



國立宜蘭大學

# 農業推廣 季刊 NO.97

國立宜蘭大學農業推廣委員會  
通訊總號第 097 號  
發行人/陳威戎  
地址：260 宜蘭市神農路 1 段 1 號  
E-Mail：aec@niu.edu.tw

農業推廣(季刊)  
中華民國 111 年 12 月 出刊  
主編/賴裕順、蕭士翔  
電話：03-9317613

中華民國 86 年 3 月 創刊  
行政院農業委員會補助編印  
編輯：劉雅倫  
傳真：03-9354152

## 淺談蛋白質體微陣列晶片在動物生產系統之應用:以乳牛乳房炎為例

國立宜蘭大學生物技術與動物科學系 蕭士翔

### 前言

乳牛(dairy cow)是人為培育，專門用於生產牛乳的母牛。乳畜業者(酪農)飼養乳牛、利用牧草，因而生產牛乳(生乳)，繼而加工與出售；因此，生乳為酪農飼養乳牛最主要、也是最重要的動物產品。有鑑於生乳的質量很大的因素源自於乳牛乳房的健康以及乳牛場衛生工作的提升，為此，乳牛場所冀求的不只是生乳生產，高品質的生乳與乳品不僅攸關酪農生計，也維持了農場的身分認同。

乳房炎，顧名思義為乳牛乳腺發生炎症，其專有名詞為 mastitis，係由希臘字 mastos(乳房)以及 itis(發炎)組成而來。造成乳房炎的因素很多，主因為存在於乳牛場環境、乳房皮膚，或者病號乳牛體內(生乳或糞便)之乳房炎病原，藉由擠乳流程或糞便之接觸，伺機侵襲健康乳牛的乳腺造成乳房內感染(Intramammary infection)。有鑑於此，乳牛罹患乳房炎不僅其乳腺受損，生乳質量受到衝擊，農場亦需負擔額外的人力、醫療與照護成本，甚者且迫使病號牛自牛群中淘汰，有時更涉及農場動物福祉等問題 [1-3]。

也因如此，乳牛場中若有頻繁發生或者令人棘手的乳房炎症，必然對酪農的生計與心理產生沉重的負擔；即使感染之病原能夠暫時排除，乳牛場中如果沒有遵守日常的飼養衛生，以及維持各項乳房炎防治工作的標準方法(主要為擠乳)，牛群就有可能重複或擴大發生這類的問題。



根據統計，美國每年因乳房炎所造成的乳牛場損失為 147 美元/每頭乳牛 [4]，其中因乳腺組織損傷導致乳牛乳量減少，或因而面臨淘汰者佔總損失約 70% [5]，有以致之。

### 乳房炎的分類—探討乳房炎的病因與乳牛病徵

乳房炎的發生及其嚴重程度與「宿主特徵」、「環境」以及「病原間的相互作用」有關 [6]，彼等為常駐乳腺中的微生物群(udder microbiome)因環境病原之侵擾而失去平衡(dysbiosis)，加上居中宿主的伺機性病原菌(opportunistic pathogens)藉此增強其對乳腺的感染嗜性(host-tropism) [7-9]，使的乳房炎的病徵複雜而多元。也因如此，乳房炎一般乃依病牛表現的臨床徵狀區分為臨床性乳房炎(clinical mastitis)與非臨床性乳房炎(subclinical mastitis) [10,11]。乳牛罹患臨床性乳房炎，其乳房可見腫脹、發紅、溫熱以及疼痛表徵，擠出的生乳出現結塊、絮狀或水樣化，牛隻表現食慾不佳、精神抑鬱，有時且伴隨著發燒與全身症狀，嚴重的臨床性乳房炎甚至廣泛破壞乳腺組織，或使牛隻敗血症而死亡 [12]。

相較於臨床性乳房炎，非臨床性乳房炎的乳牛乳汁雖然並異常(僅於擠乳時的前段乳可見持續性凝固物出現)，不過乳牛產乳量減少，生乳體細胞計數(乳腺因受細菌感染而使生乳中的嗜中性球、巨噬細胞、淋巴細胞以及乳房內損傷或脫落的上皮細胞增加)增加，生乳有時可分離出感染病原 [13]。另外，非臨床性乳房炎發作並不規律，而且多為慢性感染，長期非臨床性乳房炎亦可能轉變為臨床性乳房炎，而徒增防治之難度 [14]，也因此亞臨床性乳房炎所造成的農場損失很難進行估計。

