

山羊乳腺炎病原菌分离及药物敏感性分析

曹钰晗¹ 刘 畅¹ 赵春阳¹ 徐璐尧¹ 张文劲¹ 陈颖钰¹ 郭爱珍¹ 胡长敏^{1,2*}

1.华中农业大学动物医学院,武汉 430070;2.华中农业大学兽医院,武汉 430070

摘要 对湖北某羊场发生体温升高、精神沉郁、卧地不起、呼吸急促,呈拉风箱样症状的羔羊母乳进行病原菌分离培养、纯培养物 PCR 鉴定以及药物敏感性分析。结果表明,从送检奶样中共分离到 3 种病原菌,分别为葡萄球菌、大肠杆菌和罗氏菌。药敏试验表明本次试验分离到的病原菌对绝大部分常用抗微生物药物产生了耐药性,故应选用敏感性高的药物进行治疗。

关键词 山羊;乳腺炎;病原菌分离;药敏试验

奶山羊乳房炎是一种常见病,是奶山羊饲养中发病率最高、流行最快、造成损失最严重的一种疾病,防治难度较大。它不仅给奶山羊养殖者造成严重的经济损失,影响了乳品的质量,甚至对人的饮食卫生及身体健康构成严重威胁^[1]。羊乳腺炎通常由于病菌侵入所引起,引起乳腺炎的病菌包括细菌、霉形体等 20 余种。90%的乳腺炎是由革兰氏阳性菌中的金黄色葡萄球菌和链球菌感染所致^[2],其中以溶血性金黄色葡萄球菌、无乳链球菌危害最重^[3]。这些病菌可单独感染,也可混合感染,病原微生物一

般是通过乳头管或乳房的损伤口侵入乳腺内,有时也可经血管或淋巴管而感染^[4-5]。

由于本次羊场的发病动物为 1 周龄的羔羊,正处于哺乳期,免疫系统发育还不健全,其免疫力主要通过吮吸母乳获得,由初乳中的母源抗体为羔羊提供免疫力,但是如若母畜患有乳腺疾病、乳汁质量下降,对幼畜可能会造成不可估量的损伤,本次送检羊乳中含有病原微生物是重要可疑致病因素之一,对于母羊乳腺炎病原菌的检测非常必要^[6]。母羊乳汁质量的检测,对判断动物发病病因、以及对

收稿日期:2017-08-18

基金项目:国家重点研发计划(2016YFD0500906);国家肉牛/牦牛产业技术体系(nycytx-37);中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(2662015PY054);湖北省自然科学基金项目(2015CFB435);

* 通讯作者

曹钰晗,女,1995 年生,华中农业大学学生。

样已为次新鲜,到第 7 天已变质,不得食用。说明时间对肉样变质程度的影响十分显著。

2)采样地点对肉样变质程度的影响并不显著,但总的来说,大润发和五星菜市场的猪肉卫生质量要略好于琴川菜市场。

3)市场猪肉出售环境不卫生,案板式的生猪肉销售方式很容易使肉品发生腐败变质,因此,采用冷藏等方式的生猪肉销售方式的改变是必须的。近年来,我国颁布实施了《生猪屠宰条例》等一系列的法律法规,且生猪已实行“定点屠宰,集中检疫”的管理方式,因此,更应加强检疫工作的力度,改善猪

肉的运输、销售环境,确保市售猪肉的清洁卫生。

参 考 文 献

[1] 中国预防医学科学院标准处.食品卫生国家标准汇编[M].北京:中国标准出版社,1999.

[2] 张彦明.无公害动物源性食品检验技术[M].北京:中国农业出版社,2003.

[3] 杨兴武,刘振国,刘运成.绿色食品企业标准——(冷却、冷冻)分割猪肉[J].四川畜牧兽医,2002,29(8):17-18.

[4] 贵州农学院.生物统计附试验设计(畜牧专用)[M].北京:农业出版社,1980.

