



# 无菌动物在奶牛乳房炎发病机理研究中的应用

马晨, 张和平\*

(内蒙古农业大学乳品生物技术与工程教育部重点实验室, 呼和浩特 010018)

**【摘要】** 乳房炎是奶牛养殖场中的高发病,经抗生素治愈后极易复发。疾病的反复发作导致奶牛的产奶量持续下降,乳头坏死,进而被淘汰。乳房炎也是哺乳期妇女常患的疾病,传统的抗生素治疗损伤新生儿的神经系统。在乳房炎的治疗方法中,抗生素因其大量的负面作用使得其已不适合在乳房炎治疗中滥用,应加快开发新的且有效的抗生素替代物用以治疗或预防乳房炎。益生菌在多种疾病的预防与治疗中都有成功的应用实例。因此,益生菌在乳房炎的治疗与预防中是否真的有效是一个有趣的研究方向。益生菌主要于宿主的肠道中发挥其关键作用,因此肠道菌群与乳房炎发病是否有关联,是益生菌能否应用于乳房炎的治疗中需要解答的首个问题。通过菌群移植,对哺乳期小鼠的乳腺组织以及身体其他各项免疫指标进行监控,探究移植健康奶牛粪便小鼠组与移植乳房炎奶牛粪便小鼠组以及移植乳房炎奶牛粪便同时进行益生菌干预组小鼠的乳腺组织是否发生炎症以及炎症程度如何。奶牛肠道菌群移植入无菌小鼠之后,这种菌群结构与功能之上的差异同时被放大形成鲜明的对比。表明健康的肠道菌群结构对于保持奶牛的健康状态有直接的影响,益生菌可调节奶牛的肠道菌群,对于维持奶牛健康,预防和缓解乳房炎有不可忽视的潜能。

**【关键词】** 奶牛;肠道菌群;乳房炎;无菌小鼠;菌群移植

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2017) 06-0693-06

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2017.06.020

## Application of germ-free animals in the study of pathogenesis of cow mastitis

MA Chen, ZHANG He-ping\*

(Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Engineering, Ministry of Education, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China)

**【Abstract】** Mastitis is one of the high incidence diseases in dairy farm, and the traditional therapies include using of antibiotics which usually have a high recurrent rate. The disease recurrence will reduce the milk production and cause worse result such as breast necrosis. So many cows are obsoleted because of mastitis and that cause a great economic loss to the dairy industry. Nursing mothers also suffering from mastitis and they cannot be treated with antibiotics because the medicine has a bad influence on the baby's nervous system. With all of the negative effects, antibiotics cannot be used in the mastitis treatment. Therefore it is extremely urgent to develop a new therapy for mastitis. Probiotics is a viable alternative which can be used in the prevention and treatment of mastitis because of many successful applications. Many previous examples in a variety of disease prevention and treatment using probiotics make this research very interesting. Digestive tract is the main niche where probiotics can play a crucial role in maintaining the host's health. It has been observed that digestive tract is one of the important microbial niche, which have a robust relationship with mastitis. It is the major issue of this research to use probiotic instead of antibiotics in the therapy of mastitis. The healthy intestinal microflora structure is crucial for the cows' health. Probiotics has a potential ability to cure mastitis in dairy cows. In addition it plays an essential role in maintaining the healthy state and mastitis prevention.

[作者简介] 马晨(1986-),女,内蒙古呼和浩特人,博士研究生,主要从事肠道微生物方面的研究。E-mail:machen21@sina.com

[通讯作者] 张和平,教授,博士生导师。E-mail:hapingdd@vip.sina.com

【Key words】 Dairy cow; Intestinal microflora; Mastitis; Germfree mouse; Fecal microbiota transplantation

