

應用生物晶片診斷乳房炎病原菌之研究⁽¹⁾

李國華⁽²⁾ 施意敏⁽²⁾ 莊士德⁽³⁾ 李素珍⁽²⁾ 張菊犁⁽²⁾
吳明哲⁽⁴⁾ 季昭華^{(5) (6)}

收件日期：95年10月17日；接受日期：96年3月3日

摘要

乳房炎是乳牛最重要的疾病且廣佈於世界各地，造成的經濟損失甚鉅，為達快速防治乳房炎之目的，本試驗建立乳房炎生物晶片之檢測法並應用於泌乳牛群，可在六小時內快速檢出生乳中之金黃色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 與無乳鏈球菌 (*Streptococcus agalactiae*) 兩種傳染性病原菌，以及大腸桿菌 (*E. coli*)、異乳鏈球菌 (*Streptococcus dysgalactiae*)、乳房鏈球菌 (*Streptococcus uberis*)、牛鏈球菌 (*Streptococcus bovis*) 等四種環境性病原菌。採集1 ml的生乳，經去乳脂、萃取微生物DNA、PCR反應、DNA雜合反應與呈色反應後，根據晶片上具專一性之核酸探針的點陣排列圖直接判讀結果。在2004年，篩檢207戶泌乳牛群之總乳，牛鏈球菌陽性檢出率最高163戶 (78.7%)，其次依序為乳房鏈球菌 (60.4%)、大腸桿菌 (45.4%)、異乳鏈球菌 (30.0%)、無乳鏈球菌 (27.5%) 及金黃色葡萄球菌 (9.2%)，顯示乳房炎生物晶片是一快速檢測牛乳中乳房炎病原菌的新方法，未來加入乳房炎防治工作深具潛力。

關鍵詞：乳房炎、生物晶片、乳房炎病原菌。

緒言

乳房炎是造成酪農主要經濟損失的疾病之一，包括乳量減少、藥物治療期間牛乳的廢棄、藥品費、獸醫治療費及額外勞力支出等，引起乳房炎發生的因素很多，如人、牛、病原、飼養管理及環境因子等交互作用所致 (DeGraves and Fetrow, 1993)，最主要由細菌感染乳腺引發炎症反應造成乳房炎，一般將乳房炎概分為臨床性乳房炎 (clinical mastitis) 與非臨床性乳房炎 (subclinical mastitis)，臨床性乳房炎在被感染的乳房呈現紅、腫、熱及痛之臨床症狀，乳汁有結塊、片狀或水樣化之異常性狀，乳產量減少；非臨床性乳房炎，一般無明顯臨床症狀，無法以肉眼進行判斷，

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第1354號。

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所新竹分所。

(3) 國立中興大學獸醫系。

(4) 行政院農業委員會畜產試驗所遺傳育種組。

(5) 國立台灣大學獸醫系。

(6) 通訊作者，E-mail：chie@ntu.edu.tw。

必須藉由分離生乳中之病原菌或檢測生乳中體細胞數來判斷（吳，2000），因此非臨床性乳房炎常不易被察覺而長期存在於泌乳牛群當中，酪農往往僅發現冰山一角的臨床性乳房炎，對較無癥兆的非臨床性乳房炎常無法發覺。根據美國國家乳房炎委員會（National Mastitis Council）估計，美國每年因乳房炎所導致的乳量損失超過10億美元，平均每頭牛因乳房炎造成的損失約180美元（陳等，1992）。文獻指出最常見的乳房炎病原菌為金黃色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*）、無乳鏈球菌（*Streptococcus agalactiae*）、異乳鏈球菌（*Streptococcus dysgalactiae*）、乳房鏈球菌（*Streptococcus uberis*）與大腸桿菌屬（coliforms）（Jain, 1979; Watts, 1988），這些病原菌的來源源自於擠乳人員的手、牛隻體表、牛舍環境、污染的擠乳器具、蚊蠅等，範圍非常廣泛，因此要如何快速診斷出是哪一種病原菌所造成的乳房炎，是非常重要的，如此才能提供正確的用藥與提升乳房炎治癒率，達有效防治乳房炎。傳染性乳房炎病原菌是一種會快速傳播的病原菌，例如：金黃色葡萄球菌，主要寄存在乳腺深部組織、乳頭管及乳汁中，可經由擠乳杯、擦拭乳房的布巾或是擠乳人員的手，藉擠乳過程傳播給健康牛隻，引起臨床性或非臨床性乳房炎。急性臨床症狀包括發燒、乳房腫脹、溫熱、乳汁有乳絮的出現（吳，2000）。另一常見之傳染性病原菌，如無乳鏈球菌，常常造成非臨床性乳房炎，其致病機制：首先感染乳室及乳腺的導管系統，進而使乳腺發生炎症反應，但大多屬於非臨床性症狀，偶爾才會出現臨床性徵候，持續緩慢之炎症反應會增加其嚴重性（由非臨床性乳房炎轉變為慢性乳房炎），進而破壞整個乳腺組織，造成乳量下降或在隨後的泌乳期無法產乳或形成盲乳。無乳鏈球菌主要寄存處是已被感染的乳房，因此像牛床、擠乳機及擠乳者之手，很容易被感染乳區所分泌之生乳污染，而成為傳播病原菌的媒介（吳，2000）。