### 乳房炎病原—讓乳房炎之防治有所依據

由於乳房炎的主因為乳牛乳腺遭受物理創傷以及/或病原(細菌、病毒和古生菌)之侵襲而發生炎症 [15]；因此要防治乳房炎的問題，多以探析感染的微生物種類著眼。除此之外，乳房炎病原與乳牛乳如何發生乳房炎的原因有著很密切的相關係(參下列)。迄今有許多細菌種類已被確定為具有乳腺嗜性之病原體，這些病原且依其來源可區分為兩大類型：傳染性乳房

炎病原(contagious mastitis pathogen 與環境性乳房炎病原(environmental mastitis pathogen) [13]。傳染性乳房炎病原係指可以在乳牛之間傳播，主要透過牛群在擠乳期間因擠乳流程之疏失發生感染 [16]；這類病原主要定殖於乳牛的乳房和乳頭皮膚，並可生長至乳頭管中 [17]，以金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、無乳鏈球菌(*Streptococcus agalactiae*)、異乳鏈球菌(*Streptococcus dysgalactiae*)、黴漿菌屬(*Mycoplasma spp*)和牛棒狀桿菌(*Corynebacterium bovis*)為代表。因此，正確擠乳衛生以及正常的擠乳性能以及設備維護等，對於預防傳染性乳房炎至關重要 [13]。

相較於傳染性乳房炎病原，環境性乳房炎病原通常不會定殖於乳房與皮膚。反之，這類病原主要存在於與乳牛接觸的環境中，如牛床、飼料槽、水池、泥巴、糞便、擠乳器械等都是環境性病原的溫床 [18,19]。常見感染途徑為乳牛於擠乳過程中，由於乳杯脫落，或者乳牛免疫力下降時，遭遇這類病原伺機入侵於乳腺定殖 [20,21]。目前研究發現已有多種細菌能引起環境性乳房炎，主要包括鏈球菌屬(*Streptococcus spp.*)、大腸菌群(coliforms)、假單胞菌屬(*Pseudomonas spp.*)等 [22]。為此，環境性乳房炎的控制可藉由減少乳頭暴露於環境病原，抗生素干預以及疫苗接種策略，進而提高乳牛對乳房內的抵抗力來實現 [23]。除此之外，由於乳腺和乳汁的微生物組已被認為具有高度的同源性，因此，乳汁中除了自環境侵擾乳腺的病原以及機會性病原，許多微生物群可通過腸-乳腺軸遷移至乳腺中 [24,25]。值得注意的是，近幾十年來，由傳染性病原引起的乳房炎發病率已有大幅減少的趨勢，然彼等間接導致了由環境性病原(如大腸桿菌)引起的乳房炎隨之增加 [26]。近年研究亦發現，彼等能引發乳腺發炎的大腸桿菌，其與引發腸外感染大腸桿菌(Extraintestinal pathogenic *E. coli*)之致病機制相當類似，其中以泌尿致病性大腸桿菌(uropathogenic *E. coli*)最為重要 [27]。也因如此，有越來越多的證據指出，引發尿路感染的泌尿致病性大腸桿菌也是引起乳牛乳房炎的重要病原 [28-30]。

### 毒力因子—乳房炎病原的防治與診斷標靶

毒力因子(virulence factor)是由細菌、病毒、真菌和原生動物代謝產生的物質，使微生物

除具有毒力，同時輔助躲避宿主的免疫機制以提升感染能力 [31]。因此，特定病原之毒力因子一直以來被視為強化乳房炎病原防治與診斷工作之重要標靶。以大腸桿菌為例，大腸桿菌具有多種毒力因子，包括血球凝集素、腸溶血素、親密素、凝集素黏附蛋白等相關基因 [32]，這些毒力基因的表現和大腸桿菌之致病性息息相關 [33]，且均已被證實在大腸桿菌病原感染乳腺過程中起了關鍵作用 [34,35]。

### 乳腺對感染的免疫反應—觀察乳中免疫球蛋白之活性及含量變化，有助於了解乳腺的免疫調節

為避免宿主感染，在乳腺中亦有先天性免疫系統與後天性免疫系統以抵禦病原之感染 [36]。乳腺對抗原的第一道防線係乳頭管括約肌所形成的天然屏障 [37]；乳頭管充當單向閘允許乳汁流動並防止病原體進入乳腺 [38]。然若果病原體突破屏障，先天免疫系統就會被一組複雜的警告信號激活。在乳腺防禦中發揮作用的最普遍的先天免疫細胞為嗜中性球與單核細胞/巨噬細胞(在急性乳房炎期間，每  $10^7$  個體細胞中有約 90% 為嗜中性球) [39]。