Corresponding author: ZHANG He-ping, E-mail: hepingdd@vip.sina.com

奶牛乳房炎是由挤奶操作时的机械刺激与病原微生物感染所导致的乳腺组织炎症,奶牛患乳房炎后的表现主要为体温升高,乳房红肿、疼痛,乳房腺泡损伤,炎症细胞浸润,腺泡导管水肿,间质出血<sup>[1]</sup>。对乳房炎研究的技术手段逐步更新,从传统的生物学方法到近年来的分子生物学新技术<sup>[2-5]</sup>。然而研究表明,在科学管理的现代奶牛养殖场中,临床型乳房炎发病的概率较低,临床型乳房炎只占乳房炎发病率的 5% ~ 10%,绝大部分是隐性乳房炎<sup>[6]</sup>。隐性乳房炎如果不及及时治疗,极易发展为急性乳房炎,因此,对隐性乳房炎的防治工作尤为重要。隐性乳房炎的主要症状是体细胞数(somatic cell count, SCC)显著升高,体细胞主要包括巨噬细胞(macrophages),淋巴细胞(lymphocytes),上皮细胞(epithelial cells),而当病情加重或发生急性乳房炎时,几乎多为形核中性粒细胞(PMNs)<sup>[7]</sup>。乳中的体细胞数量是反映牛奶和牛群健康程度的一项重要指标,近年来,大多数国家均将牛乳的体细胞数作为牛奶收购标准之一,国际上也将乳体细胞数作为判定奶牛隐性乳房炎的标准,体细胞数越高,乳房健康状况越差。导致奶牛患乳房炎的因素主要有,过挤导致乳头括约肌受损,挤前药浴时间不充分,环境卫生差,牛本身免疫力下降,例如日粮中精料过多导致奶牛酸中毒(亚临床酸中毒居多),造成瘤胃内革兰氏阴性菌大量死亡而释放出内毒素,内毒素通过瘤胃壁吸收入血后随血液循环进入乳腺,引起炎症<sup>[8]</sup>。不同的产犊季节或泌乳季节对隐型乳房炎的发病率有较大的影响<sup>[9]</sup>。高温高湿的气候条件易产生大量的微生物,奶牛在产犊后乳孔并不闭塞,极易患细菌侵入性乳房炎,而病原菌入侵乳腺导管是公认的导致乳房炎发生的最主要原因<sup>[10]</sup>。严寒的时期,细菌的生长、繁殖和传播受到了高度抑制,同时奶牛的冷应激不明显,从而降低了隐型乳房炎的发病率<sup>[11]</sup>。动物体感染乳房炎后,体温升高,乳房红肿、疼痛,乳房腺泡损伤,炎症细胞浸润,乳腺水肿,间质出血<sup>[12]</sup>。Eric Brouillette 等<sup>[13]</sup>对患有乳房炎的小鼠模型进行研究,发现,因金黄色葡萄球菌感染而导致的乳房炎,多形核的中性粒细胞(PMNs)发生迁移。结合吖啶橙染色,荧光显微镜和计算机辅助图像分析,估计乳腺炎小鼠模型中性粒细胞浸润的数量。组织中细菌的数量增多,PMNs 的数量

也增加。并且在感染发生 12 ~ 24 h 后,PMNs 数量是感染初始的 400 倍和 1100 倍。使用剂量为 25 mg/kg 头孢匹林治疗后中性粒细胞浸润减少了 85%。此外 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  and IL-6 是炎症免疫应答中主要的促炎性细胞因子,可通过 enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) 来检测,从而诊断乳房炎病变的发生<sup>[14]</sup>。

