

使用牧场内细菌培养来促进乳房炎治疗

怎么开始，收集无菌牛奶样品，培养细菌和诊断结果

临床型乳房炎严重程度评分指引

临床型乳房炎是症状可见的乳房感染。感染等级、或者严重程度的判定可以帮助牛群经理来做治疗决策。患病程度和症状取决于许多因素，例如奶牛的营养或免疫状态、引起炎症的病原体、还有一系列的环境因素如卫生、湿度和环境温度。

中等到严重的临床型病例对奶牛来说会非常痛苦和不舒服。

不严重

① = 轻微



① + ② = 中等



① 不正常牛奶
水样牛奶，有结块或凝块。

② 不正常乳房
炎症征兆：肿胀，发热，
发硬，发红或疼痛。

严重

① + ② + ③ = 严重



③ 不正常行为
奶量下降，发烧，缺乏食欲，
眼睛下陷，腹泻，
脱水或活动量下降。

临床型乳房炎治疗程序

大群管理程序里的乳房炎检出和初始治疗决策

第一步、检出临床病例

由奶厅的挤奶技术人员执行

行动

1. 收集奶样
2. 弃掉不正常牛奶
3. 挤奶后把牛转到病牛圈

奶样做细菌培养:

1. 牧场内
2. 牧场外

第二步、严重程度评分

由受过训练的病牛圈管理人员执行

严重病例

症状扩散到乳房以外的部位

不严重病例

症状仅现于牛奶和乳房

第三步、初始行动

由受过训练的病牛圈管理人员执行

立即针对症状进行治疗

回顾奶牛的病史

第四步、针对不严重病例的初始决策

在细菌培养结果出来之前，奶牛转入病牛圈的时候，由病牛圈管理人员执行

抗生素治疗基本没有用

抗生素治疗可能有效

第五步、临床型病例管理

由开具处方药和标签外用药的兽医来监督制定流程、由受过训练的病牛圈管理人员执行

选用非抗生素病例管理

基于细菌培养结果治疗

- 选项1: 延时处方
选项2: 即时处方

选项3: 针对症状的处方药乳房内注射1-3天

临床型乳房炎治疗流程

挤奶工检出临床型乳房炎。严重程度评分已确定。

不严重临床型病例

使用牧场内细菌培养。把牛转入病牛圈并弃奶。

严重临床型病例

不要做培养。根据兽医设计的流程立即治疗。

延时治疗

在开始抗生素治疗之前等待24小时看细菌培养结果。

即时治疗

立即开始乳房内注射的短时治疗，并在24小时之后根据细菌培养结果来调整治疗。

24小时之后获得细菌培养结果

24小时之后获得细菌培养结果

不要使用乳房内注射抗生素，除非奶牛的病史显示其免疫系统受损。在牛奶恢复正常之前弃奶（通常4-6天）。

停止治疗。在牛奶恢复正常或抗生素弃奶期结束之前弃奶。

革兰氏阴性菌生长

不要使用乳房内注射抗生素，除非奶牛的病史显示其免疫系统受损。如果使用了抗生素，需要保证其对革兰氏阴性菌有效。

停止治疗，或者如果病史显示抗生素治疗有用的话，换成短时间内使用对革兰氏阴性菌有效乳房内注射药。

革兰氏阳性菌生长，
种类不确定

使用乳房内注射抗生素1-3天，
抗生素为窄谱抗生素。

使用窄谱抗生素进行乳房内注射1-3天后停止治疗。

革兰氏阳性菌生长，
且很有可能是凝固酶阴性葡萄球菌

使用乳房内注射抗生素1-3天，