乳腺中的嗜中性球具有多種殺菌機制，主為呼吸爆(respiratory burst)過程產生的氧自由基以作為多種抗微生物之氧化劑前驅。另外，嗜中性球亦包含多種抗菌顆粒蛋白(antimicrobial granule proteins)，諸如抗菌蛋白、水解酶、蛋白酶、乳鐵蛋白和溶菌酶。彼等蛋白質被釋放到吞噬體(phagosome)中以破壞攝入的病原，或者釋放出細胞 [40]。

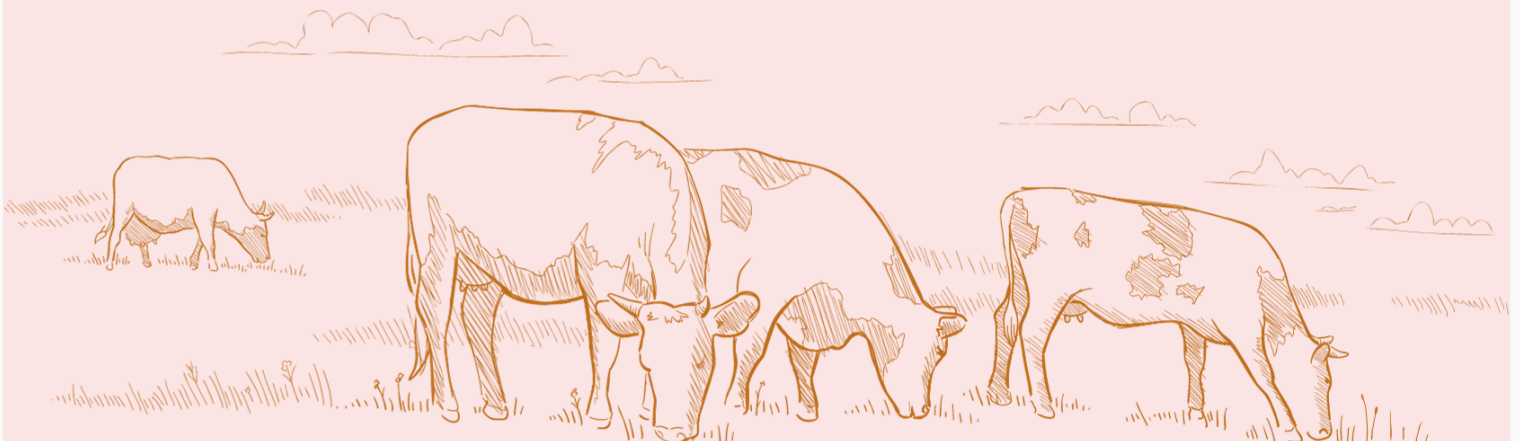
另一方面，單核細胞(monocyte)所衍生的巨噬細胞(macrophages)和樹突狀細胞(dendritic cells)具有特異性刺激適應性免疫的能力；這些細胞吞噬病原並處理來自病原體的抗原肽(antigenic peptides)，且由主要組織相容性複合物(major histocompatibility complex)呈遞給淋巴細胞，繼而引發適應性反應。其中由抗原激活的 B 細胞會分泌免疫球蛋白(Immunoglobulin, Ig)以識別病原體表面抗原，亦可增強嗜中性球和巨噬細胞的吞噬作用 [36,41]；其中 IgG1 主要存在於健康乳汁中，而 IgG2 可提高嗜中性球吞噬作用抵抗乳房炎病原菌，IgA 則是會誘導入侵細菌凝集，進而阻止細菌在乳腺中傳播 [42]；因此，觀察乳中免疫球蛋白之活性及含量之變化，有助於了解乳腺的免疫調節。

## 乳房炎的防治措施—揭示現場工作的重要課題

在乳牛場中乳房炎一直是臺灣乳牛遭淘汰的三大疾病因素(乳房炎、蹄病、繁殖障礙)之首，為提倡擠乳衛生，政府歷年來年且積極推動許多乳房炎之防治工作，諸如擠乳前使用紙巾擦拭乳頭、擠乳後乳頭藥浴、加州乳房炎測試檢驗各分房乳汁、乾乳期乳房炎的治療，以及擠乳機性能測定等，同時也擬定全面的乳房炎控制計畫[43]，如下列：

1. 正確的擠乳衛生。
2. 使用性能良好的擠乳機。
3. 擠乳後乳頭藥浴。
4. 牛隻乾乳時，確實執行乾乳期的治療。
5. 妥善治療所有臨床性乳房炎牛隻。
6. 淘汰慢性乳房炎的牛隻。

