

奶牛生鲜乳抗生素检测假阳性原因研究分析

侯引绪

北京农业职业学院畜牧兽医系, 北京

Email: hyx003@163.com

收稿日期: 2020年9月16日; 录用日期: 2020年10月5日; 发布日期: 2020年10月12日

摘要

奶牛生鲜乳中抗生素残留不仅影响乳制品加工质量, 而且危害人体健康。国家及乳品加工企业对此问题高度重视, 原料奶中的残留抗生素检测就成了各乳品加工企业的一个重要质量检测指标, 并对检测结果为抗生素残留阳性的原料奶实施严格的拒收措施。近年来, 不明原因性牛奶含抗假阳性问题表现较为突出, 给牛场带来的经济损失巨大, 也成了奶牛场关注的热点问题之一。本文在参阅相关奶牛生鲜乳抗生素检测假阳性问题研究资料的基础上, 结合笔者长期在奶牛临床一线的工作积累和临床研究, 针对奶牛生鲜乳抗生素检测假阳性问题, 从发生原因, 防控措施等方面进行了临床分析研究, 在此作以交流。

关键词

奶牛, 生鲜乳, 抗生素, 假阳性, 研究分析

Study on the Causes of False Positive Detection of Antibiotics in Cow Raw Milk

Yinxu Hou

Department of Animal Husbandry and Veterinary, Beijing Vocational College of Agriculture, Beijing

Email: hyx003@163.com

Received: Sep. 16th, 2020; accepted: Oct. 5th, 2020; published: Oct. 12th, 2020

Abstract

Antibiotic residues in dairy milk not only affect dairy processing but also harm human health. The state and dairy processing enterprises attach great importance to this problem. The detection of residual antibiotics in raw milk has become an important quality index for dairy processing enterprises. Strict rejection measures were also carried out for raw milk with positive test results for

antibiotic residues. In recent years, the problem of anti-false positive of milk containing unknown cause is more prominent, which brings huge economic loss to the dairy farm, and has become one of the hot issues concerned by the dairy farm. In this paper, with the research data on the false positive of antibiotics in cow raw milk, based on the author's long-term accumulation of work and clinical research in the dairy cow clinical front line, the author conducted a clinical analysis and research on the problem of false positive detection of antibiotics in dairy cow raw milk, from causes and prevention and control measures, etc. in here to communication.

Keywords

Cow, Raw Milk, Antibiotics, False Positive, Analysis

Copyright © 2020 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

“奶牛生鲜乳抗生素检测假阳性”，实际上就是由不明原因所致的奶牛生鲜乳含抗问题。此问题是奶牛养殖者关心的一个热点话题，不论什么原因导致的生鲜乳抗生素检测“假阳性”，乳品加工企业都将拒收此类生鲜乳，从而给奶牛场造成重大经济损失。本文对导致奶牛生鲜乳呈现所谓“假阳性”的原因进行了临床研究分析，力图为奶牛场防控奶牛生鲜乳检测“含抗假阳性”提供参考和帮助。

2. 生鲜乳抗生素检测假阳性表现特点

抗生素检测假阳性乳就是由不明原因所致的抗生素检测阳性乳，其表现特点是泌乳牛群在疾病治疗过程中未使用任何抗生素，或使用抗生素的剂量、用法等无不当之处；也排除了生鲜乳被抗生素污染的问题，同时也不存在检测操作不正确等外在因素影响。

笔者(2019)通过对奶牛含抗假阳性牛群临床研究表明，含抗假阳性问题在发病牛群中往往呈不确定的偶发性和间断性发生现象，有些牛群经1周左右时间会自行恢复正常，有些牛群或牛场，含抗假阳性问题在一段时间内反反复复在牛群中发生，找不出病因。笔者(2019)在北京市房山区某奶牛场，针对发病牛群的检测结果表明，发病牛群中部分牛刚挤出的牛奶呈抗生素检测阳性，阳性率可达10%~20%。

