Mastitis detection current trends and future perspectives[J]. Trend in Biotechnology, 2009, 27(8): 486-493.

(2)通过对8个监测点处地表水和地下水 $\text{NH}_3 - \text{N}$ 浓度和 I_{Mn} 线性回归分析,发现两者 I_{Mn} 相关度为 0.335 4,中度相关; $\text{NH}_3 - \text{N}$ 浓度相关系数仅为 0.288 3,相关度低。

(3)经调查,造成区内水污染问题的主要污染源为生活污水及粪便废水。此外,排水系统的不完善和建筑风格的限制也是造成水污染不可忽视的原因。

(4)综合以上调查发现及对地下水重要性的认识,笔者认为要解决该古镇区地下水污染问题,除了要加强地下水重要性的宣传工作,培养当地居民对水资源重要性的认识,做好水污染预防工作,也要加强政府相关部门对当地水体污染现象监督管理职责。同时严格遵守国家政府颁布的相应法律法规,以法律强制执行手段制约居民污水乱排行为。最重要的是要加大当地水体污染监测工作力度,改善当地污水排放现状,完善区域污水排放系统建设,结合地形建造污水处理站收纳处理污水,将污水治理工作落到实处,尽快从根

本上解决当地居民污水排放难和水体污染两大难题^[8]。

参考文献

- [1] CHEN K. Discussion on the construction of negotiation mechanism of cross-boulder water pollution treatment in Changjiang River[J]. Meteorological and Environmental Research, 2010, 1(12): 91-95.
 - [2] WAN Y L, ZHANG B, WU C D. Analysis on the pollution characteristics of surface runoff in Zhenjiang City[J]. Meteorological and Environmental Research, 2011, 2(5): 76-78.
 - [3] 国家环境保护总局, 国家质量监督检验检疫总局. 地表水环境质量标准[S]. 北京: 中国环境科学出版社, 2002.
 - [4] 国家技术监督局. 地下水质量标准[S]. 北京: 中国标准出版社, 1994.
 - [5] 付雁鹏, 高嘉瑞. 模糊数学在水质评价中的应用[M]. 武汉: 华中工学院出版社, 1986.
 - [6] 王学仁, 温忠彝. 应用回归分析[M]. 重庆: 重庆大学出版社, 1989.
 - [7] 吕伟娅, 方玉妹, 陈才华, 等. 江南水乡古镇区生活污水收集与管道敷设问题探讨[J]. 给水排水, 2010(1): 81-86.
 - [8] 李君, 常莉. 我国城市地下水污染状况与治理对策[J]. 开封大学学报, 2006, 20(4): 89-91.
-
- (上接第 2975 页)
- [3] RIFFON R, SAYASITH K, KHALIL H, et al. Development of A rapid and Sensitive Test for Identification of major Pathogens in Bovine Mastitis by PCR[J]. J Clin Microbiol, 2001, 39: 2584-2589.
 - [4] 伊岚. 奶牛乳房炎 MTT 检测方法的建立和药敏实验研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学动物科技学院, 2006.
 - [5] MALEK DOS REIS C B, BARREIRO J R, MORENO J F G, et al. Evaluation of somatic cell count thresholds to detect subclinical mastitis in Gyr cows[J]. J Dairy Sci, 2011, 94: 4406-4412.
 - [6] JANZEKOVIC M, BRUS M, MURSEC B, et al. mastitis detection based on electric conductivity of milk[J]. Journal of Achievements in Materials and Manufacturing Engineering, 2009, 34(1): 39-46.
 - [7] CHAGUNDA M G G, FRIGGENS N C, RASMUSSEN M D, et al. A model for detection of individual cow mastitis based on an indicator measured in milk[J]. Journal of Dairy Science, 2006, 89(8): 2980-2998.
 - [8] SATO T, KAWANO S, IWAMOTO M. Detection of Foreign Fat Adulteration of Milk Fat by Near Infrared Spectroscopic Method[J]. J Dairy Sci, 2000, 73(3): 3408-3413.
 - [9] 项智锋. 近红外线光谱分析检测奶牛乳房炎 LDH 值研究[J]. 光谱实验室, 2008, 25(4): 633-634.
 - [10] 宋宣明, 彭远义, 俞纯才, 等. 不同季节奶牛乳清电泳与隐性乳腺炎的关系[J]. 四川畜牧兽医, 1994(3): 23-25.
 - [11] NIELSEN B H, JACOBSEN S, ANDERSEN P H, et al. Acute phase protein concentration in serum and milk from healthy cows, cows with clinical mastitis and cows with extramammary inflammatory conditions[J]. The Veterinary Record, 2004, 154: 361-365.