儘管如此，現場乳房炎的問題仍時常困擾酪農，主要的問題在於乳房炎的管理除了擠乳衛生與飼養現場之管理工作外，也涉及專業之學理知識(如微生物學，病理學與藥理學等)[43]。于今，抗生素仍是牧場乳房炎控制計劃的重要一環，然而，飼養現場受限於常規之檢驗流程，病號牛之檢體(生乳樣本)常無法迅即依照送驗之結果(抗生素敏感測試)，而施予正確的抗生素。也因如此，多數無效或非專一的治療手段，以及病原抗生素耐性(antimicrobial resistance)之誘發風險，為酪農在飼養現場屢屢面臨的困難與挑戰。實際上，乳牛罹患乳房炎時，自癒的機率甚少，病號牛仍需以抗生素之輔助積極治療；追根究底，為了有效防治乳房炎，發展快速且精準的乳房炎早期診斷方式乃極為重要。

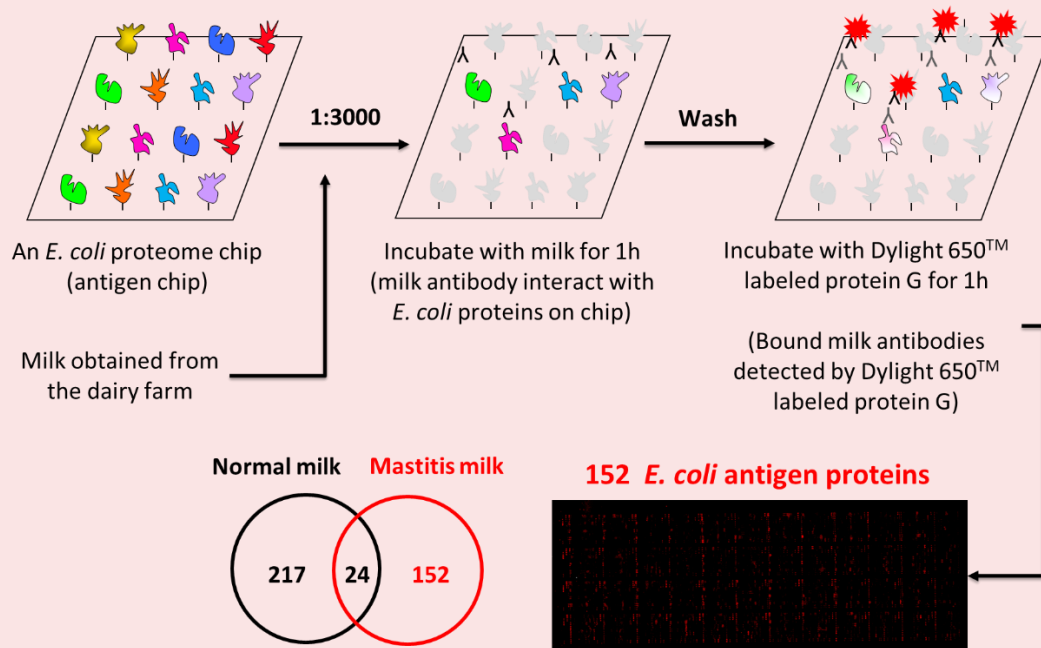


## 蛋白質體微陣列晶片在乳房炎防治之運用－解析生乳中的生物標誌物

蛋白質體微陣列(protein microarray)又稱蛋白質體晶片(proteome chip)，乃藉微陣列儀將巨量之純化蛋白質點漬於微形的固相載體上，近期已成為高通量(high throughput)蛋白質分子互動組(interactome)研究的有效工具 [44]；其原理是對固相載體進行特殊的化學處理，然後將已知的蛋白質分子產物（如酵素、抗原、抗體和細胞因子等）固定其上，並根據這些生物分子的特性，將可特異性結合的血清、血漿、細胞表面等待測之蛋白質進行捕獲，從而達到測量各種分子間相互作用(分子互動)的目的。

有鑑於此，研究人員即需以微陣列儀在晶片(載玻片)上對某些生物體之蛋白質組進行點漬，使其能夠進行各種生化、生物學和生物醫學分子互動研究。近年來，已有多種蛋白質體晶片被建構發表，諸如酵母菌蛋白質體晶片 [45]、大腸桿菌蛋白質體晶片 [44]、巴通氏菌蛋白質體晶片 [46]、阿拉伯芥蛋白質體晶片 [46] 和人類蛋白質體晶片 [47,48]等；其可應用的分子互動研究範疇包括：蛋白質-蛋白質、蛋白質-脂質、蛋白質-DNA、蛋白質-胜肽、蛋白質-細胞和蛋白質-藥物等相互作用。