抗生素为窄谱抗生素。

使用窄谱抗生素进行乳房内注射1-3天后停止治疗。

革兰氏阳性菌生长，
且很有可能是链球菌属

根据奶牛病史选择使用短时或长时的乳房内注射。

如果短时治疗合适的话就不再需要进行乳房内注射。如果奶牛病史显示长时治疗比较有效的話就继续进行乳房内注射。

革兰氏阳性菌生长，且很有可能是金黄色葡萄球菌

在选择治疗方案之前回顾奶牛病史。

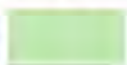
治疗完成之后隔离奶牛。

不要治疗有慢性临床型或亚临床型感染病史的奶牛

不严重临床型乳房炎治疗方案

在基于细菌培养治疗不可用、但根据奶牛病史显示抗生素治疗有效的情况下，
对不严重临床型乳房炎病例使用乳房内（IMM）抗生素注射治疗的考量

第一选择



第二选择



第三选择



奶牛病史		治疗方案优先度		
		观察等待（不使用乳房内IMM抗生素注射）	短时（1-3天）IMM注射	长时（4-8天）IMM注射
胎次	1-2	第二选择	第一选择	第三选择
	≥3	第三选择	第一选择	第二选择
月SCC > 200,000个细胞/毫升	≤2	第二选择	第一选择	第三选择
	3+	第三选择	第二选择	第一选择
泌乳阶段（泌乳天数DIM）	≤60	第三选择	第一选择	第二选择
	>60	第二选择	第一选择	第三选择
对上一次同一乳区的临床型乳房炎是否有治疗	否	第二选择	第一选择	第三选择
	是	第三选择	第二选择	第一选择

牧场内细菌培养实验室设置

牧场内细菌培养需要一个指定的工作空间。理想状态下，应该是一个干净、明亮的房间，并处于交通少的区域。应有足够的实验台和储存空间，并易于消毒。出于健康理由，食物不能带进这个区域。

清单

培养箱

- 应购买一个小型培养箱为细菌提供一个理想的生长环境。
- 培养箱温度设在37摄氏度或98.6华氏度（体温）。
- 培养箱应时刻放置一个温度计，并应每天检查温度。
- 湿度应保持在75%，可以在箱中放一碟水。每天检查水位并按需补充。

冰箱

- 应购买一个冰箱来储存培养基和奶样。这个冰箱不能用于人类或动物食物的储存。

设备

- 牧场内细菌培养使用无菌棉签进行奶样涂板，而不是像牛奶质量实验室那样使用无菌接种环。如果把棉签浸泡在奶样里10秒之后涂板的话，那么预计用于涂板的牛奶体积为0.1毫升。
- 处理实验室材料时应始终佩戴一次性手套。
- 培养板
- 浸泡在70%酒精中的纱布块，用于消毒乳头和实验台。
- 一次性奶样瓶
- 奶样瓶支架
- 油性记号笔
- 生物危害品袋
- 含氯消毒水（漂白水）
- 一个加冰的冷藏箱用于从牛场运送样品到实验室区域。

废品处理

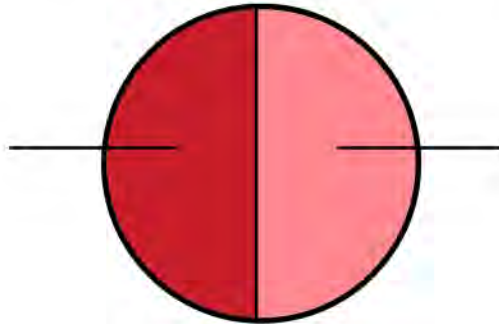
- 实验室设置还需要考虑到的就是废品处理。在任何时候丢弃受感染材料，如奶样和培养板，都要使用橙色生物危险品袋。
- 废品丢弃必要遵照当地法规。在某些地区，培养板在用含氯消毒水冲洗之后可以正常丢弃。
- 如果你对废品处理程序有疑问，咨询你们的牧场兽医。