## 1 乳房炎致病菌

乳房炎致病菌不仅感染奶牛,降低产奶量,影响原奶的营养成分,且对由原奶加工产生的食品也带来负面影响,严重威胁着食品安全<sup>[15]</sup>。引起奶牛乳房炎的病原微生物包括金黄色葡萄球菌、无乳链球菌、停乳链球菌、大肠杆菌、支原体、真菌、病毒等,引起奶牛发生特异性免疫反应,导致产奶量减少,乳中体细胞数升高,同时产生一系列生理生化反应,如乳中 IgG、溶菌酶、乳铁蛋白等抗菌物质含量增加。这些细菌一旦感染宿主之后将很难被完全杀死,而且一旦遇到合适的繁殖条件,又会卷土重来<sup>[16]</sup>。不同细菌感染所带来的病变也有差别,尤其在原奶的成分中所造成的差异尤为明显。因为不同的细菌产生的代谢物就有差异,另一方面,宿主面对不同的致病菌的影响,导致自身代谢产物也有差异<sup>[17]</sup>。由于不同细菌引起炎症的机制有所不同,故奶牛机体产生的反应及其对产奶量的影响也有所不同<sup>[18]</sup>。对不同乳房炎类型和隐性乳房炎病原菌组成对测定日泌乳性能和乳中 SCC 变化的影响。其中隐性乳房炎以大肠杆菌和链球菌混合感染最多占 26.00%,其次为链球菌单独感染占 23.30%,由 1 种细菌单独感染的比例为 36.11%,2 种或 2 种以上细菌混合感染为 61.11%<sup>[19]</sup>。药敏试验检测结果显示,在所选的 15 种药物中,主要分离菌均对丁胺卡那霉素、氟哌酸和恩诺沙星 3 种药物敏感;大肠杆菌、克雷伯菌、凝固酶阴性葡萄球菌对青霉素类和  $\beta$ -内酰胺/ $\beta$ -内酰胺酶抑制剂类药物产生了极强的耐药性;乳房链球菌对该类药物也产生不同程度的耐药;部分分离菌对卡那霉素、庆大霉素、链霉素、四环素、红霉素、先锋霉素 V、复方新诺明等药物产生不同程度耐药<sup>[20]</sup>。无绿藻能够在牛群中引起乳房炎,感染后乳房轻度肿胀,乳汁呈水样,伴有絮状沉淀,且对抗生素治疗效果不佳,导致奶牛产奶量急剧下降,其中以

中型无绿藻 (*Prototheca zopfii*) 和小型无绿藻 (*Prototheca wickerhamii*) 较为常见。从患乳房炎奶牛的 11 个乳区分离到 8 株酵母样微生物, 鉴定为中型无绿藻, 用 16 种抗生素药敏纸片进行药敏试验, 结果显示中型无绿藻仅对庆大霉素、链霉素和阿米卡星等氨基糖苷类抗生素敏感<sup>[21]</sup>。Zaini 等<sup>[22]</sup> 从 130 头患有乳房炎的奶牛中成功分离出 4 株中型无绿藻, 并对其基因型进行了鉴定。Chang 等<sup>[23]</sup> 也研究了 *Prototheca zopfii* 感染后的小鼠乳房炎模型, 并针对 *Prototheca zopfii* 的感染实验了庆大霉素对其治疗的效果。诺卡氏菌属也是导致牛乳房炎的一种致病菌, 不仅可以严重破坏乳腺, 且尚缺乏有效的治疗手段。Condas 等<sup>[24]</sup> 对诺卡氏菌属的药敏感性进行研究, 发现从乳房炎病牛分离出的 80 株诺卡氏菌种均对氯唑青霉素, 氨苄西林, 头孢哌酮有耐药性。Brouillette 等<sup>[25]</sup> 还深入研究了乳房炎致病菌的感染机制, 发现金黄色葡萄球菌吸附在乳腺细胞上的主要依靠自身产生的纤粘蛋白。未来的研究中, 或许可以通过抑制纤粘蛋白基因的表达, 使致病菌无法附着在机体表面, 降低对乳腺的感染能力。

## 2 乳房炎治疗方法

对奶牛乳房炎的预防与治疗是乳品行业中难以突破的难点, 目前为止, 尚未出现防治该疾病的有效方法, 同时在奶牛健康与食品安全之间维持有益的平衡状态。目前对于乳房炎的主要治疗策略仍旧为大量的使用抗生素<sup>[26, 27]</sup>, 因此许多研究者都针对不同的致病菌进行多种抗生素的抑菌实验。然而抗生素治疗却带来了诸如耐药性增加, 抗生素及抗性基因的残留等种种负面影响。因此, 为了避免这些问题, 更多的科学家专注于开发新药物, 特别是天然无污染的化合物。