診斷乳房炎病原菌的方法有：I. 傳統微生物培養法，直接從乳樣培養微生物，經生化測試後鑑定細菌種類（吳，2000），例如：金黃色葡萄球菌、無乳鏈球菌的鑑定需費時5天。II. 分子生物學的方法，利用細菌核酸之特異性可快速診斷菌種，如聚合酶鏈鎖反應（polymerase chain reaction, PCR）檢測法（Forsman *et al.*, 1997; Hsu and Tsen, 2001; Meiri-Bendek *et al.*, 2002; Phuektes *et al.*, 2001, 2003），可快速且敏感地檢出主要常見之乳房炎病原菌，如金黃色葡萄球菌、無乳鏈球菌、異乳鏈球菌、乳房鏈球菌、牛鏈球菌和大腸桿菌（Riffon *et al.*, 2001）。本試驗的目的是應用具快速性、敏感性與特異性的乳房炎生物晶片，結合PCR與雜合探針點列於晶片上之技術，期在六小時內快速檢出生乳中之金黃色葡萄球菌與無乳鏈球菌兩種傳染性病原菌，以及大腸桿菌、異乳鏈球菌、乳房鏈球菌、牛鏈球菌等四種環境性病原菌，將有助於對引起乳房炎之細菌做即時之鑑別，作為正確投藥的參考，同時減少抗生素的濫用，達有效快速防治乳房炎之目的。

材料與方法

I. 牛乳樣品之採集

在2004年四月間，由全國DHI（Dairy Herd Improvement, DHI）酪農戶計207戶，配合輔導員進行每戶總乳之採樣，乳樣以低溫冰桶保存運送至本分所，進行乳房炎病原菌鑑定。

II. 乳房炎生物晶片套組（DR. Milk™ Chip, DR. Biotechnolog Inc.）檢測乳房炎病原菌步驟（參照使用手冊）：

- （i）去乳脂及收集微生物：取1 ml牛乳，離心10,000 rpm, 5 min，以棉花棒將最上層的乳脂去除，並倒去上清液，保留沈澱物，加入1 ml磷酸緩衝液（phosphate-buffered saline, PBS）沖洗，重複上述步驟兩次，收集沈澱物。

- (ii) 核酸萃取：將沈澱物加入30 μ l 1N NaCl/0.1N NaOH及5 μ l 10% SDS混合均勻，於沸水中加熱10 min，然後冰浴3 min，加入30 μ l 0.1N HCl混合均勻。接著以Viogene[®] PCR-M clean Up system並參照使用手冊進行核酸純化，將所得之核酸溶液保存於-20 $^{\circ}$ C直到進行PCR。
- (iii) PCR核酸擴增反應：整套實驗需進行四個反應管，分別是含有鏈球菌屬、金黃色葡萄球菌、大腸桿菌、牛體細胞G3PDH之特異性引子，每管的反應體積為50 μ l，取5 μ l 10X PCR buffer、4 μ l 2.5 mM dNTP、0.25 μ l primer (100 μ M) (each) (如表1)、1.25U *taq* polymerase (Promega)、2 μ l生乳檢體的核酸、加無菌水至50 μ l，混合均勻。PCR反應設定的程式：先經94 $^{\circ}$ C，4 min預熱變性，再經94 $^{\circ}$ C，30 sec、55 $^{\circ}$ C，30 sec、72 $^{\circ}$ C，30 sec共40次循環，最後72 $^{\circ}$ C，6 min extention反應後降至4 $^{\circ}$ C保存。
- (iv) 晶片雜交反應及呈色：取5 μ l各管PCR產物 (有四管，所以共20 μ l)，加到480 μ l hybridization buffer (DR. Hyb[™] buffer)，於沸水中加熱5 min後冰浴2-3 min，將此雜交緩衝液，加到含乳房炎核酸探針的晶片容器中，晶片上具有專一性之核酸探針 (如表2) 的點陣排列，搖動一下，使晶片完全被緩衝液蓋滿 (如晶片下有氣泡亦需將其