3. 生鲜乳抗生素检测假阳性问题分析

3.1. β -内酰胺类抗生素检测假阳性分析

β -内酰胺类抗菌素包括头孢类抗菌素和青霉素类抗菌素，头孢菌素和青霉素类抗菌素分子结构中都含有 β -内酰胺环，所以将其称为“ β -内酰胺类抗菌素”， β -内酰胺环是头孢类抗菌素和青霉素类抗菌素杀灭细菌的核心功能结构。各种 β -内酰胺类抗菌素的作用机制相似，依靠 β -内酰胺成份抑制细菌胞壁肽合成，使细菌胞壁缺损，菌体膨胀裂解[1]，头孢菌素类和青霉素类同属 β -内酰胺抗菌素，不同的是头孢菌素类的母核是7-氨基头孢烷酸(7-ACA)，而青霉素的母核为6-氨基青霉烷酸(6-氨基头孢烷酸、6-APA)。头孢菌素具有抗菌谱广、抗菌作用强、耐青霉素酶、过敏反应较青霉素类少见等优点，所以头孢菌素类被广泛应用于牛病防治临床[2]，临床使用的头孢类抗菌素约有30种[3]。青霉素类抗菌素在临床治疗上应用也很广，包括青霉素、天然青霉素及其盐、氯唑西林、苯唑西林、氨苄西林，阿莫西林，阿莫西林

克拉维酸钾、苄星邻氯青霉素等一系列青霉素类抗生素。

3.2. 生鲜乳 β -内酰胺类抗菌素的检测原理

3.2.1. 微生物检测法(TTC)

TTC (英文名 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride)检测法是我国鲜奶中抗生素残留检验标准(GB4689.27-94)的检测法,属生物检测法。其测定原理基于抗生素对微生物的抑制作用。如果牛奶中含有抗生素,则加入菌种(嗜热链球菌)经培育 2.5~3 h 后,加入 TTC 指示剂(三苯基四氮唑)不发生还原反应,所以样品呈无色状态;如果牛奶中不含抗生素,加入 TTC 指示剂,则样品呈红色,即样品颜色不变的为阳性,样品染成红色的为阴性。TTC 检测法在生产一线人员被通俗的称为“慢抗检测法”。

3.2.2. β -内酰胺类抗生素快速检测法

β -内酰胺类抗生素快速检测试纸条基于胶体金免疫层析技术,用于生鲜乳中含 β -内酰胺类抗生素残留或超标生鲜乳的快速筛查,其原理是通过检测乳样中所含 β -内酰胺成份的多少,确定是否含有 β -内酰胺类抗生素或含量超标。 β -内酰胺类抗生素快速检测法也叫试剂盒检测法、试纸条检测法,生产一线人员常将其称为“快抗检测法”。

3.3. β -内酰胺类抗菌素检测假阳性原因分析

不论 TTC 检测法还是胶体金层析快速检测法,都是经过科学验证的可靠检测方法。在检测方法、操作过程正确的情况下,生鲜乳中 β -内酰胺类抗菌素检测呈阳性,说明乳中一定含有 β -内酰胺类抗菌素或类似物质。奶牛养殖者找不出导致乳中 β -内酰胺类抗菌素检测呈阳性的具体原因,难以接受或解释乳中 β -内酰胺类抗菌素检测阳性这一结果,所以将正确的检测结果称为“假阳性”。

物质不灭定律告诉我们“物质不会无缘故的产生,也不会凭空消失,只能从一种状态转化成另一种状态”。研究分析乳中出现抗菌素“假阳性”的生理原因,才是防控乳中抗生检测“假阳性”问题的核心。

3.3.1. 奶牛瘤胃内环境及微生物区系变化是产生 β -内酰胺类抗菌素呈显“假阳性”的一个重要原因

青霉素是人类发现的第一个抗生素,青霉素来源于青霉菌,青霉菌是属于青霉属的一个真菌。由此可见,天然青霉素来源于真菌,为真菌分泌产物。

意大利科学家朱塞佩在萨丁岛海岸的一个排污口处发现了一株能产生抗菌物质的顶头孢,他的分泌物可以抑制金黄葡萄球菌。英格兰的亚伯拉罕通过化学方法去除其天然侧链,再用人工合成的侧链对其进行修饰,获得了具有更好抗菌活性的物质(7-氨基头孢烷酸、7-ACA) [4]。顶头孢也是一种真菌,由此可见,头孢菌素的天然成份来源于真菌,导致生鲜乳 β -内酰胺类抗菌素检测呈现假阳性的原因也与真菌有关。