毒力因子(virulence factor)係由細菌、病毒、真菌和原生動物代謝產生的物質，使微生物除具有毒力，同時輔助躲避宿主的免疫機制以提升感染能力 [31]。因此，特定病原之毒力因子一直以來被視為強化乳房炎病原防治與診斷工作之重要標靶。已知毒力因子的表現和大腸桿菌之致病性息息相關 [33]，且均已被證實在大腸桿菌病原感染乳腺過程中起了關鍵作用 [34,35]；由於這些毒力因子可介導大腸桿菌感染宿主，亦能辨識乳腺漿細胞所產生的免疫球蛋白以逃脫宿主的免疫辨識 [49-51]；因此，過去我們已與成功大學陳健生教授合作，並建構了大腸桿菌蛋白質體(含有約 4,200 個大腸桿菌蛋白質)晶片，這些大腸桿菌蛋白質體晶片除了被用於探究大腸桿菌蛋白質體與乳房炎生乳免疫球蛋白之分子交互作用 (圖一)，並已藉此找出乳房炎大腸桿菌之新穎毒力因子，以及存在於這些發炎生乳中的生物標誌物。

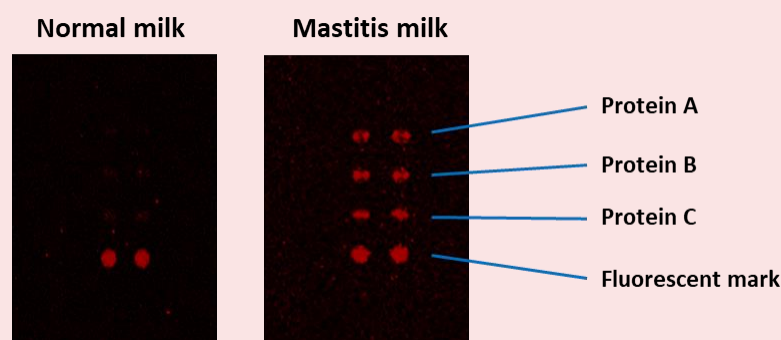


圖一、利用大腸桿菌蛋白質體晶片找出乳房炎生乳中大腸桿菌生物標誌物之示意圖。

### 試驗驗證結果

本研究初探大腸桿菌蛋白質體晶片篩檢乳房炎生乳中可能與宿主免疫球蛋白結合的大腸桿菌蛋白質。試驗結果驗證共有 152 種蛋白質(候選蛋白質)能與乳房炎生乳面疫球蛋白(其中 128 個蛋白質為特異性結合)(圖一)；這些候選蛋白質也具有顯著之重複可變序列 [AG]RS[IVF][ST][ATG] ( $P < 0.0001$ )。通過 GO 分析，我們發現這些候選蛋白質在「細胞壁大分子代謝過程」，「有機物質生物合成過程」和「主動跨膜轉運蛋白活性」中具有豐富的功能 ( $P < 0.05$ )；GO 的生物過程分析也揭示了一些關於細菌代謝的豐富功能 ( $P < 0.05$ )。而當以 KEGG 分析來描述蛋白質的生物學相關性時，我們亦發現這些候選蛋白質對於細菌 ABC 轉運蛋白具有富集性，而彼等對於細菌活力、細菌毒力及其致病性等至關重要。

為進一步驗證候選蛋白質可作為生乳中乳房炎大腸桿菌之生物標誌物，試驗以 cut-off 值大於 2SD 為條件共篩選出 3 標的蛋白質，我們且將 3 個顯著的大腸桿菌生乳標的蛋白質製成大腸桿菌乳房炎檢測晶片之原型，並能成功用於快速篩檢大腸桿菌乳房炎生乳(圖二)。



圖二、乳房炎大腸桿菌蛋白質體晶片揭示生乳中大腸桿菌之生物標誌物。

綜合上述，本研究結果通過蛋白質體晶片解析大腸桿菌蛋白質體與乳房炎生乳免疫球蛋白質之分組互動組，研究之結果除有助於牛隻大腸桿菌乳房炎致病機制之研究，並可進一步用於大腸桿菌乳房炎生物檢測晶片之開發。