表 1. 乳房炎生物晶片之特異性引子

Table 1. The specific primers of mastitis biochip

| Genus | Type | Name | Species | Locus | Sequence (5' \rightarrow 3') | Length |
|-----------------------|----------|--------------|----------------------|------------------|-----------------------------------|--------|
| <i>Streptococcus</i> | F primer | aga f 16-1 | <i>Streptococcus</i> | 16-23S spacer | AAGTCGTAACAAGG TAGC | 350 bp |
| <i>Streptococcus</i> | R primer | aga r 23-1 | <i>Streptococcus</i> | 16-23S spacer | Biotin-GCGCCCTTATT AACTTA | 350 bp |
| <i>Staphylococcus</i> | F primer | Sta-f-5 | <i>S. aureus</i> | Nuclease gene | AGTATATAGTGCAAC TTCAACTAAA | 450 bp |
| <i>Staphylococcus</i> | R primer | Sta-f-6 | <i>S. aureus</i> | Nuclease gene | Biotin-ATCAGCGTTG TCTTCGCTCCAAATA | 450 bp |
| <i>E. coli</i> | F primer | Emdh1 | <i>E. coli</i> | Emdh gene | ACTGAAAGGCAAAC AGCCAAG | 392 bp |
| <i>E. coli</i> | R primer | Emdh2 | <i>E. coli</i> | Emdh gene | Biotin-CGTTCTGTTC AATGGCCTCAGG | 392 bp |
| G3PDH | F primer | boving3p 1-f | Positive control | Bovin G3PDH gene | TTAATTCTGGCAAA GTGGA | 308 bp |
| G3PDH | R primer | boving3p 1-r | Positive control | Bovin G3PDH gene | Biotin-GAGAAGGTGC AGAGATGATG | 308 bp |

G3PDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH)