选择培养基

二分板

结果：革兰氏阳性，革兰氏阴性菌，没有生长或受污染

Factor琼脂
革兰氏阳性菌生长

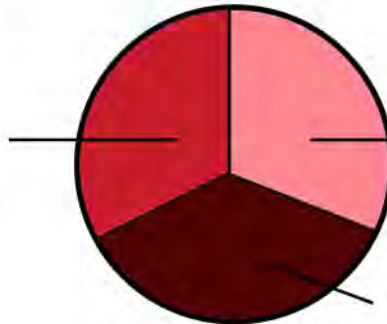


MacConkey琼脂
革兰氏阴性菌生长

三分板

结果：葡萄球菌，链球菌，革兰氏阴性菌，没有生长或受污染

Factor琼脂
革兰氏阳性菌生长



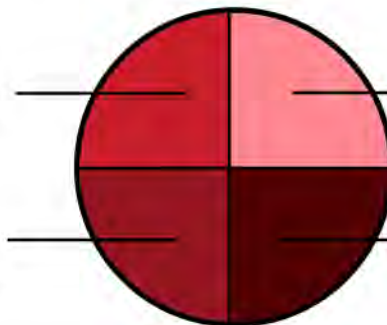
MacConkey琼脂
革兰氏阴性菌生长

MTKT琼脂
链球菌生长

四分板

结果：葡萄球菌，链球菌，革兰氏阴性菌，没有生长、受污染或其他。

血液琼脂
大部分细菌生长



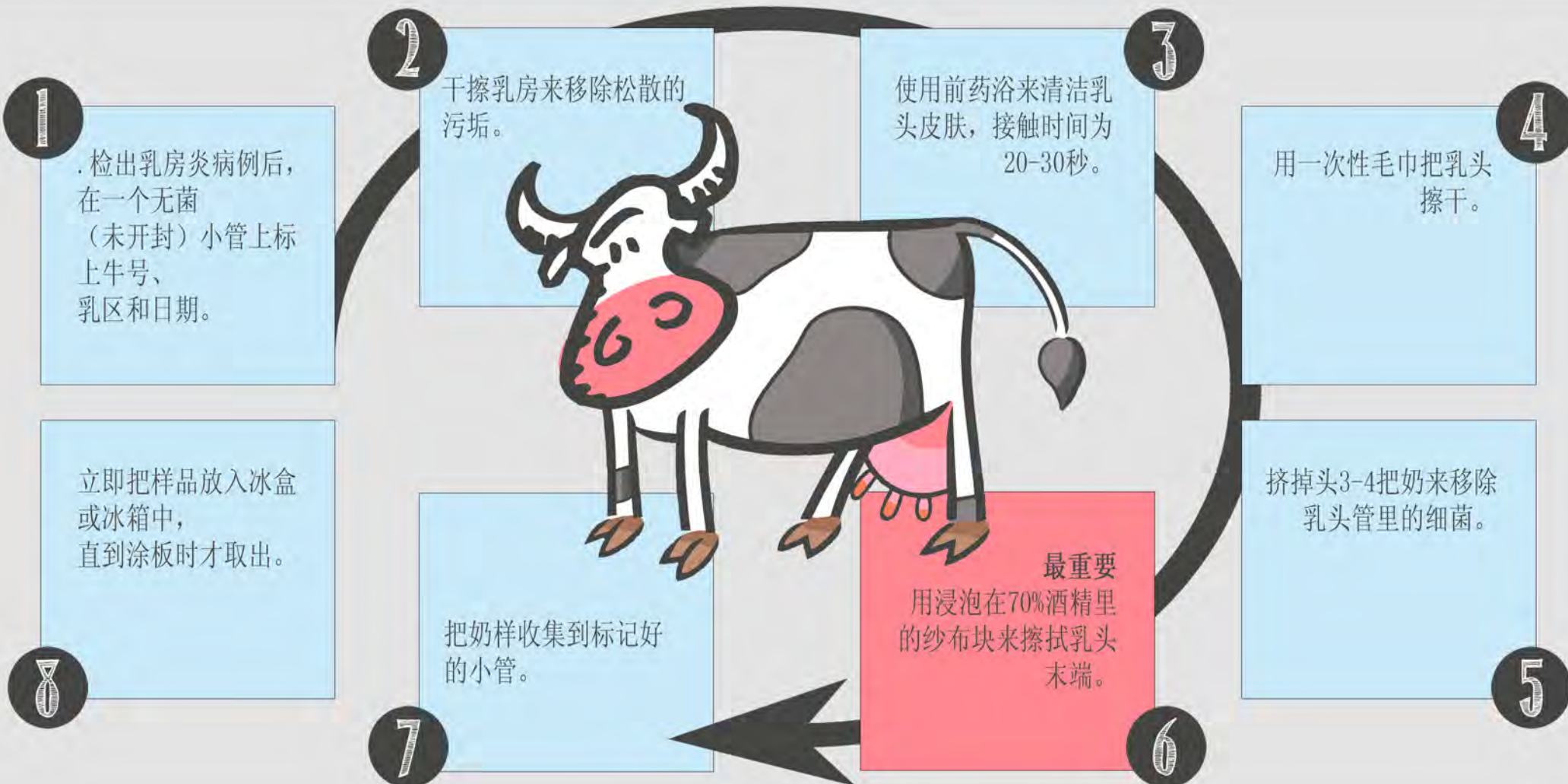
MacConkey琼脂
革兰氏阴性菌生长

Factor琼脂
革兰氏阳性菌生长

MTKT琼脂
链球菌生长

如何收集无菌奶样

執行農場培養的整個過程完全依賴於如何以及採集奶樣。
如果未正確地執行這個步驟，則該過程的其餘部分將是沒有意義的。請按照以下步驟幫助收集無菌奶樣。



如何收集无菌奶样

1

检出乳房炎病例后，
在一个无菌
（未开封）小管上标
上牛号、
乳区和日期。

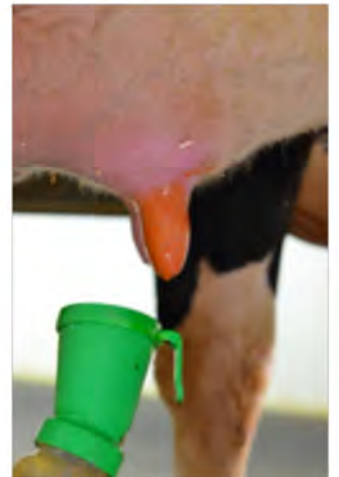


2