乳房炎是奶牛养殖场中的常见疾病, 并且对乳业经济造成很大的负面影响, 抗生素是治疗和预防这一疾病的主要方法, 但是抗生素在治疗和预防疾病的同时, 导致耐药性的增加和原奶中抗生素残留等问题, 因此, 抗生素治疗方法并未取得成功, 仍然急需研发其他有效的治疗方法。近年来, 作为颠覆传统抗生素疗法的新型治疗手段, 益生菌逐渐成为该领域研究的热点。乳酸菌便是其中具有代表性的一类原核生物, 乳酸菌 (*lactic acid bacteria*, LAB) 是一类能利用可发酵碳水化合物产生大量乳酸的细菌的通称。这类细菌在自然界分布极为广泛, 具有丰

富的物种多样性, 是对宿主具有有益作用的活微生物。此类益生菌与致病菌产生拮抗, 抑制致病菌的定植, 产生抗菌肽, 对环境无污染, 与动物互利共生, 被认为具有替代抗生素治疗乳房炎的潜力<sup>[28, 29]</sup>。在先前的研究中就有关于乳酸菌对牛肠道菌群的积极影响, 加强宿主对营养物质的吸收以及对致病菌感染的拮抗作用<sup>[30, 31]</sup>。因此, 关于乳酸菌与疾病的预防与诊疗的研究对于畜牧生产具有很大的现实意义。

## 3 菌群移植研究

粪便菌群移植的应用, 是通过将健康宿主体的肠道菌群移植到有需求的受者体内, 帮助受者建立健康的肠道菌群环境, 目前已经成功的治愈了多种与肠道菌群紊乱相关的疾病<sup>[32]</sup>, 尤其是在与肠道菌群直接相关的肠道炎症类疾病, 如 *Clostridium difficile* 感染导致的肠炎。*Clostridium difficile* 感染性肠炎是抗生素的过量使用所引起的肠道菌群紊乱, 是菌群紊乱引起的人体病变中最典型的例子<sup>[33, 34]</sup>。目前已有许多研究报道了肠道菌群紊乱与肥胖以及二型糖尿病发病的关联<sup>[35]</sup>。人体肠道菌群的结构十分复杂, 且有其独特的动态平衡关系, 在体外无法完全模拟到肠道菌群的真实结构。肠道菌群移植利用健康人体的粪便, 其中饱含人体肠道内的正常菌群结构, 移植入受体患者肠道内, 这是任何体外菌株摄入都无法替代的优势<sup>[36]</sup>。早在 1950 年, Eisean 就将粪便移植疗法成功的用于对假膜性肠炎的治疗, 患者在进行粪便移植之前曾尝试过抗生素药物治疗以及 *L. acidophilus* 干预治疗, 但是都未能起到明显的治疗效果, 直到 Eisean 医生的粪便秘移植法, 才使得 4 位深受 *Clostridium difficile* 感染性肠炎困扰的患者摆脱肠炎疾病的困扰<sup>[37]</sup>。Grehan 等<sup>[38]</sup> 研究发现菌群整体移植后可以在受者体内保持完整性长达 24 周, 而摄入一次益生菌, 在肠道中基本 2 周之后就无法检测到, 因此在菌群紊乱疾病的治疗中, 粪便秘移植要比益生菌的治疗效果更为显著。Angelberger 研究小组对进行菌群移植治疗肠炎的患者肠道菌群进行了连续 12 周的分析, 结果发现, 在移植健康人体粪便后, 患者肠道中的 *Faecalibacterium prausnitzii*, *Rosebura faecis* 和 *Bacteroides ovatus* 数量恢复, 且发现 *Faecalibacterium prausnitzii*, *Rosebura faecis* 和 *Bacteroides ovatus* 与抗炎因子以及短链脂肪酸的产生有关, 同时 Enterobacteriaceae 和毛螺菌科



(Lachnospiraceae) 的数量降低, 而 Enterobacteriaceae 和 Lachnospiraceae 与肠炎的发病相关<sup>[39]</sup>。对自身免疫性疾病有效的治疗研究多年来一直未有重大的突破, 但是近几年, 将菌群移植引入自身免疫性疾病的治疗中, 并获得了积极的治疗效果<sup>[40, 41]</sup>。