牛瘤胃微生物主要由瘤胃细菌、原虫、真菌组成。真菌在反刍动物对粗纤维饲料的消化中起着重要作用。瘤胃中已有 15 种厌氧真菌分离成功,瘤胃中厌氧真菌游动孢子数为 $10^3\sim 10^5/\text{mL}$,瘤胃真菌的生物量约占瘤胃微生物总量的 8%~12% [5]。真菌能够分泌多种纤维素酶和半纤维素酶,菌丝可以穿透植物组织并在其内部生长繁殖、裂解植物组织。在无瘤胃细菌存在条件下,瘤胃真菌能可完成粗纤维饲料中 62% 的干物质降解[6]。反刍动物之所以能够大量采食木质纤维含量高的植物茎秆类饲料,就是依靠瘤胃细菌、真菌及瘤胃原虫所分泌的多种纤维素酶、木质素酶、半纤维素降解酶的协同作用完成的。厌氧真菌会优先附着于植物材料表面,通过真菌假根对植物细胞壁的降解作用而进入植物纤维管组织内,这种物理性降解,能够削弱木质化组织的抗性,穿透植物表皮角质层屏障,使得内部的成分暴露,更容易接触瘤胃微生物产生的降解酶[7]。另外,真菌在植物材料内部扩张,使植物纤维变疏松,更加利于其它微生物与

植物材料的接触。在降解植物细胞壁的同时，厌氧真菌还分泌多种纤维素酶，据 Lee 等研究证实，厌氧真菌所产生的纤维素酶活力比目前工业上常用的纤维素酶活力高出很多倍[8]。

牛瘤胃微生物长期处于恒定温度、恒定 pH 值、低氧气浓度的特殊环境，其正常功能的发挥依赖于瘤胃内环境的稳定，而 pH 值和挥发性脂肪酸对瘤胃内环境的稳定发挥着重要作用。当瘤胃内环境及微生物区系发生变化时，就可能会导致真菌数量、活力及分泌功能的变化，从而引发假阳乳问题。

临床案例 1：有些牛群，在突然更换料后，会出现生鲜乳抗生素检测“假阳性”问题，此情况一般在 1~2 周会自行恢复正常。

原因分析：瘤胃微生物菌群受日粮组份影响，不同日粮会形成不同的瘤胃微生物区系，突然更换日粮，可导致瘤胃内环境 pH、VFA 等发生变化，破坏瘤胃内微生物区系平衡。当瘤胃中真菌大量繁殖时，就可分泌出一定数量 β -内酰胺类抗菌素或类似成份，从而呈现生鲜乳假阳性问题出现。

临床案例 2：在北京地区的冬天，某奶牛场有 2 群高产泌乳牛，分别饲养于 2 个圈舍，A 牛群有 120 头，B 牛群 89 头。A 牛群饲喂的日粮为当天制备的 TMR 日粮，B 群饲喂的日粮为前 1 天傍晚制备，堆放于牛舍料台上过夜后的 TMR 日粮。二者不同之处，在于 B 群饲喂的 TMR，在开放式牛舍的料台上经过了一个夜晚的低温存贮；而 A 群饲喂的日粮为当天制备的未经低温存处的 TMR 日粮。B 牛群生产的牛乳出现了 β -内酰胺类抗菌素检测“假阳性”问题，而 A 牛群生产的牛奶正常。用胶体金快速诊断试纸条检测结果表明，B 牛群 β -内酰胺类抗菌素检测阳牛只为 21 头(阳性率达 23.6%)。将 B 牛群饲喂的 TMR 变成现制作现饲喂的 TMR 后，5 天后 B 牛群 β -内酰胺类抗菌素检测阳牛问题得以解决。

原因分析：B 群饲喂的 TMR 日粮在开放式牛舍料台上经过的一夜存放后，TMR 变成了经低温冷冻贮存的 TMR，冷冻贮存的 TMR 温度低，甚至挂霜带冰。B 群奶牛经过一个夜晚的饥饿后，食入大量低温冷冻贮存的 TMR，导致瘤胃内温度显著下降，导致瘤胃内环境温度、pH、VFA 等发生变化，破坏了瘤胃内微生物区系的平衡，使瘤胃细菌、原虫减少，而使耐低温的真菌大量繁殖[8]，分泌的 β -内酰胺类抗菌素或类似成份增加，从而呈现生鲜乳假阳性问题。

