

MAJALAH

**KUMPULAN ALIH BAHASA DI
BIDANG PETERNAKAN DAN
KESEHATAN HEWAN**

**DISUSUN OLEH :
CECEP SASTRAWILUDIN, S.Pt
PARAMEDIK VETERINER MAHIR**

EDISI 10

DESEMBER 2022

MAJALAH

KUMPULAN ALIH BAHASA DI BIDANG PETERNAKAN DAN KESEHATAN HEWAN

EDISI 10

TAHUN 2022

**CECEP SASTRAWILUDIN, S.Pt
PARAMEDIK VETERINER MAHIR**

DAFTAR ISI

No.	Judul	Halaman
1	Investigasi Karakterisasi Patologis dan Biokimia pada Pedet yang Terinfeksi Alami Penyakit Mulut dan Kuku (PMK)	1
2	Interaksi dalam produksi biofilm dan kerentanan obat Candida kefirdengen <i>Escherichia coli</i> dan <i>Streptococcus dysgalactiae</i> diisolasi dari mastitis sapi	9
3	Efek dari <i>Plectranthus scutellarioides</i> (L.) Ekstrak Daun sebagai Antibakteri Alami Terhadap <i>Staphylococcus aureus</i> dan <i>Escherichia coli</i> Terisolasi Dari Sapi Perah dengan Mastitis Subklinis	17
4	Analisis resistensi antimikroba dan korelasi genetik <i>Escherichia coli</i> pada mastitis sapi perah	25
5	Keefektifan Dugaan Nanopartikel Perak dalam Pengobatan Endometritis Pascapersalinan pada Sapi Perah	34
6	Endometritis yang Diinduksi Secara Eksperimen Merusak Kapasitas Pengembangan Oosit Bovine	38
7	Efek virus sindrom pernapasan dan reproduksi babi 2 pada angiogenesis dan proliferasi sel pada antarmuka ibu-janin	51
	Jurnal Asli	52

Investigasi Karakterisasi Patologis dan Biokimia pada Pedet yang Terinfeksi Alami Penyakit Mulut dan Kuku (PMK)

Gehan N. Alagmy^{1*}, Sahar S. Abdel-Hamid², Susan Salah³, Heba A. Ewis¹,
Hend, M. Megahed⁴, Dalia T. Mohamed²

¹Departemen Patologi, Institut Penelitian Kesehatan Hewan (AHRI) Cabang Zagazig, Pusat Penelitian Pertanian (ARC), Mesir.

²Departemen Patologi Klinik, Institut Penelitian Kesehatan Hewan (AHRI) Cabang Zagazig, Pusat Penelitian Pertanian (ARC), Mesir.

³Departemen Virologi, Lembaga Penelitian Kesehatan Hewan (AHRI) Cabang Shebin, Pusat Penelitian Pertanian (ARC), Mesir.

⁴Departemen Biokimia, Institut Penelitian Kesehatan Hewan (AHRI) Cabang Zagazig, Pusat Penelitian Pertanian (ARC), Mesir.

Abstrak

Semua hewan berkuku belah rentan terhadap penyakit mulut dan kuku (FMD) yang merupakan penyakit virus yang sangat menular. FMD bertanggung jawab atas kerugian ekonomi yang serius di Mesir. Meskipun pendekatan pengendalian primer adalah kampanye vaksinasi massal tahunan menggunakan vaksinasi inaktivasi polivalen, kegagalan vaksinasi terjadi dalam beberapa kasus. Penelitian dilakukan pada lima puluh anak sapi lokal sampai umur satu tahun dari kedua jenis kelamin, tiga puluh anak sapi yang diduga terinfeksi PMK, dan dua puluh anak sapi yang sehat secara klinis dianggap sebagai kontrol. Sebanyak lima puluh sampel dari organ (jaringan epitel jantung) dikumpulkan dari pedet yang diduga terinfeksi PMK yang diperoleh dari September 2021 hingga Maret 2022 di Kegubernuran Sharkia dan Menofeia/Mesir. Studi saat ini dirancang untuk isolasi FMDV menggunakan sel BHK-21. Identifikasi molekuler, melalui ekstraksi Viral RNA, dan RT-PCR digunakan untuk menguji sampel virus FMDV. Hewan yang sakit mengalami perubahan suhu tubuh, laju pernapasan, dan detak jantung dibandingkan dengan kontrol. Selain itu, suara murmur diamati selama auskultasi jantung. Sebuah studi hematologi mengungkapkan penurunan yang signifikan dalam jumlah sel darah merah, konsentrasi hemoglobin, dan PCV% dengan leukopenia dan limfopenia pada kelompok yang sakit. Troponin jantung serum, lipase, asam lemak non-esterifikasi, asam beta hidroksil butirat, glukosa, aktivitas AST, ALT, dan nitrogen urea darah sangat meningkat pada hewan yang sakit. Tetapi insulin serum dan amilase berkurang secara signifikan pada anak sapi yang sakit. Pemeriksaan histopatologi betis mengungkapkan miokarditis histiocytis getah bening yang luas dan lesi nekrotik di pankreas, hati, dan ginjal. Sebagai kesimpulan, tahap awal PMK pada betis ditandai dengan cedera sel miokard, peningkatan troponin darah jantung, dan pankreatitis nekrotik yang diwakili oleh atrofi kelenjar pankreas dan pulau Langerhans.