### 參考文獻

1. Rollin, E.; Dhuyvetter, K.C.; Overton, M.W. The cost of clinical mastitis in the first 30 days of lactation: An economic modeling tool. *Prev Vet Med* **2015**, 122: 257-264.
2. Down, P.M.; Green, M.J.; Hudson, C.D. Rate of transmission: a major determinant of the cost of clinical mastitis. *J Dairy Sci* **2013**, 96: 6301-6314.
3. Hagnestam-Nielsen, C.; Ostergaard, S. Economic impact of clinical mastitis in a dairy herd assessed by stochastic simulation using different methods to model yield losses. *Animal* **2009**, 3: 315-328.
4. Misra, N.; Wines, T.F.; Knopp, C.L.; Hermann, R.; Bond, L.; Mitchell, B.; McGuire, M.A.; Tinker, J.K. Immunogenicity of a *Staphylococcus aureus*-cholera toxin A2/B vaccine for bovine mastitis. *Vaccine* **2018**, 36: 3513-3521.
5. Zhao, X.; Lacasse, P. Mammary tissue damage during bovine mastitis: causes and control. *J Anim Sci* **2008**, 86: 57-65.
6. Ma, C.; Sun, Z.; Zeng, B.; Huang, S.; Zhao, J.; Zhang, Y.; Su, X.; Xu, J.; Wei, H.; Zhang, H. Cow-to-mouse fecal transplantations suggest intestinal microbiome as one cause of mastitis. *Microbiome* **2018**, 6: 200.
7. Hoque, M.N.; Rahman, M.S.; Islam, T.; Sultana, M.; Crandall, K.A.; Hossain, M.A. Induction of mastitis by cow-to-mouse fecal and milk microbiota transplantation causes microbiome dysbiosis and genomic functional perturbation in mice. *Anim Microbiome* **2022**, 4: 43.



8. Hoque, M.N.; Istiaq, A.; Clement, R.A.; Sultana, M.; Crandall, K.A.; Siddiki, A.Z.; Hossain, M.A. Metagenomic deep sequencing reveals association of microbiome signature with functional biases in bovine mastitis. *Sci Rep* **2019**, *9*: 13536.
9. Hoque, M.N.; Istiaq, A.; Rahman, M.S.; Islam, M.R.; Anwar, A.; Siddiki, A.; Sultana, M.; Crandall, K.A.; Hossain, M.A. Microbiome dynamics and genomic determinants of bovine mastitis. *Genomics* **2020**, *112*: 5188-5203.
10. Gryaznova, M.V.; Syromyatnikov, M.Y.; Dvoretzkaya, Y.D.; Solodskikh, S.A.; Klimov, N.T.; Mikhalev, V.I.; Zimnikov, V.I.; Mikhaylov, E.V.; Popov, V.N. Microbiota of Cow's Milk with Udder Pathologies. *Microorganisms* **2021**, *9*.
11. Hoque, M.N.; Istiaq, A.; Clement, R.A.; Gibson, K.M.; Saha, O.; Islam, O.K.; Abir, R.A.; Sultana, M.; Siddiki, A.Z.; Crandall, K.A.; Hossain, M.A. Insights Into the Resistome of Bovine Clinical Mastitis Microbiome, a Key Factor in Disease Complication. *Front Microbiol* **2020**, *11*: 860.
12. Gruet, P.; Maincent, P.; Berthelot, X.; Kaltsatos, V. Bovine mastitis and intramammary drug delivery: review and perspectives. *Adv Drug Deliv Rev* **2001**, *50*: 245-259.
13. Abebe, R.; Hatiya, H.; Abera, M.; Megersa, B.; Asmare, K. Bovine mastitis: prevalence, risk factors and isolation of *Staphylococcus aureus* in dairy herds at Hawassa milk shed, South Ethiopia. *BMC Vet Res* **2016**, *12*: 270.
14. Romero, J.; Benavides, E.; Meza, C. Assessing Financial Impacts of Subclinical Mastitis on Colombian Dairy Farms. *Front Vet Sci* **2018**, *5*: 273.
15. Ruegg, P.L. A 100-Year Review: Mastitis detection, management, and prevention. *J Dairy Sci* **2017**, *100*: 10381-10397.
16. Schreiner, D.A.; Ruegg, P.L. Effects of tail docking on milk quality and cow cleanliness. *J Dairy Sci* **2002**, *85*: 2503-2511.
17. Azevedo, C.; Pacheco, D.; Soares, L.; Romao, R.; Moitoso, M.; Maldonado, J.; Guix, R.; Simoes, J. Prevalence of contagious and environmental mastitis-causing bacteria in bulk tank milk and its relationships with milking practices of dairy cattle herds in Sao Miguel Island (Azores). *Trop Anim Health Prod* **2016**, *48*: 451-459.
18. Iraguha, B.; Hamudikuwanda, H.; Mushonga, B. Bovine mastitis prevalence and associated risk factors in dairy cows in Nyagatare District, Rwanda. *J S Afr Vet Assoc* **2015**, *86*: 1228.
19. Perkins, N.R.; Kelton, D.F.; Hand, K.J.; MacNaughton, G.; Berke, O.; Leslie, K.E. An analysis of the relationship between bulk tank milk quality and wash water quality on dairy farms in Ontario, Canada. *J Dairy Sci* **2009**, *92*: 3714-3722.
20. Burvenich, C.; Van Merris, V.; Mehrzad, J.; Diez-Fraile, A.; Duchateau, L. Severity of *E. coli*