干擦乳房来移除松散的
污垢。

3

使用前药浴来清洁乳头
皮肤，接触时间为
20-30秒。



4

用一次性毛巾把乳头擦
干。

5

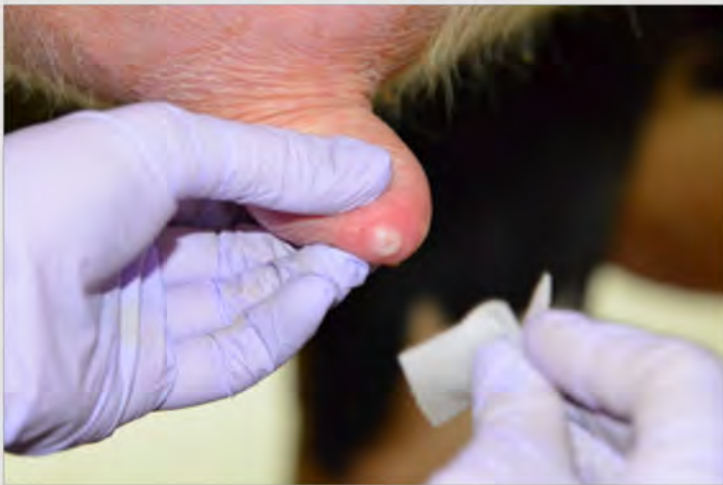
挤掉头3-4把奶来移除
乳头管里的细菌。



如何收集无菌奶样

6

最重要
用浸泡在70%酒精里
的纱布块来擦拭乳头
末端。



7

把奶样收集到标记好
的小管。



8

立即把样品放入冰盒或
冰箱中，直到涂板时才
取出。



如何设置培养板

在涂板之前，保证所有设备都齐备和可用：

- 培养板
- 无菌棉签
- 牛奶样和样品架
- 干净的一次性手套
- 浸泡在70%酒精中的纱布

用纱布和70%酒精来去除细菌、清洁工作空间，否则可能会污染细菌培养板。在设置培养板的时候，确保洗过手和佩戴干净的一次性手套。

把冰冻的样品解冻至室温。这样需要在涂板前至少一个小时把样品从冰柜里拿出来放置在实验桌上。不要用热水或者微波炉来解冻样品。

在培养板边上记下牛号、受影响乳区和日期。

通过颠倒奶样瓶数次来让奶样完全混匀。把一根无菌棉签浸泡到奶样中并等待5秒，让棉签完全饱和。通过来回移动棉签从上到下把培养板的其中一个区涂满。再次把同一根棉签浸泡在奶样中，把另一个区涂满。涂完所有区之后，立即盖上培养板的盖子，也盖上奶样瓶的盖子防止污染。