于该场乳腺炎状况,帮助指导全身性用药和指导临床相关环境消毒、优化饲养程序等具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1)病料来源。2014 年 11 月中旬,湖北省京山县某集约化羊场山羊分娩后 1 周哺乳期羊乳。

2)试剂及主要仪器。TSA(tryptic soy agar)、TSB(tryptic soy broth)购自上海生工生物工程公司。药物敏感试纸,包括环丙沙星、链霉素、新霉素、壮观霉素、四环素、强力霉素、庆大霉素、复方磺胺、红霉素、青霉素、氯霉素、卡那霉素等 23 种,为浙江省卫生防疫所生物试剂有限公司产品,批号:20021229。

1.2 试验方法

1)分离鉴定。将送检奶样分别加入 EP 管中,1 200 r/min 离心 2 min,弃去乳脂层和上清,将下层沉淀用移液器吸出接种于培养基上,使用四分区划线法均匀接种于 TSA 培养基,38 °C 恒温培养 12 h,12 h 后取出,将可疑菌落接种于 TSA 培养基进行纯培养,革兰氏染色,在显微镜油镜下观察菌体形态。

2)PCR 鉴定。挑取 TSA 平板上的单菌落至 TSB 中,于 37 °C 摇床培养 6~8 h,直至菌液变浑浊,然后将 500 μL 50% 的灭菌甘油与 500 μL 菌液混匀,保存于 -20 °C 冰箱中。用接种环取少许被检菌落于 100 μL 无菌 PBS 中混匀,取 1 μL 菌悬液作 PCR 模板。以细菌 16S rDNA 为目的通用序列,引物由生工基因合成。反应体系(50 μL):10 μmol/L 上下游引物各 2 μL,模板 7.5 μL,灭菌 ddH₂O 13.5 μL。反应条件:95 °C 变性 10 min,进入 PCR 循环,94 °C 30 s,55 °C 30 s,72 °C 90 s,30 个循环后,延伸 76 °C 10 min,16 °C 10 min 后结束反应。其产物采用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测,测序。

3)药敏试验。从纯培养物中挑取 1 个单菌落加入 TSB 培养基中,放入摇床扩大培养 12 h,12 h 后液体培养基变浑浊,证明菌已经成功扩大培养。在超净台中用移液器取 50 μL 菌液加入 TSA 培养基中,用涂板器将菌液均匀涂布于培养基上,待其稍干后按照顺序分别放入药敏纸片,37 °C 恒温培养 18 h 后测量抑菌圈的大小。本次药敏试验共使用了 23 种抗菌药物,囊括了 β-内酰胺类药物、氨基糖苷类药物、四环素类药物、喹诺酮类药物。

2 结果与分析

1)分离鉴定。送检的 9 个奶样中接种 TSA 培养基后有菌生长的有 5 个,编号分别为 2053、3053、4156、4077、0 号。在 TSA 培养基上生长的单菌落形态有所不同,分别为 4156 号乳白色,菌落湿润,圆形,边缘光滑;4077 号乳白色,菌落湿润,圆形,边缘光滑,但是生长速度相对较快,培养相同时间后,其单菌落的大小明显大于其他培养物(图 1-A);2053 号乳白色,菌落湿润,圆形,边缘光滑(图 1-B);0 号乳白色,菌落湿润,圆形,边缘光滑,但菌落相对其他菌落小,而且生长较慢(图 1-C);3053 号菌落湿润,菌落较大,边缘略不整齐(图 1-D)。

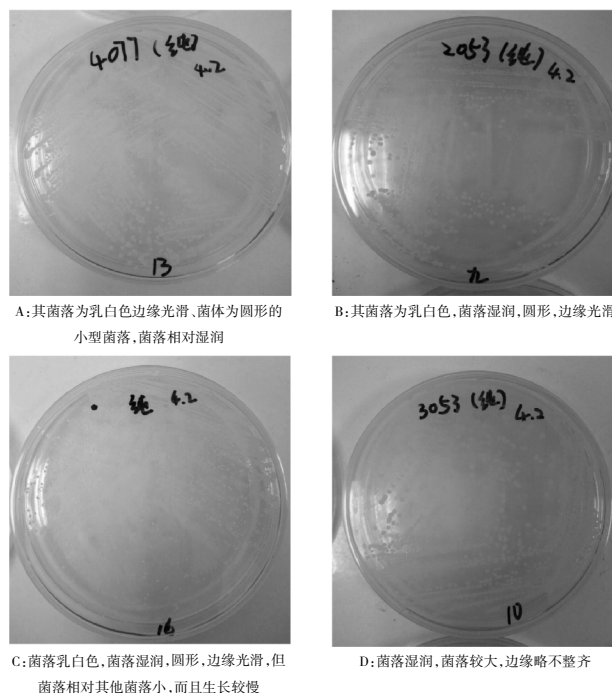


图 1 细菌纯化结果

2053、3053、4077 号镜检结果相似,革兰氏染色阳性,细胞被染成紫色,菌体为圆形,菌体大小相对较大,没有运动性,单独或者成对存在,在本次镜检中并没有发现长链状分布的菌体;4156 号镜检结果为革兰氏染色阴性,菌体为杆状,没有两极浓染,菌体被染色成为颜色相对均一的红色。菌体多为单个存在,或成对存在,没有发现特征性分布;0 号镜检结果为革兰氏染色阳性,菌体为杆状,无特征性两极浓染现象,菌体无特征性分布。