mastitis is mainly determined by cow factors. *Vet Res* **2003**, 34: 521-564.

21. Hogan, J.; Larry Smith, K. Coliform mastitis. *Vet Res* **2003**, 34: 507-519.
22. Bradley, A. Bovine mastitis: an evolving disease. *Vet J* **2002**, 164: 116-128.
23. Smith, K.L.; Hogan, J.S. Environmental mastitis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* **1993**, 9: 489-498.
24. Derakhshani, H.; Fehr, K.B.; Sepehri, S.; Francoz, D.; De Buck, J.; Barkema, H.W.; Plaizier, J.C.; Khafipour, E. Invited review: Microbiota of the bovine udder: Contributing factors and potential implications for udder health and mastitis susceptibility. *J Dairy Sci* **2018**, 101: 10605-10625.
25. Porcellato, D.; Meisal, R.; Bombelli, A.; Narvhus, J.A. A core microbiota dominates a rich microbial diversity in the bovine udder and may indicate presence of dysbiosis. *Sci Rep* **2020**, 10: 21608.
26. Long, E.; Capuco, A.V.; Wood, D.L.; Sonstegard, T.; Tomita, G.; Paape, M.J.; Zhao, X. *Escherichia coli* induces apoptosis and proliferation of mammary cells. *Cell Death Differ* **2001**, 8: 808-816.
27. Fernandes, J.B.; Zanardo, L.G.; Galvao, N.N.; Carvalho, I.A.; Nero, L.A.; Moreira, M.A. *Escherichia coli* from clinical mastitis: serotypes and virulence factors. *J Vet Diagn Invest* **2011**, 23: 1146-1152.
28. Belanger, L.; Garenaux, A.; Harel, J.; Boulianne, M.; Nadeau, E.; Dozois, C.M. *Escherichia coli* from animal reservoirs as a potential source of human extraintestinal pathogenic *E. coli*. *FEMS Immunol Med Microbiol* **2011**, 62: 1-10.
29. Kaipainen, T.; Pohjanvirta, T.; Shpigel, N.Y.; Shwimmer, A.; Pyorala, S.; Pelkonen, S. Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from bovine clinical mastitis. *Vet Microbiol* **2002**, 85: 37-46.
30. Mustak, H.K.; Gunaydin, E.; Kaya, I.B.; Salar, M.O.; Babacan, O.; Onat, K.; Ata, Z.; Diker, K.S. Phylo-typing of clinical *Escherichia coli* isolates originating from bovine mastitis and canine pyometra and urinary tract infection by means of quadruplex PCR. *Vet Q* **2015**, 35: 194-199.
31. Cross, A.S. What is a virulence factor? *Crit Care* **2008**, 12: 196.
32. Zhang, D.; Zhang, Z.; Huang, C.; Gao, X.; Wang, Z.; Liu, Y.; Tian, C.; Hong, W.; Niu, S.; Liu, M. The phylogenetic group, antimicrobial susceptibility, and virulence genes of *Escherichia coli* from clinical bovine mastitis. *J Dairy Sci* **2018**, 101: 572-580.
33. Wenz, J.R.; Barrington, G.M.; Garry, F.B.; Ellis, R.P.; Magnuson, R.J. *Escherichia coli* isolates' serotypes, genotypes, and virulence genes and clinical coliform mastitis severity. *J Dairy Sci*

2006, 89: 3408-3412.