把奶样放回冰柜为之后的确认检测作准备。

让培养板水平静置在工作台上5-10分钟，让奶样渗透进琼脂。

把所有培养板反过来，让琼脂处于顶部，这样冷凝水集中在盖子上，而不会滴在琼脂里影响细菌生长。

把这些反过来的培养板放入37摄氏度（98华氏度）的培养箱24小时。细菌需要至少24小时来生长，才能用于结果观察。

丢弃所有垃圾和消毒工作台。

如何设置培养板

备好所有材料：

奶样

培养板

无菌棉签

手套

浸泡在70%酒精的纱布

生物危险品袋

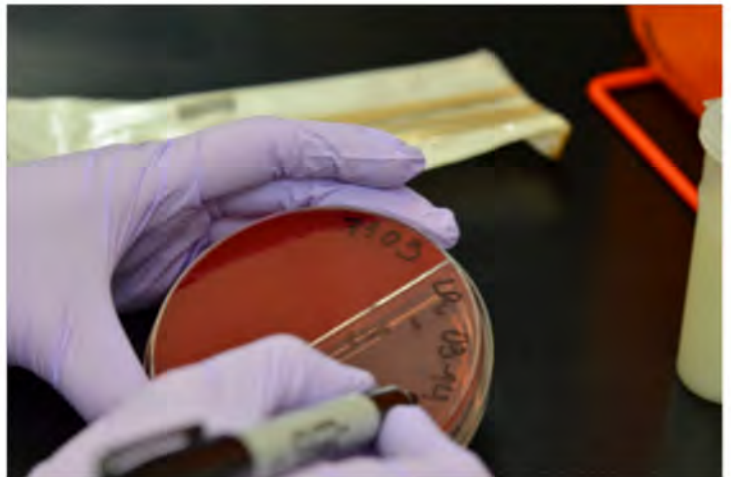


在一个新的培养板边上记下：

牛号

受影响乳区

日期



颠倒奶样瓶数次使奶样完全混匀。



如何设置培养板

把一根无菌棉签浸泡在奶样中，并旋转直到棉签完全泡满牛奶。



在培养板的一个区上做“之”字形涂板。



作另一个区的涂板前，把同一根棉签重新泡入奶样。



如何设置培养板

把剩下的区都作涂板。



把涂完板后的培养板反过来
(盖子朝向架子) 放置在培养箱里, 并在37
摄氏度的环境下培养18到24小时。



如何解读培养板

在牧场内作细菌培养的目的不单是为了培养细菌，还要保证我们的诊断是正确的，这样我们才能确认抗生素治疗是否会见效。

第一步：评价细菌生长

细菌必须在培养箱中生长24小时才能观察结果。24小时之后，第一个需要问的问题是：板里有细菌生长吗？

没有生长

这种结果有几个原因。第一个，这个乳区可能没有被感染，或者感染已经被体内免疫系统清除了。也有可能是因为错误的操作或是实验室出错导致没有生长。再有就是，有些挑剔的微生物需要特殊的培养基，例如支原体，能够引起感染但不会在常规培养板上生长。

第二步：细菌生长的解读

如果板上有东西生长，那么第二个要问的问题是：有多少不同的细菌菌落在上边？

受污染

如果有两种以上的菌落生长出来，那么培养板就是被污染了。如果发生了这样的情况，应使用合适的采样技术重新对乳区进行采样并培养。

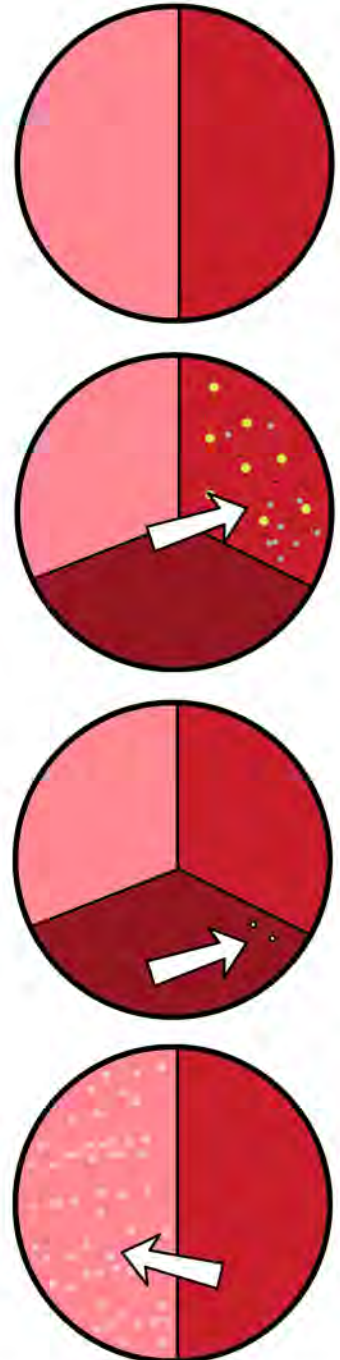
如果有1到2菌落种类，那么就需要计算‘菌落形成单位（cfu）’的数量。一个‘cfu’是一个小圆，通常是成长了的细菌。