2)PCR 鉴定。通过琼脂糖凝胶电泳,获得如图 2 所示结果,M 为 marker,1 号为 2053 号样本管 1;2 号为 3053 号样本管 1;3 号为 4156 号样本管 1;4

号为 4077 号样本管 1;5 号为 3053 号样本管 2;6 号为 0 号样本管 1;7 号为 0 号样本管 2;8 号为 4156 号样本管 2;9 号为 4077 号样本管 2。切胶回收,测序,将检测获得的序列用 Blast 检测与 GeneBank 中的序列进行对比,结果为 2053、3053、4077 号为葡萄球菌,4156 号为大肠杆菌,0 号为罗氏菌。

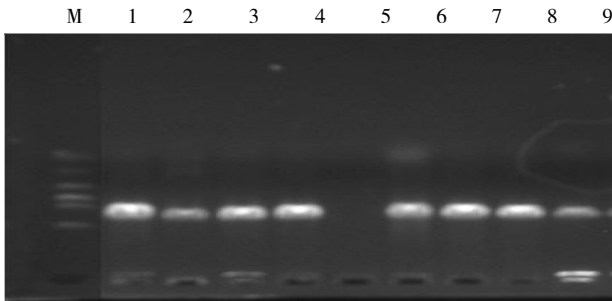


图 2 PCR 电泳结果

3)药敏试验。本次获得的病原菌葡萄球菌、大肠杆菌、罗氏菌对于青霉素、链霉素、红霉素等 23 种药物产生的抑菌环直径大小见表 1。病原菌对于

表 1 药敏试验结果

药物	药品序号	葡萄球菌组抑菌环直径/mm	大肠杆菌组抑菌环直径/mm	罗氏菌组抑菌环直径/mm
四环素	1	0	0	14
头孢呋辛	2	32	0	18
阿米卡星	3	20	20	16
头孢曲松	4	28	0	20
红霉素	5	0	0	0
林可霉素	6	12	0	12
卡那霉素	7	10	16	12
庆大霉素	8	12	0	6
氨苄西林	9	14	0	14
罗红霉素	10	0	0	0
恩诺沙星	11	20	0	30
链霉素	12	0	0	0
环丙沙星	13	14	0	10
头孢哌酮	14	22	0	0
头孢唑啉	15	32	0	22
大观霉素	16	0	18	0
青霉素	17	12	0	0
环氧沙星	18	16	0	17
复方新诺明	19	0	0	0
氯霉素	20	12	12	17
呋喃唑酮	21	22	16	0
左氧氟沙星	22	17	12	22
阿奇霉素	23	0	11	0

药物的敏感性是根据抑菌环的浓度来判定的,具体的判断标准见表 2。

表 2 药敏试验结果判断标准

抑菌环直径/mm	敏感性
20 以上	极度敏感
15 ~ 20	高度敏感
10 ~ 14	中度敏感
10 以下	低度敏感
0	不敏感

为了更加直观地对试验结果进行观察,将各个被检菌对不同药物的敏感性进行汇总(表 3)。第 1 组为葡萄球菌组,葡萄球菌是一种革兰氏染色阳性球菌,具有细胞壁,对于作用于细胞壁的 β -内酰胺类药物敏感性较高,对于青霉素等常用窄谱抗菌药物敏感性较差。本次试验中所分离到的菌株对于头孢呋辛、头孢曲松钠、头孢哌酮、头孢唑林、呋喃唑酮等极度敏感,对于四环素、红霉素、罗红霉素等广谱抗菌药物不敏感;第 2 组为大肠杆菌组,大肠杆菌是一种革兰氏阴性菌,对于氨基糖苷类抗生素敏感性高。本次试验中分离获得的菌株缺乏极度敏感药物,对于阿米卡星、卡那霉素、大观霉素、呋喃唑酮高度敏感,对链霉素、庆大霉素等药物不敏感,可能是因为目前抗生素的使用过于泛滥和用药相对不规范导致大肠杆菌对于这些常用抗生素产生耐药性,对于广谱性抗生素四环素、红霉素、罗红霉素等同样不敏感;第 3 组为罗氏菌组,属于放线菌科、罗氏菌属的不规则杆菌,革兰氏染色阳性,有细胞壁,多为条件致病菌,本试验中结果表明,该菌对 β -内酰胺类抗生素、喹诺酮类药物的敏感性较高,对氨基糖苷类药物的敏感性较低或者不敏感。