## 4 无菌小鼠为模型探究菌群疾病关联互作

无菌小鼠作为研究肠道菌群与疾病发生的动物模型, 与奶牛肠道的菌群结构进行相互结合, 深入解析, 以奶牛肠道微生物构成模式与肠道功能基因组的表达差异, 在探究奶牛肠道菌群在健康状态下与患乳房炎状态下两者间是否存在差异, 存在何种差异, 这种差异是否为导致奶牛患乳房炎的关键诱因。与第三军医大学合作利用哺乳期无菌小鼠为动物模型, 将健康奶牛粪便与患乳房炎奶牛粪便分别移植入无菌小鼠肠道中, 通过对无菌小鼠移植奶牛肠道菌群之后的乳腺病理表型研究, 以及免疫指标分析鉴定, 观测无菌小鼠在接受乳房炎奶牛粪便后是否会发生乳房炎, 并且对移植乳房炎奶牛粪便的小鼠同时进行益生菌 *L. casei* Zhang 干预, 观测益生菌干预对肠道菌群的影响以及对乳房炎疾病的防治效果。对移植健康奶牛粪便与患乳房炎奶牛粪便以及移植乳房炎奶牛粪便的小鼠同时进行益生菌 *L. casei* Zhang 干预的三组小鼠肠道菌群进行深度测序分析, 与奶牛肠道菌群结构进行比较, 探究移植前后菌群结构的异同以及在疾病发生中起到关键作用的菌属。为后续的益生菌作为抗生素替代疗法治疗奶牛乳房炎提供行之有效的科学理论依据。

在小鼠与奶牛以肠道菌群搭建的物种多样性桥梁之间, 存在着特定的关联, 同时发现, 在小鼠肠道中, 虽然为能够完全保有奶牛肠道菌群的原始结构, 但是所形成的新的菌群结构仍旧存在与奶牛相似的共性, 例如大部分产酸菌在健康奶牛以及健康小鼠肠道中均为优势菌群, 这可能是宿主抵抗致病菌的重要生物防线。此外, 研究中还发现, 无菌小鼠可以将原本奶牛肠道菌群中的细微差异放大, 形成自己独特的但是差异显著的菌群结构, 这也是印证乳房炎奶牛与健康奶牛肠道菌群差异的重要例证。然而无菌动物作为肠道菌群疾病研究的动物模型, 也存在一些问题。例如是否会因为跨宿主的重要差距, 导致肠道菌群原有的差异丢失, 进而掩盖了疾病下的肠道菌群真实状况。

在动态的环境中去研究个体与个体之间共性及

特性, 个体与环境之间的互作等。尤其是在微生物领域, 微生物代谢速度非常快, 微生物个体会对周围微小的变化迅速做出反应, 因此在研究中或许应该对微生物的生存环境也进行限定, 即在生存环境已定的条件中, 来研究该环境中的微生物活动代谢, 研究的结果也应该只针对在该环境下的微生物遗传变异或代谢信息等, 并不能概括在其他环境中也生存的同种微生物。肠道菌群与人体的长期互作, 目前的技术使得在体外无法完整的模拟人体肠道菌群的真实结构特征, 并且, 肠道菌群数量庞大, 结构复杂, 不同种属的菌群相互制约相互影响, 因此, 修复肠道菌群紊乱难以通过单一的菌群干预达到目的, 这也是粪便移植最为独特的优势所在。粪便移植不仅包含患者肠道中含量减少的有益菌群, 同时还包含菌群生存结构与空间。所以, 实验设计将奶牛的肠道菌群整体移植入小鼠肠道中, 避免奶牛的肠道菌群发生我们无法观测到的细微改变。同时, 将奶牛粪便样本混合到一起对小鼠进行移植, 想要观测健康奶牛与患乳房炎奶牛的两个大群体的肠道菌群对乳房炎疾病的发病关系, 群体的共性是肯定的, 唯一的, 但是群体之间的个体间差异也是存在的。从移植之后的小鼠菌群分析中发现, 在两组奶牛之间的细小差别, 到小鼠体内均被放大。如若以奶牛个体的粪便样本为单位进行移植, 个体的差异将会引导实验结果偏差, 甚至个体差异的放大掩盖了群体差异的存在。另一方面, 观测到的群体差异, 又是否由于个体差异所导致, 这就给予实验结果更多的不可解释性。因此采用将每组奶牛的粪便样品混合均匀后, 以两组奶牛的群体为单位进行粪便移植实验, 可以定格唯一的研究视角, 即健康奶牛与乳房炎奶牛的肠道菌群是否与乳房炎发病相关。