KATA KUNCI

penyakit mulut dan kuku, BHK; RT-PCR, Troponin, Miokarditis, Pankreatitis

PENGANTAR

PMK terlihat pada hewan peliharaan dan hewan liar dengan kuku terbelah sebagai salah satu penyakit hewan lintas batas yang paling umum menular, berdampak negatif pada produktivitas ternak dan mengakibatkan kerugian ekonomi. (OIE, 2021). FMDV milik keluarga Picornaviridae dari genus Aphthovirus. Virus ini berukuran kecil, tidak berselubung, memiliki rasa positif, beruntai tunggal, dan RNA tidak beruas-ruas, dan terbungkus dalam kapsid ikosahedral yang mengandung kira-kira 60 salinan dari empat protein virus struktural (VP1, VP2, VP3, dan VP4 (Domingo *et al.*, 2002). Ada tujuh serotype FMDV yang berbeda secara imunologis: SAT-1, SAT-2, SAT-3, A, O, C, dan Asia. (Jamal dan Belsham, 2013). Karena sifat endemik virus PMK serta masuknya strain virus eksotik dari Timur Tengah dan Afrika Sub-Sahara, epidemiologi PMK di Mesir menjadi rumit (Tekleghiorghis *et al.*, 2016). Metode diagnostik penting untuk diagnosis FMDV adalah reaksi berantai transkripsi polimerase terbalik (RT-PCR), yang ditandai dengan karakteristik sensitivitas dan spesifitas tinggi. (Alsaad *et al.*, 2020). Demam, kehilangan nafsu makan,

ketimpangan, dan lesi vesikular pada kaki, lidah, dan puting adalah beberapa indikasi klinis PMK. Angka kematian sekitar 5% pada ruminansia dewasa, tetapi angka tersebut dapat ditingkatkan hingga 50% oleh kerusakan otot jantung pada hewan muda (Barker *et al.*, 1993). Pada anak sapi, peradangan miokard dianggap sebagai varian fatal dari PMK yang tidak menghasilkan lesi melepuh khas yang terlihat pada sapi dewasa. (Barker *et al.*, 1993; Alexander *et al.*, 2003). Miokarditis akut hewan muda dibedakan oleh degenerasi hialin, nekrosis serat otot, dan infiltrasi intens terutama limfosit (Alexander *et al.*, 2003). Lesi nekrotik di jantung membuatnya tidak mampu memompa darah ke seluruh tubuh yang menyebabkan perkembangan 'bekuan jeli kismis' di jantung dan pembuluh darahnya yang lebih besar. Konsolidasi paru-paru juga ditemukan di seluruh nekropsi seperti yang dijelaskan sebelumnya (Alexander *et al.*, 2003). Karena auskultasi dada dan jantung, dan kejadian kematian mendadak di lapangan, dapat menjadi penyebab diagnosis klinis PMK, penggunaan beberapa biomarker untuk penilaian kerusakan miokard juga direkomendasikan. Diagnosis penyakit miokard pada sapi masih sulit dan bisa ekstrim, terutama berdasarkan pemeriksaan klinis.

inasi hewan yang sakit. (Aslan *et al.*, 2013). Diagnosis PMK dapat diuji dengan hemato-biokimia, estimasi biomarker jantung spesifik seperti troponin-I jantung, isolasi virus, dan identifikasi (Aktaset *et al.*, 2015).