3 讨 论

3.1 试验方法分析

本次试验为了尽快给出临床治疗方案故采用了相对简单直观地方法进行研究。通过病原菌的分离培养、PCR 鉴定、药物敏感性试验可以初步断定病原菌,但是病原菌的毒力、致病机理等仍然需要后续的研究。

1)病原菌鉴定的新型方法。本次试验中,病原菌鉴定选用的方法为针对细菌 16S rRNA 中的序列进行 PCR 扩增,扩增产物进行序列分析进而确定细菌种类,这也是目前实验室常用的鉴定方法之一。

表 3 药敏试验敏感性汇总

项目	极度敏感	高度敏感	中度敏感	低度敏感	不敏感
第 1 组 (葡萄球菌)	头孢呋辛、头孢曲松钠、头孢哌酮、头孢唑林、呋喃唑酮(5 种)	阿米卡星、恩诺沙星、氧氟沙星、左氧氟沙星(4 种)	林可霉素、卡那霉素、环丙沙星、庆大霉素、氨苄西林、青霉素、氯霉素(7 种)	无	四环素、红霉素、罗红霉素、链霉素、大观霉素、复方新诺明、阿奇霉素(7 种)
第 2 组 (大肠杆菌)	无	阿米卡星、卡那霉素、大观霉素、呋喃唑酮(4 种)	氯霉素、左氧氟沙星、阿奇霉素(3 种)		四环素、头孢呋辛、头孢曲松钠、红霉素、林可霉素、庆大霉素、氨苄西林、罗红霉素、恩诺沙星、链霉素、环丙沙星、头孢哌酮、头孢唑林、青霉素、氧氟沙星、复方新诺明(16 种)
第 3 组 (罗氏菌)	恩诺沙星、头孢唑林、左氧氟沙星(3 种)	阿米卡星、头孢曲松钠、氧氟沙星、氯霉素(4 种)	四环素、林可霉素、卡那霉素、氨苄西林、环丙沙星(5 种)	庆大霉素(1 种)	头孢呋辛、红霉素、罗红霉素、链霉素、头孢哌酮、大观霉素、青霉素、复方新诺明、呋喃唑酮、阿奇霉素(10 种)

细菌的常规分离鉴定耗时非常长,不利于病羊的快速诊断,此次病原鉴定中应用了 16S rRNA 序列分析鉴定,提高了动物疾病诊疗的准确性和及时性,为动物疾病快速诊断和防制打下了良好的基础。相关文献中还有运用血清学预分析、焦磷酸共聚焦等比较新型技术进行病原菌鉴定的方法。其中血清学预分析技术还可以与鸟枪法基因筛选技术相结合使用,可以用于鉴定病原菌感染机体后机体内产生的免疫蛋白的种类以及鉴别主要作用蛋白以及辅助作用蛋白,不但通过蛋白种类的不同鉴定辨别病原种类,还可以通过蛋白分型、结构等判定炎症阶段^[7]。

2) 药物敏感性试验。评价一种测量方法的优劣要同时评价其准确性与灵敏性。本次试验中选用的是琼脂纸片扩散法(agar disk diffusion, ADD), 该技术操作相对简单,速度快,且通过观察抑菌圈直径的大小可以直接对结果进行判读。但是该法主要为定性试验,准确性差;另外一种常用于判断药物敏感性的方法是通过肉汤稀释法测定最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC), 该方法属于定量分析,操作时间相对较长、结果不易直观判断。黎满香等^[8]对 2 种方法进行比较,发现 2 种方法所得到的结果具有相关性,但是通过测量 MIC 所得到的抑菌效价要比纸片法获得的结果高,表明肉汤稀释法灵敏性高,但二者存在相应的线性关系。众所周知,通过观察抑菌圈直径大小判断抑菌效价的方法还有试管二倍梯度稀释法、平板打孔法、牛津杯法等,刘如运^[9]发现不同抑菌试验方法对抑菌效果的评价有明显影响。从产生的抑菌圈大小来看,试管二倍梯度稀释法更为直观、可靠,可进行定量抑菌分析;琼脂扩散定性抑菌试验中牛津杯法较