## 5 展望

乳房炎不仅是奶牛养殖业中常见的疾病, 也是哺乳期妇女常患的疾病。乳房炎不仅对母体造成很大的损伤, 对新生儿的健康也存在很大的威胁。母乳被认为是新生儿的健康非常有益的饮食来源, 在奶牛养殖中也同样, 健康的新生牛犊与其从母牛获得的高品质初乳有着密不可分的关系。肠道菌群直接影响宿主的健康, 而母乳是新生儿早期肠道菌群建立的重要来源, 健康的母乳对于帮助新生儿建立正常的肠道菌群负有很大的责任。因此, 健康的乳汁对新生儿乃至新生牛犊都是极其重要的。因

此,乳房炎的发生对动物体造成的危害大且深远。传统的抗生素治疗不仅可细菌带来耐药性,影响药物的治疗效果,然而对于哺乳期的妇女来说,抗生素通过哺乳过程传递给幼儿十分危险,因此,益生菌的出现更是为之一难题的解决带来了希望。众多的研究都表明了益生菌对乳房炎致病菌有显著的抑制效果,因此,可以具有替代抗生素的潜力。通过口服益生菌,而治疗乳房内部的感染究竟是何原因,肠道菌群与乳房菌群这两块看似毫无关联的细菌定殖场所,必定存在一定的联系,使之能够通过口服益生菌到达肠道,而对乳房内的致病菌有抑制效果。因此,通过无菌动物模型来研究乳房炎肠道菌群的发病关联,可以排除外源微生物的干扰,使肠道菌群为唯一变量,结果能够更为真实的展现肠道菌群结构功能,是导致乳房炎发生的主要因素。无菌动物在肠道菌群与疾病的研究领域具有非常宽阔的应用前景,能够在宿主体外建立肠道环境,排除身体其他部位菌群掺杂,明确肠道菌群的重要生理功能。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Persson Y, Nyman AKJ, Grönlund-Andersson U. Etiology and antimicrobial susceptibility of udder pathogens from cases of sub-clinical mastitis in dairy cows in Sweden [J]. *Acta Vet Scand*, 2011, 53(1): 36.
- [ 2 ] Valde JP, Lawson LG, Lindberg A, et al. Cumulative risk of bovine mastitis treatments in Denmark, Finland, Norway and Sweden [J]. *Acta Vet Scand*, 2004, 45(3-4): 201-210.
- [ 3 ] Zadoks RN, Middleton JR, McDougall S, et al. Molecular epidemiology of mastitis pathogens of dairy cattle and comparative relevance to humans [J]. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2011, 16(4): 357-372.
- [ 4 ] Phiri AM, Muleya W, Mwape KE. Management of chronic gangrenous mastitis in a 3-year-old cow using partial (quarter) mastectomy [J]. *Trop Animal Health Prod*, 2010, 42(6): 1057-1061.
- [ 5 ] Wolff C, Espetvedt M, Lind AK, et al. Completeness of the disease recording systems for dairy cows in Denmark, Finland, Norway and Sweden with special reference to clinical mastitis [J]. *BMC Vet Res*, 2012, 8(1): 131.
- [ 6 ] T Halasa, K Huijps, O Østerås, et al. Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: A review [J]. *Vet Q*, 2007, 29(1): 18-31.
- [ 7 ] Malek dos Reis CB, Barreiro JR, Mestieri L, et al. Effect of somatic cell count and mastitis pathogens on milk composition in Gyr cows [J]. *BMC Vet Res*, 2013, 9(1): 1-7.
- [ 8 ] González LA, Manteca X, Calsamiglia S, et al. Ruminant acidosis in feedlot cattle: Interplay between feed ingredients, rumen function and feeding behavior (a review) [J]. *Animal Feed Sci Technol*, 2012, 172(1-2): 66-79.
- [ 9 ] Waltemyer JR, Hennings R, Hoostal MJ. Seasonal shifts in bacteria associated with Jersey cows on a small dairy farm and the potential for bedding choice and low levels of iodine use to inhibit mastitic pathogens [J]. *Prev Vet Med*, 2014, 113(4): 614-619.