Tujuan utama dari penelitian ini adalah untuk mengidentifikasi serotype FMD baru-baru ini, menilai respons biomarker hematologis dan biokimia dari anak sapi ras lokal yang terkena miokarditis yang disebabkan oleh PMK, dan mengevaluasi lebih lanjut karakteristik klinis dan histopatologis hewan yang menderita dan diotopsi.

BAHAN DAN METODE

Persetujuan etis

Studi ini dideklarasikan oleh Komite Lokal Komite (ARC-IACUC) Institute: Animal Health Research Institute Ethical Committee Approval Number: ARC/AH/22/10. Semua metode dilakukan sesuai dengan pedoman Lembaga Penelitian Kesehatan Hewan menurut standar OIE untuk penggunaan hewan dalam penelitian dan pendidikan.

Hewan

Lima puluh anak sapi asli Mesir hingga usia satu tahun dilibatkan dalam penelitian ini. Selama epidemi penyakit di Kegubernuran Sharkia dan Menofeia Mesir, pedet dipisahkan menjadi 20 pedet kontrol yang tampaknya sehat dan 30 pedet yang telah diidentifikasi secara klinis memiliki infeksi PMK dari berbagai peternakan. Menurut metodologi Smith (2015), pedet secara klinis diperiksa denyut nadi, suhu, laju pernapasan, dan gerakan rumen dengan auskultasi untuk mengidentifikasi bunyi jantung dan aritmia.

Contoh

Tiga puluh sampel diambil dari pedet yang menunjukkan gejala klinis PMK. Jaringan epitel dari vesikel lidah yang baru saja pecah atau belum pecah digunakan sebagai sampel, dan mereka ditempatkan dalam media transportasi yang terbuat dari phosphate-buffered saline (PBS) (OIE, 2012). Dari September 2021 hingga Maret 2022, sampel dari sapi yang didiagnosis secara klinis diambil di Provinsi Sharkia dan Menofeia Mesir.

Identifikasi Virus

Isolasi Virus

Sel ginjal bayi hamster-21 (BHK-21) disuntikkan dengan sampel supernatan yang telah disiapkan. Ketika efek sitopatik (CPE) bermanifestasi pada sekitar 80% lapisan tunggal, sel yang diinokulasi dikumpulkan (sekitar tiga hari setelah inokulasi). Itu dilakukan menurut Barry *et al.* (2009) dan Ferriset *et al.* (2009).

Referensi Virus PMK diperoleh dari Departemen Virologi, Institut Penelitian Kesehatan Hewan, Mesir, yang digunakan sebagai kontrol positif untuk PCR.

Polymerase chain reaction dilakukan di Balai Penelitian Kesehatan Hewan, unit Bioteknologi, dan laboratorium rujukan untuk pengendalian mutu veteriner (OIE, 2012).

Ekstraksi asam nukleat dari sampel dilakukan menggunakan spin kit virus QIAampminielute (Qiagen, Jerman, GmbH).

Primer Oligonukleotida dikembangkan dari gen untuk protein VP dengan urutan sebagai berikut:

Primer maju 5'- GCCTGGTCTTCAG GTCT -3' Primer mundur 5'- CCAGTCCCCTCTCAGATC -3'. Ampli-

ukuran ikon produk PCR adalah 326 bp. Itu diproduksi di laboratorium Metabion-Jerman menurut OIE (2012).

Analisis Produk PCR

Produk PCR dipisahkan pada gel agarosa 1,5% dengan elektroforesis. Ukuran fragmen dihitung menggunakan tangga DNA dari Generaler 100bp. Sistem dokumentasi gel (Alpha Innotech, Biometra) mengambil gambar gel, dan perangkat lunak komputer digunakan untuk menganalisis informasi.

Sampel darah

Dengan menusuk vena jugularis, sepuluh ml darah diambil dari betis, dan satu ml darah dipindahkan ke tabung vakum berlapis EDTA untuk analisis hematologi. Darah yang tersisa diambil tanpa menggunakan antikoagulan dan dibiarkan menggumpal untuk tujuan isolasi serum. Sentrifugasi pada 3000 rpm selama 10 menit digunakan untuk mendapatkan sampel serum, yang kemudian disimpan pada suhu 20°C sampai analisis.