好,平板打孔法其次,但进行火焰封底效果更好,滤纸片法结果一般;从含菌平板制备方式来看,涂布法比倾注法效果好。但是病原种类、生长特性、培养方法等对于试验结果都有一定影响,相关研究仍在继续。

本次试验中所采用的 ADD 法,通过抑菌环直径大小可以初步判断不同药物敏感性,但是缺少定量分析,对于指导临床具体用药剂量缺乏试验依据,后续研究中可以将 2 种方法相结合,并且根据病原种类选择相应的药敏试验,定性分析的同时进行定量分析,完善治疗方案,减缓病原菌耐药性的发展。

3.2 菌株的耐药性分析

本次分离到的致病菌为葡萄球菌、大肠杆菌和罗氏菌,相关研究表明,90%的乳腺炎是由链球菌(如无乳链球菌)、葡萄球菌、肠杆菌这 3 种菌引起,与本次试验结果相符。刘涤洁等^[10]通过在健康奶山羊一侧乳区内接种 1 mL(10⁶ cfu/mL)金黄色葡萄球菌悬液复制乳房炎病理模型,接种后临床症状、体温变化、乳中体细胞数测定、乳牛乳腺炎电子检测仪检测、病原菌分离培养及病理组织学变化均与乳腺炎症状相符,根据柯赫氏法则,证明金黄色葡萄球菌是乳腺炎病原之一。罗氏菌在山羊乳腺炎的相关报道中目前并未涉及,根据相关报道,罗氏菌多为呼吸道条件致病菌,本次分离到罗氏菌可能是由母体免疫力下降导致罗氏菌由调价致病菌转化为病原菌,并且伴随血液循环、乳汁分泌等生理过程进入乳汁。

本次试验表明,以上 3 种菌株对于临床常用抗生素都产生了严重的耐药性。葡萄球菌、大肠杆菌的耐药性明显,葡萄球菌对于四环素、红霉素、罗红

霉素、链霉素、大观霉素、复方新诺明具有耐药性；大肠杆菌在本次检验的 23 种药物中缺乏极度敏感的药物，并且对于常用的氨基糖苷类药物的敏感性大幅度降低。

1) 葡萄球菌的耐药性分析。本次试验针对送检病例进行研究，并没有全群进行分析，但通过实验室检查，可以确定送检羊乳的病原组成。Mar é chal 等^[11]发现在法国的东南部地区，金黄色葡萄球菌可以引起羊的亚临床型乳腺炎到坏疽性乳腺炎不等的临床症状，对于乳汁质量与产量都造成严重影响。葡萄球菌在乳腺炎中的重要影响越来越引起相关从业人员的重视，一部分相关人员在日粮或饮水中添加抗菌药以预防葡萄球菌感染。蔡元等^[12]对甘肃某大型牧场进行研究，发现当地奶场中分离的菌株同样表现出对青霉素、头孢曲松钠、四环素、克林霉素明显的耐药性，其耐药率分别为 75.29%、60.59%、63.53%、61.67%，该现象在奶山羊中也存在，郑凤英^[13]对滨州市奶山羊临床型乳房炎进行调查，采集羊乳并进行细菌分离培养及耐药性分析，结果从 29 份奶样中检出 47 株病原菌，金黄色葡萄球菌 16 株，表皮葡萄球菌 14 株，大肠埃希菌 6 株，耐药分析表明，葡萄球菌对青霉素及头孢类耐药，其他分离菌株对头孢唑林、头孢曲松、头孢西丁等药物敏感，对青霉素、复方新诺明耐药。相关文献与本次试验结果相吻合，均表明葡萄球菌产生了较强的耐药性。Burlak 等^[14]对全球葡萄球菌的耐药性现状分析，也发现各地的葡萄球菌都存在不同程度的耐药性，与气候条件、饲养规模、饲养方法、环境消毒等因素都有关联。不同地区的耐药性存在差异，还可能与病原结构、环境条件、当地兽医用药习惯以及不同奶羊场饲养方法不同有关。