表 2. 乳房炎生物晶片之特異性探針

Table 2. The specific probes of mastitis biochip

| Genus | Type | Name | Species | Locus | Sequence (5' → 3') |
|-----------------------|-------|-----------|------------------------|---------------------|--|
| <i>Streptococcus</i> | Probe | Mbe1strep | <i>Streptococcus</i> | 16-23S spacer | TTTTTTTTTTTTTTTTTTAAGG AAACCTGCCATTGCGTCTTGTT |
| <i>Streptococcus</i> | Probe | Mbe2strep | <i>Streptococcus</i> | 16-23S spacer | TTTTTTTTTTTTTTTTTTCTAG TTTAAAGAAACTAGGTTAATAA |
| <i>Streptococcus</i> | Probe | Mbe1aga | <i>S. agalactiae</i> | 16-23S spacer | TTTTTTTTTTTTTTTTTTAAGG AAACCTGCCATTGCGTCTTGTT |
| <i>Streptococcus</i> | Probe | Mbe2aga | <i>S. agalactiae</i> | 16-23S spacer | TTTTTTTTTTTTTTTTTTCAGCG GTTCGATCCCCTAGGCTCCATT |
| <i>Streptococcus</i> | Probe | beDy1 | <i>S. dysgalactiae</i> | 16-23S spacer | TTTTTTTTTTTTTTTTTTGAAAT GGAACACGTTAGGGTCGTCT |
| <i>Streptococcus</i> | Probe | beDy2 | <i>S. dysgalactiae</i> | 16-23S spacer | TTTTTTTTTTTTTTTTTTCTAG TTAAGATATACTAGTAAAAGAT |
| <i>Streptococcus</i> | Probe | beUb1 | <i>S. uberis</i> | 16-23S spacer | TTTTTTTTTTTTTTTTTTAAGG AACACGTTGGTTAAGTCT |
| <i>Streptococcus</i> | Probe | BeUb2 | <i>S. uberis</i> | 16-23S spacer | TTTTTTTTTTTTTTTTTTAATCA AGAAGGTCTAAGGACTGGAAATA AT |
| <i>Streptococcus</i> | Probe | beBo1 | <i>S. bovis</i> | 16-23S spacer | TTTTTTTTTTTTTTTTTTAAAC GGAAGCACGTTGGGTAT |
| <i>Streptococcus</i> | Probe | BeBo2 | <i>S. bovis</i> | 16-23S spacer | TTTTTTTTTTTTTTTTTTAGTTT AAGGTCAACAGAACCAAAATAA |
| <i>Staphylococcus</i> | Probe | NucP1 | <i>S. aureus</i> | Nuclease gene | TTTTTTTTTTTTTTTTTTTGATA AATATGGACGTGGCTTAG |
| <i>Staphylococcus</i> | Probe | NucP2 | <i>S. aureus</i> | Nuclease gene | TTTTTTTTTTTTTTTTTTTAGAA ATATGGTCCTGAAGCAA |
| <i>E. coli</i> | Probe | bemdh3 | <i>E. coli</i> | Emdh gene | TTTTTTTTTTTTTTTTTTGGCG TTAGTTTACCGAGCAGGAAG |
| <i>E. coli</i> | Probe | bemdh4 | <i>E. coli</i> | Emdh gene | TTTTTTTTTTTTTTTTTTTCGGTT ATTGGCGGTCACTCTGG |
| G3PDH | Probe | beG3P-1 | Positive control | Bovin G3PDH gene | TTTTTTTTTTTTTTTTTTCTCTGC CAACATCAAGTGGGGTGATGC |
| G3PDH | Probe | beG3P-2 | Positive control | Bovin G3PDH gene | TTTTTTTTTTTTTTTTTTCAGA GAACGGGAAGCTCGTCATCAA |
| Negative control | Probe | Actin313 | Negative control | | TTTTTTTTTTTTTTTTTTGGCC ATCCAGGCCGTGCTGTCCCTCTA CGC |
| | Probe | ECP6 | Emdh2 anti-sense | | TTTTTTTTTTTTTTTTTTGCATT TGAACAGAACGCG |

G3PDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH)

壓出)，蓋上晶片容器蓋子，於50℃恆溫箱中雜交1 h。呈色反應：於室溫下以500 μ l wash buffer進行清洗5次，加入400 μ l detection buffer進行平衡，再加入300 μ l 1:50稀釋的NBT/BCIP（Roch, NBT/BCIP stock solution），室溫下避光作用15 min，以DDW清洗，終止呈色反應，依核酸探針點陣排列圖譜進行結果判讀（如圖1及表3）。

表 3. 臺灣各地區以乳房炎生物晶片檢出乳牛乳房炎病原菌之分佈

Table 3. The distribution of the mastitis pathogens of dairy cattle detected by mastitis biochip in Taiwan

| Location & No. of farms examined | <i>S. agalactiae</i> | <i>S. dysgalactiae</i> | <i>S. uberis</i> | <i>S. bovis</i> | <i>S. aureus</i> | <i>E. coli</i> | Negative |
|----------------------------------|----------------------|------------------------|------------------|-----------------|------------------|----------------|----------|
| Northern | 6* | 2 | 8 | 12 | 4 | 9 | 1 |
| 20 | (30) | (10) | (40) | (60) | (20) | (45) | (5) |
| Central | 24 | 24 | 45 | 59 | 8 | 36 | 4 |
| 75 | (32) | (32) | (60) | (78.7) | (10.7) | (48) | (5.3) |
| Southern | 27 | 36 | 70 | 90 | 7 | 49 | 6 |
| 109 | (24.8) | (33) | (64.2) | (82.6) | (6.4) | (45) | (5.5) |
| Eastern | 0 | 0 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| 3 | (0) | (0) | (66.7) | (66.7) | (0) | (0) | (0) |
| Total | 57 | 62 | 125 | 163 | 19 | 94 | 6 |
| 207 | (27.5) | (30) | (60.4) | (78.7) | (9.2) | (45.4) | (2.9) |

* : The number of positive detected farms , () : percentage.