- [ 10 ] Newman KA, Rajala-Schultz PJ, Degraives FJ, et al. Association of milk yield and infection status at dry-off with intramammary infections at subsequent calving [J]. *J Dairy Res*, 2010, 77(01): 99-106.
- [ 11 ] 甘宗辉, 张亚琴, 冀德君, 等. 产犊月份与奶牛隐性乳房炎的发病及产奶量的关系研究 [J]. *中国牛业科学*, 2013, 39(1): 25-29.
- [ 12 ] Rasmussen DB, Fogsgaard K, Røntved CM, et al. Changes in thermal nociceptive responses in dairy cows following experimentally induced *Escherichia coli* mastitis [J]. *Acta Vet Scand*, 2011, 53(1): 32.
- [ 13 ] Brouillette E, Grondin G, Talbot BG, et al. Inflammatory cell infiltration as an indicator of *Staphylococcus aureus* infection and therapeutic efficacy in experimental mouse mastitis [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2005, 104(3): 163-169.
- [ 14 ] Fengyang L, Yunhe F, Bo L, et al. Stevioside suppressed inflammatory cytokine secretion by downregulation of NF- $\kappa$ B and MAPK signaling pathways in LPS-stimulated RAW264.7 cells [J]. *Inflammation*, 2012, 35(5): 1669-1675.
- [ 15 ] Verdiernetz I, Gagne G, Bornes S, et al. Cow teat skin, a potential source of diverse microbial populations for cheese production [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2012, 78(2): 326-333.
- [ 16 ] Garmo RT, Waage S, Sviland S, et al. Reproductive performance, udder health, and antibiotic resistance in mastitis bacteria isolated from Norwegian Red cows in conventional and organic farming [J]. *Acta Vet Scand*, 2010, 52(11): 239.
- [ 17 ] Ismail ZA, Dickinson C. Alterations in coagulation parameters in dairy cows affected with acute mastitis caused by *E. coli* and *S. aureus* pathogens [J]. *Vet Res Comm*, 2010, 34(6): 533-539.
- [ 18 ] Hertl JA, Schukken YH, Welcome FL, et al. Pathogen-specific effects on milk yield in repeated clinical mastitis episodes in Holstein dairy cows [J]. *J Dairy Sci*, 2014, 97(3): 1465-1480.
- [ 19 ] 毛永江, 陈莹, 陈仁金, 等. 乳房炎对中国荷斯坦牛测定日泌乳性能及体细胞数变化的影响 [J]. *畜牧兽医学报*, 2011, 42(12): 1787-1794.
- [ 20 ] 王旭荣, 李宏胜, 李建喜, 等. 奶牛临床型乳房炎的细菌分离鉴定与耐药性分析 [J]. *中国畜牧兽医*, 2012, 39(7): 195-198.
- [ 21 ] 张寒琪, 高健, 吴桥兴, 等. 奶牛中型无绿藻性乳房炎 [J]. *中国兽医杂志*, 2011, 47(5): 13-5.
- [ 22 ] Zaini F, Kanani A, Falahati M, et al. Identification of *Prototheca zopfii* from bovine mastitis [J]. *Iran J Public Health*, 2012, 41(8): 84-88.
- [ 23 ] Chang R, Yang Q, Liu G, et al. Treatment with gentamicin on a murine model of protothecal mastitis [J]. *Mycopathologia*, 2013, 175(3-4): 241-248.