2) 大肠杆菌的耐药性分析。本次研究中分离到的大肠杆菌对于临床常用抗生素都产生了相应的耐药性，本次选用的 23 种药物中缺乏对菌株极度敏感的药物，同时对于林可霉素、庆大霉素、罗红霉素、恩诺沙星、链霉素、环丙沙星、氧氟沙星等都产生了耐药性。吴忆春^[15]对羊源性大肠杆菌进行药敏试验，结果表明大肠杆菌对多种强力药物如链霉素、青霉素等都产生了耐药性，与本试验结果相似，但其选用的药物与本次试验所选用的药物组成有所不同，具体结果与本试验有微小差异。牛乳中分离到的大肠杆菌也具有较强的耐药性，并且各地分

离到的地方菌株的耐药性也不同。王晓等^[16]对某牛场的荷斯坦牛所产的牛乳进行检验，发现大肠杆菌对青霉素、克林霉素的耐药率为 96.43%，Ecs3703、CNF2 和 Irp2 等毒理基因检出率高达 100%，其中细胞毒性坏死因子是公认的大肠杆菌毒力因子，可以造成血管内皮的损伤，造成微血栓性血管病；Irp2 是强毒力岛中的铁调节基因，与 Irp1 仅在致病菌中表达（包括大肠杆菌、克雷伯菌、沙门氏菌等）；Ecs3703 是毒力岛 ETT2 的标记基因，而 ETT2 基因簇是肠出血性大肠杆菌的重要毒力岛，而在其试验中所获的相应菌株中这几类毒力因子的检出率竟然高达 100%，李路等^[17]对北京地区某牧场进行奶源大肠杆菌的药敏试验发现其临床获得的 48 株大肠杆菌对 24 种抗菌药物中的 6 种药物耐药率超过 50%，青霉素、苯唑西林、万古霉素的耐药率甚至达到 80% 以上，同一菌株最多耐药 17 种，最少耐药 2 种，耐药 5 种以上菌株占到 72.92%。这些试验所得数据都大同小异，有大量文献报道世界各地反刍动物乳腺炎病原菌的耐药性不断增强，大量抗生素的使用导致病原微生物的抗药性发生“滚雪球效应”，甚至产生超级细菌，研究发现分离的大肠杆菌对多种药物产生不同程度的耐药性，存在着严重的多重耐药情况。这些都应该引起医务工作者的高度重视。

临床上羊大肠杆菌乳腺炎的发生与饲养管理、饲料、环境卫生、气候变化等有密切的关系，因此羊群的饲养管理中应“防大于治”，以提高羊群的疾病抵抗力；发病后应及时准确地进行病原分离鉴定，并参照药敏试验结果有针对性投药，对患病羊的治疗才能有效，并为以后的羊群疾病防制打下良好的基础。

3) 合理用药。目前我国的抗生素使用并未完全规范化，耐药菌株不断增加，药物选用不当，用药剂量或疗程不合理，不规范联合用药，忽视药物动力学和药效学的影响等，往往导致抗菌药物临床治疗失败。选用高敏感药物、停用或不用低敏感性药物，合理联合用药是延缓耐药性产生的重要措施^[18]。根据本次试验结果，建议该场选用头孢唑啉、头孢曲松钠、阿米卡星等高敏感药物，联合用药或者轮换用效果更好。目前有复方阿莫西林纳米乳将传统抗生素与纳米技术相结合，在乳腺炎的治疗上有相对明显的效果，可能是由于运用纳米技术增加了抗生素类药物的组织穿透性，使得药物能够到达病灶，增强药物作用^[19]。随着科技的不断发展，相信高效低

毒的抗菌药物定会产生。

3.3 展望

奶山羊乳房炎是一种常见病,是奶山羊饲养中发病率最高、流行最快、造成损失最严重的一种疾病,防治难度较大。山羊奶营养价值非常高,以脂肪球细小和乳糖含量较牛奶低而受到消费者的青睐。目前国内外山羊奶开发出的产品种类多样,涉及到食品、保健品、化妆品等行业^[20]。乳腺炎的发生与发展对以上相关奶产品业的发展、人的饮食卫生及身体健康造成危害。相关研究都指出常见乳腺炎病原菌在全球范围内都一定程度上产生了耐药性^[21]。高效疫苗的研发、乳腺炎的防治新方法、乳汁质量的系统化检测等都成为今后研究的新方向。