临床案例 3：每年的 11~12 月，北方地区气温剧烈下降，此时也是北方地区的奶牛场 β -内酰胺类抗菌素假阳性问题较为突出时间段，这又是为什么呢？

原因分析：其一，TMR 日粮温度过低或 TMR 日粮含有结冰或挂霜成份，奶牛采分后导致瘤胃内温度急剧下降，破坏瘤胃内微生物区系的平衡，使瘤胃细菌、原虫减少，而使耐低温的真菌大量繁殖，分泌的 β -内酰胺类抗菌素或类似成份增加，呈现生鲜乳假阳性问题。其二，奶牛饮水温度下降，或饮了冰渣水，导致瘤胃内温度急剧下降，而导致生鲜乳抗生素“假阳性”问题出现。其三，温度过低或冰渣水会严重降低奶牛每天的饮水量，从而导致瘤胃内水分不足，瘤胃消化功能异常，破坏了瘤胃内微生物区系的平衡、使瘤胃菌、原虫减少，真菌大量繁殖，导致生鲜乳假阳性问题发生。

3.3.2. 饲喂二次发酵的青贮或霉变青贮是导致 β -内酰胺类抗菌素检测呈现“假阳性”的又一原因

将含有适量水分的青绿作物秸秆或青草等，切碎后贮存在没有氧气的环境中，使乳酸菌大量繁殖，并产生大量乳酸，当酸度达到一定要求时，可抑制真菌、腐败菌的生长，饲草中的营养物质得以长期保存。青贮二次发酵就是空气进入青贮内部、青贮表面与空气接触，好气性微生物在青贮中大量繁殖、产热。并导致青贮发生好气性腐败的一个过程。

临床案例 4：河北省保定某奶牛场，由于本场制作的青贮数量不足，便购买周边牛场的青贮饲料，弥补青贮不足之问题。饲喂 5~6 天后，牛群出现了腹泻问题，同时还出现了 β -内酰胺类抗菌素检测呈现“假阳性”问题。

原因分析：外购的青贮本身制作质量良好，该牛场每天将购买的青贮运回本场后，暂时堆放在露天(青

贮窖的空地面上), 随时取用。由于青贮与空气充分接触, 导致青贮二次发酵, 堆放的青贮内部出现发热现象, TMR 制作人员未及时发现。饲喂二次发酵的腐败饲料可导致奶牛腹泻, 这是大家都熟知的一个问题。二次发酵的微生物包括酵母菌和霉菌, 这些均属于真菌, 奶牛食入二次发酵青贮中的真菌, 导致瘤胃内真菌数量大增, 真菌分泌的 β -内酰胺类抗菌素或类似物在瘤胃内积聚, 这就是饲喂二次发酵青贮或霉变青贮导致 β -内酰胺类抗菌素检测呈假阳性的主要原因。停喂二次发酵青贮, 3 天后腹泻问题得到解决, 7 天后 β -内酰胺类抗菌素检测“假阳性”问题也得以解决。

3.3.3. 奶牛真菌性乳房炎也是导致 β -内酰胺类抗菌素呈显“假阳性”的一个原因

随着抗生素及皮质激素的大面积使用, 奶牛真菌性乳房炎呈上升趋势。侯引绪等对 287 头份临床型乳房炎奶样的真菌鉴定表明, 真菌感染阳性率为 20.91%; 阴性率为 79.09%; 原发感染率为 15.76%, 抗生素治疗 5 天以上(包括 5 d)的继发感染率为 47.83%。并从患真菌性乳房炎乳中分离出了酵母类真菌, 癣菌和曲霉菌类真菌[9]。真菌在乳腺中分泌的抗菌生理活性物质或类 β -内酰胺类抗菌素是导致牛奶抗生素检测呈“假阳性”的主要原因。

3.3.4. 乳中的体细胞数过高也可引起乳中抗生素检测呈“假阳性”