- [24] Condas LA, Ribeiro MG, Yazawa K, et al. Molecular identification and antimicrobial susceptibility of *Nocardia* spp. isolated from bovine mastitis in Brazil [J]. *Vet Microbiol*, 2013, 167(3): 708–712.
- [25] Brouillette E, Talbot BG, Malouin F. The fibronectin-binding proteins of *Staphylococcus aureus* may promote mammary gland colonization in a lactating mouse model of mastitis [J]. *Infect Immunity*, 2003, 71(4): 2292–2295.
- [26] Barlow J. Mastitis therapy and antimicrobial susceptibility: a multispecies review with a focus on antibiotic treatment of mastitis in dairy cattle [J]. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2011, 16(4): 383–407.
- [27] Kasravi R, Bolourchi M, Farzaneh N, et al. Efficacy of conventional and extended intra-mammary treatment of persistent sub-clinical mastitis with cefquinome in lactating dairy cows [J]. *Trop Animal Health Prod*, 2011, 43(6): 1203–1210.
- [28] El-Razik KAA, Abdelrahman KA, Abd SI, et al. New approach in diagnosis and treatment of bovine mycotic mastitis in Egypt [J]. *Afr J Microbiol Res*, 2011, 5(31): 5725–5732.
- [29] Giannino ML, Aliprandi M, Feligini M, et al. A DNA array based assay for the characterization of microbial community in raw milk [J]. *J Microbiol Methods*, 2009, 78(2): 181–188.
- [30] Rodriguez-Palacios A, Staempfli HR, Duffield T, et al. Isolation of bovine intestinal *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus acidilactici* with inhibitory activity against *Escherichia coli* O157 and F5 [J]. *J Appl Microbiol*, 2009, 106(2): 393–401.
- [31] Sun P, Wang JQ, Zhang HT. Effects of *Bacillus subtilis* natto on performance and immune function of preweaning calves [J]. *J Dairy Sci*, 2010, 93(12): 5851–5855.
- [32] Armstrong MJ, Pathmakanthan S, Iqbal TH. Fecal microbiota transplantation for *Clostridium difficile* infection [J]. *J Am Med Assoc*, 2015, 313(7): 725–726.
- [33] McDonald LC, Owings M, Jernigan DB. *Clostridium difficile* infection in patients discharged from US short-stay hospitals, 1996–2003 [J]. *Emerg Infect Dis*, 2006, 12(3): 409.
- [34] Jarvis WR, Schlosser J, Jarvis AA, et al. National point prevalence of *Clostridium difficile* in US health care facility inpatients, 2008 [J]. *Am J Infect Control*, 2009, 37(4): 263–270.
- [35] Ley RE, Bäckhed F, Turnbaugh P, et al. Obesity alters gut microbial ecology [J]. *Proc Nat Acad Sci U S A*. 2005, 102(31): 11070–11075.
- [36] El Feghaly RE, Bangar H, Haslam DB. The molecular basis of *Clostridium difficile* disease and host response [J]. *Curr Opin Gastroenterol*, 2015, 31(1): 24–29.
- [37] Eiseman B, Silen W, Bascom GS, et al. Fecal enema as an adjunct in the treatment of pseudomembranous enterocolitis [J]. *Surgery*, 1958, 44(5): 854–859.
- [38] Grehn MJ, Borody TJ, Leis SM, et al. Durable alteration of the colonic microbiota by the administration of donor fecal flora [J]. *J Clin Gastroenterol*, 2010, 44(8): 551–561.
- [39] Angelberger S, Reinisch W, Makristathis A, et al. Temporal bacterial community dynamics vary among ulcerative colitis patients after fecal microbiota transplantation [J]. *Am Gastroenterol*, 2013, 108(10): 1620–1630.
- [40] Johnsen J. Pathogenesis in immune thrombocytopenia: new insights [J]. *Hematology* 2012, 2012(1): 306–312.
- [41] Assy N, Rosenthal E, Hazani A, et al. Human parvovirus B19 infection associated with idiopathic thrombocytopenic purpura in a child following liver transplantation [J]. *J Hepatol*, 1997, 27(5): 934–936.

[收稿日期] 2017–10–16