4 结论

本次试验中主要针对送检乳样进行研究,分离到的菌株分别为葡萄球菌、大肠杆菌、罗氏菌。本次试验中获得的葡萄球菌菌株具有较强的抗药性,对于一些常用的 β -内酰胺类药物基本上都有耐药性,对于第三、四代的抗菌药的敏感性也在不断地降低;大肠杆菌菌株对于氨基糖苷类抗生素链霉素、庆大霉素、大观霉素等药物抑菌环直径为零,表明该菌对上述药物产生了耐药性,对于广谱性抗生素四环素、红霉素、罗红霉素、氧氟沙星等也产生了一定的耐药性;罗氏菌在相关文献中报道非常少,而且在临床乳腺炎的分离鉴定中很少。本试验中所分离出的菌株均具有一定的抗药性,与文献中的结果大致相同,但同时由于药敏试验的方法不同以及用于药敏试验的相关药物不同,所以相关的试验数据可能不同。

参 考 文 献

[1] 张亚蓉.奶山羊乳腺炎的防治[J].中国畜牧兽医文摘,2015,31(2):148.
 [2] 王健.羊乳腺炎的中西医疗法[J].养殖技术顾问,2013(12):117.
 [3] 孙建萍.奶山羊乳腺炎的防治经验[J].今日畜牧兽医,2014(3):57-59.

[4] 杨秀平,肖向红.动物生理学实验[M].北京:高等教育出版社,2009.
 [5] 张瑞娟.羊乳腺炎的临床症状及治疗措施[J].畜牧兽医杂志,2015,34(2):132-133.
 [6] 陈璐,周燕红,吴文君,等.羊乳腺炎的诊治与预防措施[J].上海畜牧兽医通讯,2013(2):85.
 [7] SUOJALA L,SIMOJOKI H,MUSTONEN K,et al.Efficacy of enrofloxacin in the treatment of naturally occurring acute clinical *Escherichia coli* mastitis [J].J Dairy Sci,2010,93(5):1960-1969.
 [8] 黎满香,刘红旗,陈可毅,等.试管法和纸片法抑菌试验的比较[J].中国兽医科技,1997(2):31-32.
 [9] 刘如运.几种常用抑菌试验方法的评价及比较[J].现代企业教育,2013(14):341-342.
 [10] 刘洁洁,石伟,庄伟东,等.奶山羊实验性乳房炎病理模型[J].华南农业大学学报,2002(4):75-77.
 [11] MAR & CHAL C L,JARDIN J,JAN G,et al.*Staphylococcus aureus*, seroproteomes discriminate ruminant isolates causing mild or severe mastitis [J].Veterinary Research,2011,42(1):1-20.
 [12] 蔡元,张成虎,田斌,等.甘肃省部分地区奶牛乳腺炎金黄色葡萄球菌的分离鉴定及耐药性分析[J].中国奶牛,2014(21):32-34.
 [13] 郑风英.滨州市奶山羊临床型乳房炎病原菌的分离鉴定与耐药性分析[J].动物医学进展,2014,35(8):122-125.
 [14] BURLAK C,HAMMER C H,ROBINSON M A,et al.Global analysis of community associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus* exoproteins reveals molecules produced in vitro and during infection [J].Cellular Microbiology,2007,9(5):1172.
 [15] 吴忆春.羊源 O78 型大肠杆菌的分离及 16S rDNA 序列分析[J].中国畜牧兽医,2014,41(5):240-243.
 [16] 王晓,王新,郝丹,等.奶牛乳源大肠杆菌耐药性、毒素基因鉴定及 PFGE 分型研究[J].畜牧兽医学报,2014,45(3):463-470.
 [17] 李路,刘继超,姜铁民,等.北京地区奶牛养殖场中大肠杆菌的分离鉴定及耐药性分析[J].中国乳品工业,2014,42(12):7-9.
 [18] 陈杖榴.兽医药理学[M].北京:中国农业出版社,2002.
 [19] 叶倩,王礼伟,屈勇刚,等.奶牛乳房炎防治的研究进展[J].现代畜牧兽医,2014(1):56-61.
 [20] 陈雪,张富新,贾润芳,等.山羊奶产品开发研究[J].农产品加工(学刊),2013(17):46-48+51.
 [21] KLIMIENE I,RUZAUSKAS M,SPAKAUSKAS V,et al. Antimicrobial resistance patterns to beta-lactams of gram-positive cocci isolated from bovine mastitis in Lithuania[J].Polish Journal of Veterinary Sciences,2011,14(3):467-72.