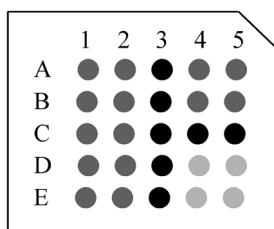


圖 1. 乳房炎生物晶片之點陣排列示意圖。A3, B3, C3, D3, E3代表雜合反應陽性對照點，A1, A2代表*Streptococcus* spp.，B1, B2代表*Streptococcus agalactiae*，C1, C2代表*Streptococcus bovis*，D1, D2代表*Streptococcus dysgalactiae*，E1, E2代表*Streptococcus uberis*，A4, A5代表*E. coli*，B4, B5代表*Staphylococcus aureus*，C4, C5代表體細胞陽性對照，D4, D5代表陰性對照，E4, E5代表空白。

Fig.1. The graph represents the mastitis biochip elements. A1, A2 correspond to *Streptococcus* spp., B1, B2 correspond to *Streptococcus agalactiae*, C1, C2 correspond to *Streptococcus bovis*, D1, D2 correspond to *Streptococcus dysgalactiae*, E1, E2 correspond to *Streptococcus uberis*, A4, A5 correspond to *E. coli*, B4, B5 correspond to *Staphylococcus aureus*, C4, C5 correspond to Somatic cell, positive control, D4, D5 corresponds to negative control, E4, E5 correspond to Blank.

結果與討論

本研究應用乳房炎生物晶片套組，結果可檢出常見之六種乳房炎病原菌（如圖2），包括金黃色葡萄球菌與無乳鏈球菌兩種傳染性病原菌，以及大腸桿菌、異乳鏈球菌、乳房鏈球菌、牛鏈球菌等四種環境性病原菌。藉由DHI的乳品質監測系統，從全國207戶酪農之泌乳牛群中，取得每戶泌乳牛群之混合總乳，經去乳脂、萃取微生物DNA（需30~45 min）、PCR反應需2 h、DNA雜合反應與呈色反應（需2 h）等步驟，總計需花費5-6 h的操作時間，根據晶片上的點陣排列直接由肉眼判讀，結果如表3，檢出金黃色葡萄球菌與無乳鏈球菌陽性反應的酪農戶分別為19戶（9.2%）與57戶（27.5%）；而大腸桿菌、異乳鏈球菌、乳房鏈球菌與牛鏈球菌陽性反應的酪農戶依序為94戶（45.4%）、62戶（30.0%）、125戶（60.4%）、163戶（78.7%），顯示這六種病原菌陽性檢出率最高的是牛鏈球菌78.7%，其次依序為乳房鏈球菌60.4%、大腸桿菌45.4%、異乳鏈球菌30.0%、無乳鏈球菌27.5%與金黃色葡萄球菌9.2%。結果亦顯示環境性病原菌的陽性檢出率比傳染性病原菌之金黃色葡萄球菌高出很多，因為環境性病原菌廣布於牛舍環境與牛隻體表，當飼養管理上的些微缺失（擠乳作業不良、環境不潔、飼糧改變等）會減弱乳房之抵抗力，此時環境性病原菌就伺機感染乳房，造成較無徵兆的非臨床性乳房炎，酪農常無法發覺而隱藏於泌乳牛群中，等轉變成臨床性乳房炎時，才被發覺與治療。而傳染性病原菌之金黃色葡萄球菌則易讓牛隻感染後轉變成臨床性乳房炎，同時傳染性高，酪農較易察覺並施行防治措施，故檢出率最低。其中較特別的是傳染性病原菌之無乳鏈球菌，常常造成乳牛之非臨床性乳房炎，且寄存在已被感染的乳房內，因此很容易藉由所分泌之生乳污染牛床、擠乳機及擠乳者之手，再傳播給健康之牛隻，故陽性檢出率高達27.5%。

比較台灣北、中、南、東部之乳房炎病原菌陽性戶數之檢出率，結果如表 3。在無乳鏈球菌方面依序為30.0%、32.0%、24.8%、0.0%，在金黃色葡萄球菌方面依序為20.0%、10.7%、6.4%、0.0%，顯示傳染性病原菌陽性檢出率東部最低，南部次之，北部與中部則偏高。北、中、南、東部之四種環境性病原菌陽性檢出率平均依序為38.8%、54.7%、56.2%、33.4%，以東部最低，而南部最高。

| Name | Ag | Bo | Dy | Ub | Ec | Sta | G3p |
|------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Hybridization patterns | ●●●●● | ●●●●● | ●●●●● | ●●●●● | ●●●●● | ●●●●● | ●●●●● |
| | ●●●●● | ●●●●● | ●●●●● | ●●●●● | ●●●●● | ●●●●● | ●●●●● |
| | ●●●●● | ●●●●● | ●●●●● | ●●●●● | ●●●●● | ●●●●● | ●●●●● |
| | ●●●●● | ●●●●● | ●●●●● | ●●●●● | ●●●●● | ●●●●● | ●●●●● |
| | ●●●●● | ●●●●● | ●●●●● | ●●●●● | ●●●●● | ●●●●● | ●●●●● |

