

應用生物晶片快速診斷乳房炎病原菌

李國華

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，經 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。

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，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 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，因此非臨床性乳房炎常不易被
2 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，對較無徵兆的
3 非臨床性乳房炎常無法發覺。文獻指出最常見的乳房炎病原菌為金黃色葡萄球菌
4 (*Staphylococcus aureus*)、無乳鏈球菌 (*Streptococcus agalactiae*)、異乳鏈球菌 (*Streptococcus*
5 *dysgalactiae*)、乳房鏈球菌 (*Streptococcus uberis*) 與大腸桿菌屬 (coliforms)，這些病原菌的來
6 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，
7 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
8 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散播的
9 病原菌，例如：金黃色葡萄球菌，主要是生存在乳腺深部組織、乳頭管及乳汁中，可經由擠
10 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
11 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。另一常見之傳
12 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
13 的導管系統，感染造成的刺激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
14 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
15 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
16 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
17 區所分泌之生乳污染，而成為傳播病原菌的媒介。

18 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
19 試後鑑定細菌種類，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
20 的方法，利用細菌核酸之特異性可快速診斷菌種，如聚合酶鏈所反應 (polymerase chain
21 reaction, PCR) 檢測法，可快速且敏感地檢出主要常見牛乳房炎病原菌，如金黃色葡萄球菌、

1 無乳鏈球菌、異乳鏈球菌、乳房鏈球菌、牛鏈球菌和大腸桿菌。本試驗的目的是應用具快速
2 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
3 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、
4 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
5 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。

7 試驗成果

8 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，包括金黃色葡
9 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
10 菌等四種環境性病原菌。藉由 DHI 的乳品質監測機制從全國 207 戶酪農之泌乳牛群中，取得
11 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 需 2 h 反應、
12 DNA 雜合反應與呈色反應（需 2 h）等步驟，計需花費 5-6 h 的操作時間，根據晶片上的點
13 陣排列直接由肉眼判讀，結果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
14 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
15 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
16 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
17 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
18 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
19 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）
20 會減弱乳房之抵抗力，此時環境性病原菌就伺機性感染乳房，造成較無徵兆的非臨床性乳房
21 炎，酪農常無法發覺而隱藏於泌乳牛群中，等到嚴重感染時轉變成臨床性乳房炎，才被發覺

1 與治療。

2 比較台灣北、中、南、東部之乳房炎病原菌陽性戶數之檢出率，結果在無乳鏈球菌方面
3 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%、
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、
5 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
6 部最低，而南部最高。

7 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
8 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
9 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
10 正確投藥的參考，以及提供正確的乳房炎防治方向。

11
12
13
14
15
16
17

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

18 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
19 菌，**Dy** =異乳鏈球菌，**Ub** =乳房鏈球菌，**Sta** =金黃色葡萄球菌，G3p = 陰性反應。
20 Fig. 2. The graph represents the mastitis biochip hybridization patterns of PCR amplicons.
21 **Ag** = *Streptococcus agalactiae*, **Bo** = *Streptococcus bovis*, **Dy** = *Streptococcus dysgalactia*,
22

1 **Ub** = *Streptococcus uberis*, **Sta** = *Staphylococcus aureus*, G3p = Negative .

2

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

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

5 Taiwan

Location & No. of farm 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)

6 * : The number of positive, () : percentage.

7

8

誌謝

9

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

10 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。

11

參考文獻

12

林光榮、邱朝齊。1971。由牛乳房炎分離到無乳鏈球菌與黃金色葡萄球菌係感染乳房

13

14 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

15

16 論文專輯，台北縣，pp. 13。

17

18

吳永惠。2000。牛病學。藝軒圖書出版社，台北市，pp. 205-213。

19

- 1 吳義興、陳素貞、蕭終融、張惟茗。1987。牛乳房炎乳汁中病原細菌分離鑑定及其在
2
3 周圍環境之分布。台灣省家畜衛生試所研究報告 23 : 7-11。
4
5 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，
6
7 台北市，pp. 13-30。
8
9 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
10
11 查。中華民國獸醫學會雜誌 23(1) : 61-65。
12
13 DeGraves, F. J., and J. Fetrow. 1993. Economics of mastitis and mastitis control. Vet. Clin.
14
15 North Am. Food Anim. Pract. 9: 421-434.
16
17 Forsman, P., A. Tilsala and T. Alatossva. 1997. Identification of streptococcal and
18
19 staphylococcal causes of bovine mastitis using 16s-23s rRNA spacer regions.
20
21 Microbiology 143: 3491-3500.
22
23 Hsu, S.C, and H. Y. Tsen. 2001. PCR primers designed from malic acid dehydrogenase
24
25 gene and their use for detection of Escherichia coli in water and milk samples. Int. J.
26
27 Food Microbiol. 64: 1-11
28
29 Jain, N. C. 1979. Common mammary pathogens and factors in infection and mastitis. J.
30
31 Dairy Sci. 62:128-134.
32
33 Meiri-Bendek, I., E. Lipkin, A. Friedman, G. Leitnen, A. Saron, S. Friedman, and Y. Kashi.
34
35 2002. A PCR-based method for the detection of *Streptococcus agalactiae* in milk. J.
36
37 Dairy Sci. 85:1717-1723.
38

1 Phuektes, P., P. D. Mansell, and G. F. Browning. 2001. Multiplex polymerase chain reaction
2
3 assay for simultaneous detection of *Staphylococcus aureus* and Streptococcal causes
4
5 of bovine mastitis. *J. Dairy Sci.* 84:1140–1148.

6
7 Phuektes, P., G. R. Browning, G. Anderson, and P. D. Mansell. 2003. Multiplex polymerase
8
9 chain reaction as a mastitis screening test for *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus*
10
11 *agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* and *Streptococcus uberis*. *J. Dairy Res.*
12
13 70:149–155.

14
15 Riffon, R., K. Sayasith, H. Khalil, P. Dubreuil, M. Drolet, and J. Lagace. 2001.
16
17 Development of a rapid and sensitive test for identification of major pathogens in
18
19 bovine mastitis by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 39: 2584-2589.

20
21
22 Watts, J. L. 1988. Etiological agents of bovine mastitis. *Vet. Microbiol.* 16:41–66.
23
24
25

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⁾

In order to efficiently prevent and treat bovine mastitis and minimize its impact on dairy industry in Taiwan, 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 reveal that the biochip is a feasible tool for a rapid diagnose of mastitis-causing pathogens in milk.

Key Words: mastitis, pathogen, biochip.

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

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

(3) Department of Veterinary, National Chunghsing University, Taichung, Taiwan402, R.O.C.

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

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

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