1993 年 Van Eenennaam 用纸片法测定乳中的 β -内酰胺类抗生素, 结果表明: 假阳性的比例分别是 43.6%、37.7%、81.7%、2.6% 和 18.8%。进一步的研究表明: 乳中 SCC 低的情况下, 有 10.2% 的假阳性率; 而当 $SCC > 3 \times 10^6$ 个/mL 时, 假阳性率增加到 19.7%, 当 $SCC > 10^6$ 个/mL 时, SCC 含量与假阳性呈线形关系($r = 0.61, P < 0.01$) [10]。

3.3.5. 乳中的“天然抗生素”是导致抗生素检测假阳性的又一原因

生鲜乳中本身含有过氧化氢酶、乳铁蛋白、溶菌酶, 这些“天然抗生素”或生理活性物质具有抑菌或杀菌作用, 都可能会导致检测结果“假阳性”。研究表明, 不同泌乳时期分泌的乳检测假阳性率不同, 这主要与不同泌乳期乳中乳过氧化氢酶含量有关[11], 检测乳中 β -内酰胺的时发现, 当乳样中的乳铁蛋白 $> 1 \text{ mg/mL}$ 时可导致假阳性。乳中的过氧化氢酶、乳铁蛋白、溶菌酶等生理活性物质发挥的抑菌可杀菌作用, 为乳腺提供了有效的免疫力, 为防止乳腺感染、保证乳腺健康起到重要作用, 但也是造成乳中抗生素检测“假阳性”的一个因素。

3.3.6. 乳中游离脂肪酸过高也可导致生鲜乳抗生素检测“假阳性”出现

不同浓度的游离脂肪酸对细菌有一定的抑制作用, 当游离脂肪酸浓度达到 4~5 mmol/L 时, 对四环素和大环内酯类抗生素的测定可能出现假阳性。游离脂肪酸主要有乙酸、丙酸、丁酸、异丁酸、戊酸和异戊酸, 其中乙酸、丙酸和丁酸对反刍动物影响最为重要, 游离脂肪酸的种类及瘤胃中的浓度与日粮组份及瘤内环境有重要关系。

3.3.7. 使用氟苯尼考治疗奶牛可导致生鲜乳氯霉素检测呈现假阳性

氯霉素(酰胺醇类)抗生素主要包括氯霉素、甲砒霉素(甲砒氯霉素)、无味氯霉素等。把氯霉素苯环上的硝基换成甲砒基就成了氯霉素。氟苯尼考(又叫氟甲砒霉素)是人工合成的甲砒霉素的单氟衍生物, 氟苯尼考在药物代谢过程可产生氯霉素类成份, 从而出现氯霉素检测“假阳性”问题。

3.3.8. 益生菌类添加剂使用过量或长期使用也是导致生鲜乳出现含抗问题的一个原因

目前, 不少奶牛场在使用益生菌类添加剂, 提起益生菌大家往往会联想到乳酸菌、双歧杆菌等, 把人服用乳酸菌、双歧杆菌促进健康保健的理念与引入到奶牛上来。其实我们目前在奶牛上添加的益生菌类成份或菌体与人所食用益生菌饮料中的菌, 是不一样的。人饮用双歧杆菌、乳酸菌类饮料确有良好的

有益作用。但奶牛目前使用的益生菌类添加剂中大多含有蜡状芽孢菌、地衣芽孢菌、甚至还有枯草芽孢菌等。目前的大量实验表明,蜡状芽孢菌分泌的毒素可导致人中毒,不论是蜡状芽孢菌、地衣芽孢菌在体外培养过程中发现都有 β 溶血现象。许多益生菌类生产厂家会告诉你,给奶牛日粮中添加地衣芽孢菌、蜡状芽孢菌等,这些菌可以在瘤胃中分泌杀菌物质,这些杀菌物质可杀死瘤胃中的有害菌,促进瘤胃中的有益菌生长繁殖。当分泌的杀菌物质达到一定程度时,自然可以导致乳中的抗菌物质进入乳,从而出现“慢抗”检测抗生素检测“假阳性”问题发生。所以,使用牛益生菌类添加剂时,更应该注意添加剂量和长期或短期使用之问题。