圖 2. 乳房炎生物晶片檢測結果之各種點陣排列判讀示意圖。Ag＝無乳鏈球菌，Bo＝牛鏈球菌，Dy＝異乳鏈球菌，Ub＝乳房鏈球菌，Ec＝大腸桿菌，Sta＝金黃色葡萄球菌，G3p＝陰性反應。

Fig. 2. The graph represents the mastitis biochip hybridization patterns of PCR amplicons.
Ag = *Streptococcus agalactiae*, Bo = *Streptococcus bovis*, Dy = *Streptococcus dysgalactia*,
Ub = *Streptococcus uberis*, Ec = *E.coli*, Sta = *Staphylococcus aureus*, G3p = Negative.

林及邱（1971）對台灣各地區之牧場進行乳房炎的調查，結果發現無乳鏈球菌佔了70.5%，其他病原菌（*E.coli*, *Corynebacterium pyogenes*）佔1.6%。1987年吳義興等（未發表）調查檢測CMT（California mastitis test, CMT）陽性乳中之細菌，結果主要仍以無乳鏈球菌之49.4%為最多，其次為葡萄球菌（*Staphylococcus* spp.）。趙等（1994）以同樣方法檢測中部地區17場乳牛場之潛在性乳房炎病原菌，無乳鏈球菌佔了11%，金黃色葡萄球菌佔14%，乳房鏈球菌佔27%，異乳鏈球菌佔23%。於2003年莊士德（未發表）調查台灣26戶乳牛場計2,586個乳樣，以傳統的細菌培養鑑定法檢測，結果檢出之病原菌以葡萄球菌屬所佔的比例最高（n=526, 20.3%）、其次為鏈球菌屬（n=256, 9.9%）、大腸桿菌屬（n=126, 4.9%），在葡萄球菌屬中之金黃色葡萄球菌佔3.4%（n=88），本試驗所得到之金黃色葡萄球菌佔9.2%比趙等（1994）所得之14%降低4.6%，但比莊（2003）之3.4%高出5.8%；在無乳鏈球菌感染率方面，從1971年之70.5%、1987年之49.4%到1994年之11%，顯示台灣地區無乳鏈球菌感染率有下降，但本試驗檢出率為27.5%比趙等（1994）所得之11%高出16.5%，推測可能因為乳房炎生物晶片所辨識的細菌特異性核酸，不論是死菌或是活菌之特異性核酸皆會被辨識並判定為陽性反應，而傳統細菌培養法則只檢出具活性的細菌為陽性反應而死菌則判定為陰性，故乳房炎生物晶片比傳統細菌培養法有較高之敏感性與陽性反應檢出率。

乳房炎生物晶片，結合PCR與雜合探針點列於晶片上之技術，可在六小時內快速檢出生乳中之金黃色葡萄球菌與無乳鏈球菌兩種傳染性病原菌，以及大腸桿菌、異乳鏈球菌、乳房鏈球菌、牛鏈球菌等四種環境性病原菌，將有助於對引起乳房炎之細菌做即時之鑑別，作為正確投藥的參考，以及提供正確的乳房炎防治方向。