无明显生长

每个菌落种类的cfu少于3-5个的话说明没有明显生长。这说明在培养板上的细菌数量太少，不足以形成乳房炎。

真感染

如果每个菌落种类的cfu超过3-5个的话，那么这是真感染，而且可以进行识别。有时真感染中夹杂着污染菌。只要污染菌没有明显生长，你都可以识别真感染。

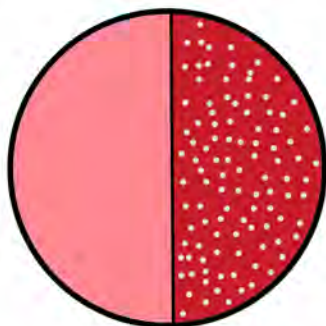


如何识别葡萄球菌菌种

辨别乳房炎的起因非常重要，因为不是所有乳房炎都能用抗生素来治。例如，革兰氏阳性菌，像金黄色葡萄球菌和凝固酶阴性葡萄球菌在奶牛身上行为不一样，对治疗的反应也不一样。识别菌种能够让我们对牛群乳房炎作出合适的治疗决策。其中一个方法是用牧场内细菌培养。

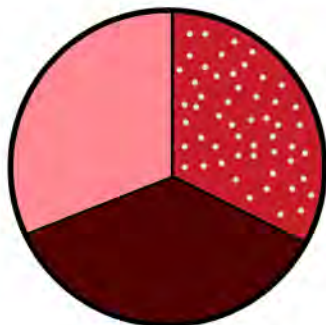
二分板

革兰氏阳性菌（只在Factor或血液琼脂上生长）



三分板

葡萄球菌（只在Factor或血液琼脂上生长）

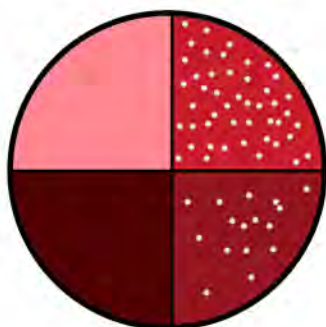


金黄色葡萄球菌（产生溶血区域）



四分板

葡萄球菌（在血液和Factor琼脂上生长）



污染

受污染的培养板（在所有琼脂上都能生长）

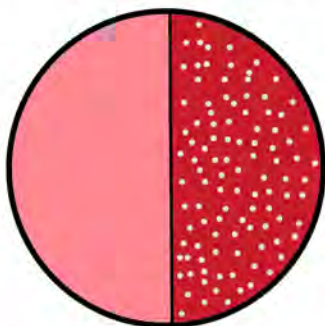


如何识别链球菌菌种

链球菌是乳房炎常见致病菌，也常与高体细胞数联系在一起，有些时候还和临床型乳房炎相关。链球菌是在正常环境下生长的革兰氏阳性菌。学习如何用二分板、三分板和四分板的选择性琼脂做牧场内细菌培养来识别链球菌。

二分板

革兰氏阳性菌（只在Factor或血液琼脂中生长）



三分板

链球菌（在Factor和MTKT琼脂中生长）

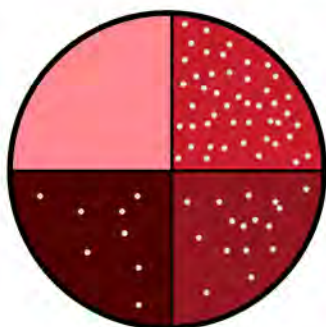


无乳链球菌（在MTKT中出现溶血区域）



四分板

链球菌（在血液、Factor和MTKT琼脂中生长）



污染

受污染培养板（在所有琼脂中生长）

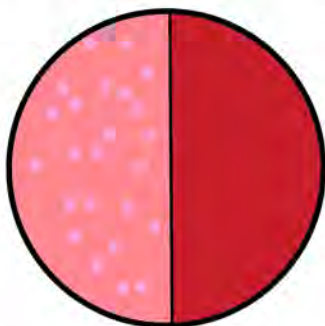


如何识别革兰氏阴性菌菌种

使用牧场内细菌培养的琼脂板不能区分革兰氏阴性菌的菌属（如大肠杆菌、克雷伯氏菌或肠杆菌属）。但是它们可以在MacConkey琼脂中通过乳糖发酵的颜色来分成乳糖阴性或乳糖阳性。革兰氏阴性菌引起的感染通常可以自愈。所以不总是需要使用抗生素。记住一点，在作判断时咨询当地的兽医总是会有用的。