4. 小结与讨论

不论 TTC 检测法还是胶体金层析快速检测法,都是经过科学验证的可靠检测方法。在检测方法、操作过程正确及严格执行科学用药等情况下,生鲜乳乳中 β -内酰胺类抗菌素检测呈阳性,说明乳中一定含有 β -内酰胺类抗菌素或类似物质。奶牛养殖者找不出导致乳中 β -内酰胺类抗菌素检测呈阳性的具体原因,难以接受或解释乳中 β -内酰胺类抗菌素检测阳性这一结果,所以将正确的检测结果称为“假阳性”。但人们所说的假阳含抗奶,实际上并不是假阳性,而是真的含抗阳性奶。物质不会无缘故的产生,也不会凭空消失,只能从一种状态转化成另一种状态。研究分析乳中出现抗菌素“假阳性”的生理原因,改善饲养管理,保持瘤胃内环境稳定、健康,才是防控乳中抗生检测“假阳性”问题的真正出路。

目前,对于生鲜乳含抗假阳性问题研究的还不够深入、精细,导致假阳性乳发生的因素复杂,这方面的研究资料也较为稀缺。笔者只是从临床防控角度对此问题进行了临床研究总结,期研究结果难免有一定的局限性,或不妥之处,还有待更进一步的实践研究。

基金项目

北京市奶牛创新团队疾病防治岗位专家项目(PXM2020-157102-000018)。

参考文献

- [1] Jack, J.C., Theresa, M.B., Joseph, T.W., *et al.* (1993) Randomized, Prospective Comparison of First- and Second-Generation Cephalosporins as Infection Prophylaxis for Cardiac Surgery. *The American Journal of Surgery*, **166**, 734. [https://doi.org/10.1016/S0002-9610\(05\)80689-0](https://doi.org/10.1016/S0002-9610(05)80689-0)
- [2] 孙祥, 王宇驰, 张春然, 等. 头孢菌素类抗生素的发现与发展[J]. 国外医药抗生素分册, 2014, 35(4): 154-158.
- [3] 李亚丹, 杨辉, 卢向阳, 等. 不同饲料饲养黄牛瘤胃厌氧真菌的多样性对比研究[J]. 西南农业学报, 2017, 30(10): 2371-2375
- [4] 高巍, 孟庆翔. 瘤胃细菌、原虫和真菌降解植物细胞壁的相对贡献及其互作[J]. 中国农业大学学报, 2003, 8(5): 98-104.
- [5] Bauchop, T. (1979) The Rumen Anaerobic Fungi: Colonizers of Plant Fibre. *Annales de Recherches Veterinariess*, **10**, 246-248.
- [6] Wilson, C.A. (1994) Studies on the Cellulase of the Rumen Anaerobic Fungus *Neoeallimatrix orfitalis*, with Special Reference to the Capacity of the Enzyme to Degrade. *Enzyme and Microbial Teehnology*, **14**, 258-264. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(92\)90148-H](https://doi.org/10.1016/0141-0229(92)90148-H)
- [7] 侯引绪, 等. 奶牛真菌性乳房炎研究报告[J]. 当代畜牧, 2008(8): 28-30.
- [8] Van Eenennaam, A.L. (1993) Evaluation of Milk Antibiotic Residue Screening Tests in Cattle with Naturally Occurring Clinical Mastitis. *Journal of Dairy Science*, **76**, 3041-3053. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(93\)77644-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(93)77644-4)
- [9] Beukers R. (1991) Some Special Aspects of Delvotest R. in Inhibitory Substances in Milk-Current Analytical Practice. IDF Bull. No. 283. International Dairy Federation, Brussels, Belgium, 20-23.
- [10] Althaus, R.L. (2001) Lactoperoxidase System in Dairy Ewe Milk: Analysis Time and Lactation Stage Influence on Lactoperoxidase System Components in Dairy Ewe Milk. *Journal of Dairy Science*, **84**, 1829-1835. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(01\)74622-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)74622-X)

-
- [11] Apostolos, S.A., Farver, T.B. and Cullor, J.S. (1999) Evaluation of the Delvo-X-Press Assay for Detecting Antibiotic Residues in Milk Samples from Individual Cows. *Journal of Food Protection*, **62**, 1183-1190.
<https://doi.org/10.4315/0362-028X-62.10.1183>