誌謝

本試驗承蒙中華民國乳業協會、晶宇生物科技實業股份有限公司、本分所牛乳品質檢驗室及全體員工之支持與協助，讓試驗能如期完成，特此誌謝。

參考文獻

- 林光榮、邱朝齊。1971。由牛乳房炎分離到無乳鏈球菌與金黃色葡萄球菌係感染乳房炎主要病原菌之報告。行政院農業委員會家畜衛生試驗所創立61週年所慶紀念論文專輯，台北縣，pp. 13。
- 吳永惠。2000。牛病學。藝軒圖書出版社，台北市，pp. 205-213。
- 陳煥南、李素珍、毛嘉洪、徐慶霖。1992。乳房炎全面還擊。台灣區雜糧發展基金會，台北市，pp. 13-30。
- 趙瑞龍、楊忠亮、董好德、張登欽。1994。臺灣省中部地區乳牛潛在性乳房炎的調查。中華民國獸醫學會雜誌23（1）：61-65。
- DeGraves, F. J. and J. Fetrow. 1993. Economics of mastitis and mastitis control. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 9：421-434.
- Forsman, P., A. Tilsala and T. Alatosva. 1997. Identification of streptococcal and staphylococcal causes of bovine mastitis using 16s-23s rRNA spacer regions. Microbiology 143：3491-3500.
- Hsu, S. C. and H. Y. Tsen. 2001. PCR primers designed from malic acid dehydrogenase gene and their use for detection of *Escherichia coli* in water and milk samples. Int. J. Food Microbiol. 64：1-11.
- Jain, N. C. 1979. Common mammary pathogens and factors in infection and mastitis. J. Dairy Sci. 62：128-134.

- Meiri-Bendek, I., E. Lipkin, A. Friedman, G. Leitnen, A. Saron, S. Friedman and Y. Kashi. 2002. A PCR-based method for the detection of *Streptococcus agalactiae* in milk. *J. Dairy Sci.* 85 : 1717-1723.
- Phuektes, P., P. D. Mansell and G. F. Browning. 2001. Multiplex polymerase chain reaction assay for simultaneous detection of *Staphylococcus aureus* and Streptococcal causes of bovine mastitis. *J. Dairy Sci.* 84 : 1140-1148.
- Phuektes, P., G. R. Browning, G. Anderson and P. D. Mansell. 2003. Multiplex polymerase chain reaction as a mastitis screening test for *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* and *Streptococcus uberis*. *J. Dairy Res.* 70 : 149-155.
- Riffon, R., K. Sayasith, H. Khalil, P. Dubreuil, M. Drolet and J. Lagace. 2001. Development of a rapid and sensitive test for identification of major pathogens in bovine mastitis by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 39 : 2584-2589.
- Watts, J. L. 1988. Etiological agents of bovine mastitis. *Vet. Microbiol.* 16 : 41-66.

Application of Biochip on Classification of Mastitis Pathogen in Cow⁽¹⁾

Kuo-Hua Lee⁽²⁾, Yih -Min Shy⁽²⁾, Shih-Te Chuang⁽³⁾, Sue-Jan Lee⁽²⁾,
Chu-Li Chang⁽²⁾, Ming-Che Wu⁽⁴⁾, Chao-Hua Chi⁽⁵⁾⁽⁶⁾

Received : Oct. 17, 2006 ; Accepted : Mar. 3, 2007

Abstract

In order to efficiently prevent and treat bovine mastitis and minimize its impact to the dairy industry, a sensitive, rapid, and specific test is required for identifying the mastitis-causing pathogens. In the present study, we used biochip to examined the distribution of mastitis-causing pathogens in Taiwan. The biochip is capable of detecting 6 common species of mastitis-causing pathogens within 6 hours, including *Streptococcus bovis*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. The technique is based on DNA amplification of genes specific to the target pathogens and consists of 4 basic steps: DNA extraction of bacteria, PCR reaction, DNA hybridization, colorimetric reaction. The Biochip was used for detecting bacteria in bulk tank milk samples from 207 DHI-participating dairy farms in 2004. The results show that *Streptococcus bovis*, detected in samples from 163 (78.7%) farms, was the most prevalent species, followed by *Streptococcus uberis* (60.4%) , *Escherichia coli* (45.4%) , *Streptococcus dysgalactiae* (30.0%) , *Streptococcus agalactiae* (27.5%) , and *Staphylococcus aureus* (9.2%) . Results from this study showed that the biochip is a feasible tool for a rapid diagnose of mastitis-causing pathogens in milk, which might provide information for a more effective treatment to cure mastitis.

Key words: Mastitis, Pathogen, Biochip.

(1) Contribution No.1354 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.

(2) Hsin-Chu Branch, COA-LRI, Hsin-Chu, Taiwan, R.O.C.

(3) Department of Veterinary, National Chunghsing University, Taichung, Taiwan 402, R.O.C.

(4) Breeding and Genetic Division, COA-LRI, Hsinhua, Taiwan71246, R.O.C.

(5) Department of Veterinary, National Taiwan University, Taipei, Taiwan10617, R.O.C.

(6) Corresponding Author, E-mail: chie@ntu.edu.tw