 - [12] KAUF A C W, KENSINGER R S. Purification of Porcine β -Ca-sein, N-Terminal Sequence Quantification in Mastitic Milk[J]. Journal of Animal Science, 2002, 80(7): 1863-1870.
 - [13] HOVINEN M, SIIVONEN J, TAPONEN S, et al. Detection of Clinical Mastitis with the Help of a Thermal Camera[J]. J Dairy Sci, 2008, 91: 4592-4598.
 - [14] RASMUSSEN M D, BJERRING M. Visual scoring of milk mixed with blood[J]. J Dairy Res, 2005, 72: 257-263.
 - [15] 顾有方, 陈继红, 陈会良, 等. 奶牛隐性乳房炎与被毛中 Zn、Cu、Mn 含量的关系[J]. 动物医学进展, 2005, 26(3): 82-83.
 - [16] KEISLER D H, ANDREWS M L, MOFFATT R J. Subclinical mastitis in ewes and its effect on lamb performance[J]. Journal of Animal Science, 1992, 70: 1677-1681.
 - [17] 丘通强, 林少宝, 吴焕贞. 鲜牛乳中体细胞数检测方法探讨[J]. 现代食品科技, 2005(21): 158-160.
 - [18] MILLER R, PAAPE M J. Comparison of milk somatic cell counts by Coulter and Fossomatic counters[J]. J Dairy Sci, 1986, 69: 1942-1946.
 - [19] GONZALO C, MARTINEZ J R, CARRIEDO J A, et al. Fossomatic cell-counting on ewe milk: comparison with direct microscopy and study of variation factors[J]. J Dairy Sci, 2003, 86: 138-145.
 - [20] 史慧茹, 姜瞻梅, 田波. 牛乳体细胞数的检测方法[J]. 奶牛专栏, 2008(2): 86-88.
 - [21] 郑浩, 高飞, 徐晔, 等. 应用上海乳房炎检测法检测奶牛隐性乳房炎[J]. 畜牧与兽医, 2006, 38(1): 47-48.
 - [22] 潘文, 孙志文, 安国锋, 等. 奶牛隐性乳房炎检测方法的比较试验[J]. 黑龙江畜牧兽医, 1991(5): 26-27.
 - [23] URBANOVÁ E, SEDINOVÁ V, SKARDA J, et al. Use of the Synpor membrane filter for the separation and determination of the number of somatic cells in the milk of dairy cows using the indole DNA filtration method[J]. Vet Med, 1985, 30(7): 409-418.
 - [24] WHYTE D, WALMSLEY M, LIEW A, et al. Chemical and rheological aspects of gel formation in the California mastitis test[J]. J Dairy Res, 2005, 72: 115-121.
 - [25] GOODMAN A, TSENG Y, WIRTZ D. Effect of Length, Topology, and Concentration on the Microviscosity and Microheterogeneity of DNA Solutions[J]. Journal of Molecular Biology, 2002, 323: 199-215.
 - [26] 唐平. 牛乳体细胞快速检测方法的研究[D]. 杭州: 浙江大学生物系统工程与食品科学学院, 2006: 20-29.
 - [27] 管勇佳, 富鑫, 陈晓义, 等. ATP 生物发光技术快速检测牛乳体细胞数[J]. 中国乳品工业, 2010, 38(9): 49-50.
 - [28] 刘文进, 陈创夫, 滕文军, 等. 患隐性乳房炎的奶牛乳汁 pH 变化与体细胞关系的研究[J]. 中国畜牧兽医, 2005, 32(3): 19-22.
 - [29] GRILLO G J, PEREZ M A, ANTON J C, et al. Direct-Evaluation of the Fresh-Milk Somatic Cell Concentration (SCC) through Electrical Permittivity Measurements[C]//IEEE Instrumentation and Measurement Technology Conference Anchorage, AK, USA, 2002: 153-157.
 - [30] MOON J S, KOOH C, JOO Y S, et al. Application of a New Portable Microscopic Somatic Cell Counter with Disposable Plastic Chip for Milk Analysis[J]. J Dairy Sci, 2007, 90(5): 2253-2259.
 - [31] GARCIA CORDERO J L, RICCO A J. A milk analysis microfluidic apparatus for detecting mastitis in a milk sample by isolating somatic cells suspended therein in the form of pellets of cells using centrifugal sedimentation; US, 20100317094 A1[P]. 2010-10-16.