34. Le Bouguenec, C.; Bertin, Y. AFA and F17 adhesins produced by pathogenic *Escherichia coli* strains in domestic animals. *Vet Res* **1999**, 30: 317-342.
35. Liu, Y.; Liu, G.; Liu, W.; Liu, Y.; Ali, T.; Chen, W.; Yin, J.; Han, B. Phylogenetic group, virulence factors and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* associated with bovine mastitis. *Res Microbiol* **2014**, 165: 273-277.
36. Sordillo, L.M.; Streicher, K.L. Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **2002**, 7: 135-146.
37. Rainard, P.; Riollet, C. Innate immunity of the bovine mammary gland. *Vet Res* **2006**, 37: 369-400.
38. Goff, J.P. The monitoring, prevention, and treatment of milk fever and subclinical hypocalcemia in dairy cows. *Vet J* **2008**, 176: 50-57.
39. Leitner, G.; Shoshani, E.; Krifucks, O.; Chaffer, M.; Saran, A. Milk leucocyte population patterns in bovine udder infection of different aetiology. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* **2000**, 47: 581-589.
40. Rainard, P.; Foucras, G.; Martins, R.P. Adaptive Cell-Mediated Immunity in the Mammary Gland of Dairy Ruminants. *Front Vet Sci* **2022**, 9: 854890.
41. McHeyzer-Williams, M.; Okitsu, S.; Wang, N.; McHeyzer-Williams, L. Molecular programming of B cell memory. *Nat Rev Immunol* **2011**, 12: 24-34.
42. Wellnitz, O.; Bruckmaier, R.M. The innate immune response of the bovine mammary gland to bacterial infection. *Vet J* **2012**, 192: 148-152.
43. 李國華. 以良好的擠乳程序來防治乳腺炎. *中華民國乳業協會* **2010**, 99 年標準化擠乳衛生 DVD 光碟拍攝作業參考資料.
44. Chen, C.S.; Korobkova, E.; Chen, H.; Zhu, J.; Jian, X.; Tao, S.C.; He, C.; Zhu, H. A proteome chip approach reveals new DNA damage recognition activities in *Escherichia coli*. *Nat Methods* **2008**, 5: 69-74.
45. Zhu, H.; Bilgin, M.; Bangham, R.; Hall, D.; Casamayor, A.; Bertone, P.; Lan, N.; Jansen, R.; Bidlingmaier, S.; Houfek, T.; Mitchell, T.; Miller, P.; Dean, R.A.; Gerstein, M.; Snyder, M. Global analysis of protein activities using proteome chips. *Science* **2001**, 293: 2101-2105.
46. Leonhardt, N.; Kwak, J.M.; Robert, N.; Waner, D.; Leonhardt, G.; Schroeder, J.I. Microarray expression analyses of *Arabidopsis* guard cells and isolation of a recessive abscisic acid hypersensitive protein phosphatase 2C mutant. *The Plant cell* **2004**, 16: 596-615.
47. Hu, C.J.; Song, G.; Huang, W.; Liu, G.Z.; Deng, C.W.; Zeng, H.P.; Wang, L.; Zhang, F.C.;

- Zhang, X.; Jeong, J.S.; Blackshaw, S.; Jiang, L.Z.; Zhu, H.; Wu, L.; Li, Y.Z. Identification of new autoantigens for primary biliary cirrhosis using human proteome microarrays. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **2012**, 11: 669-680.
48. Jeong, J.S.; Jiang, L.; Albino, E.; Marrero, J.; Rho, H.S.; Hu, J.; Hu, S.; Vera, C.; Bayron-Poueymiroy, D.; Rivera-Pacheco, Z.A.; Ramos, L.; Torres-Castro, C.; Qian, J.; Bonaventura, J.; Boeke, J.D.; Yap, W.Y.; Pino, I.; Eichinger, D.J.; Zhu, H.; Blackshaw, S. Rapid identification of monospecific monoclonal antibodies using a human proteome microarray. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **2012**, 11: O111 016253.
49. Song, X.M.; Perez-Casal, J.; Fontaine, M.C.; Potter, A.A. Bovine immunoglobulin A (IgA)-binding activities of the surface-expressed Mig protein of *Streptococcus dysgalactiae*. *Microbiology (Reading)* **2002**, 148: 2055-2064.
50. Bastida-Corcuera, F.D.; Nielsen, K.H.; Corbeil, L.B. Binding of bovine IgG2a and IgG2b allotypes to protein A, protein G, and *Haemophilus somnus* IgBPs. *Vet Immunol Immunopathol* **1999**, 71: 143-149.
51. Zhao, H.; Zhang, Y.; Wang, Z.; Liu, M.; Wang, P.; Wu, W.; Peng, C. MBOVPG45\_0375 Encodes an IgG-Binding Protein and MBOVPG45\_0376 Encodes an IgG-Cleaving Protein in *Mycoplasma bovis*. *Front Vet Sci* **2021**, 8: 644224.