二分板

革兰氏阴性菌（只在MacConkey和血液琼脂中生长）

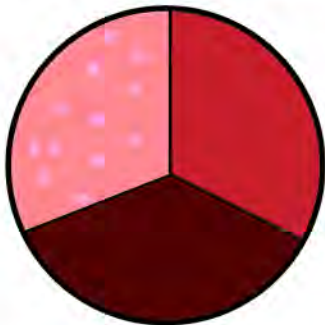


三分板

乳糖阳性（在MacConkey琼脂中生长并呈粉红色）

大肠杆菌

克雷伯氏菌



四分板

革兰氏阴性菌（只在MacConkey和血液琼脂中生长）



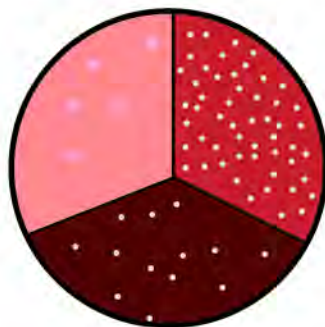
乳糖阴性（在MacConkey琼脂中生长并呈白/黄色）

肠杆菌属



污染

受污染的培养板（在所有琼脂中生长）



哪里有可能出错？

污染

牧场内培养实验很容易发生的一个问题是采样、处理或涂板阶段的污染。选择性培养基可能较难检测出污染，因为很多污染长不出来。减少受污染培养板最重要是要预防。

如果乳房没有在采样之前进行合适的消毒，乳头、牛尾或是其他来源的粪便接触到样品瓶，或是采样瓶在采样之后没有及时封闭，那么采样阶段的污染就会发生。

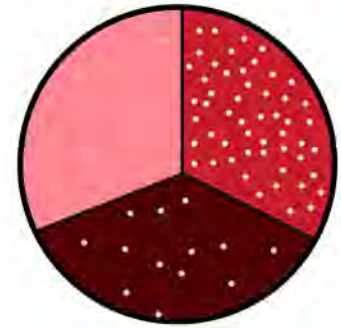
如果样品在运送到实验室的过程中没有放在冷藏箱，或是在涂板前放在室温超过1个小时，那么样品处理阶段的污染就会发生。

如果操作人员没有佩戴干净的一次性手套，无菌棉签接触到非无菌材料，或是培养板没有及时盖上，那么涂板阶段的污染就会发生。

基准：如果超过5%的培养板被污染了的话，就应该考虑无菌操作的评定，作适当的变动或培训。

污染

受污染的培养板（所有琼脂都有生长）



质量控制的失效

另一个能影响培养结果价值的问题是实验室流程质量控制的失效。

培养箱的温度应保持在37摄氏度或98.6华氏度。如果培养箱温度过低或过高，致病菌就不会生长良好。这会导致无生长样品或误诊。

培养箱的湿度也必须维持在高水平。箱内应有盛水的容器并及时补充来维持湿度来帮助细菌生长。

基准：牧场内培养结果应和牛奶质量实验室结果定期作对照来检测牧场内结果解读的质量。即使结果不会完全一致，但大约应有80%重合。

哪里有可能出错？

细菌生长的过度解读

在真正的诊断实验室里大约有25-40%的临床型乳房炎奶样会是没有生长没有明显生长的结果。在采样的时候或是在乳头皮肤上带出少量细菌是非常正常的，但是受污染培养板和没有明显生长的细菌不会被认为能引起乳房炎。如果是受污染培养板或是没有明显生长的结果的话，就不应该使用抗生素。

无明显生长
每个种类的菌落少于3-5cfu。



基准：只有当你有1到2个种类的菌落并且每个种类有至少3-5个菌落形成单位的时候，你才能明确地识别细菌并选择治疗方案。

没有合理运用信息

牧场内细菌培养实验室最常见的问题是牧场人员不使用培养结果来决定治疗方案。诊断试验的价值在于其基于干预措施所产生的经济价值。如果在实际决策的时候根本不考虑培养结果的话，那么实验室在牧场里应有的价值就得不到体现，抗生素的使用和成本就不会降低，培养也因此变得没有价值。

基准：跟你的兽医合作来设计并执行合理的牧场治疗流程。要记住，你的兽医和牛奶质量实验室是来为你提供帮助的。请务必联系他们以寻求帮助和信心，保证你的牧场内培养系统的质量。