Studi hematologi

Sampel darah dengan antikoagulan menjadi sasaran deteksi konstituen darah seluler menurut Feldman *et al.* (2000).

Studi biokimia

Menggunakan troponin jantung T (cTnT) generasi ketiga yang diproduksi oleh Roche Diagnostics, Indianapolis, GMBH, Jerman, jumlah cTnT diukur secara kuantitatif menggunakan teknologi elektro-chemiluminescence. Tes Combo Card-I-kit digunakan untuk mengevaluasi tingkat cTnI dalam sampel darah (AboTech, Turku, Finlandia). Tingkat insulin terdeteksi menurut Chevenne *et al.* (1998), enzim amilase menurut Winn-Deen *et al.* (2003), dan lipase menurut Tietz dan Fiereck (1966). Glukosa serum ditentukan menurut metode yang dijelaskan oleh Lott dan Turner (1975). Asam lemak non-esterifikasi (NEFA) menurut Smith dan Wilson (2006), dan asam Beta hidroksil butirat (BHBA) menurut Young (2000). Aktivitas enzim hati serum (alanine aminotransferase (ALT) dan aspartate aminotransferase (AST) diperkirakan menurut Murray (1984), BUN ditentukan menurut Patton dan Crouch (1977) dan kreatinin serum diperkirakan menurut Henry (1974).

Pemeriksaan histopatologi

Spesimen dari lesi yang mewakili PMK dari pedet yang baru mati (jantung, pankreas, hati, dan ginjal) difiksasi dalam formalin netral 10% kemudian dilakukan pemeriksaan histopatologis; sampel didehidrasi dan ditanamkan dalam lilin parafin, kemudian diwarnai dengan hematoxylin dan eosin dan diperiksa (Suvarna *et al.*, 2013).

Analisis statistik

Menurut Tamhane dan Dunlop (2000), analisis statistik data dari penelitian ini dilakukan dengan menggunakan uji T.

HASIL

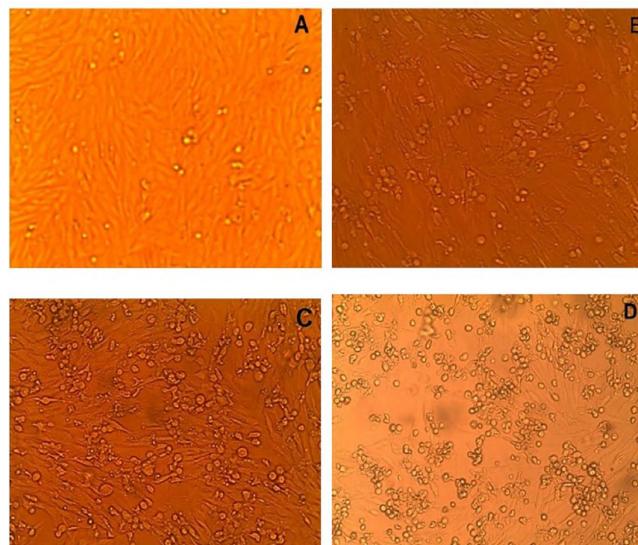
Temuan klinis

Bergantung pada usia pedet, gejala klinisnya bervariasi

agak. Anoreksia, aritmia jantung, demam yang terkadang mencapai 41°C, dan kematian mendadak beberapa hewan tanpa gejala klinis sebelumnya. Pedet yang sakit menunjukkan indikasi lesu, tidak aktif, terengah-engah saat bernafas melalui mulut, tidak bisa menyusu, dan telentang. Air liur yang parah dengan vesikel, erosi, dan borok di berbagai lokasi rongga bukal dan ruang inter-digital kuku. 30 pedet yang sakit menunjukkan suhu tinggi (>40 °C), takipneia (>50 napas/menit), takikardia (>100 denyut/menit), suara bising. 19 pedet yang sakit menunjukkan lesi oral. 7 anak sapi yang sakit menunjukkan lesi kaki. 4 anak sapi yang sakit menunjukkan lesi pada mulut dan kaki. Ini dibandingkan dengan 20 pedet kontrol yang bebas dari gejala sebelumnya.

Kultur jaringan

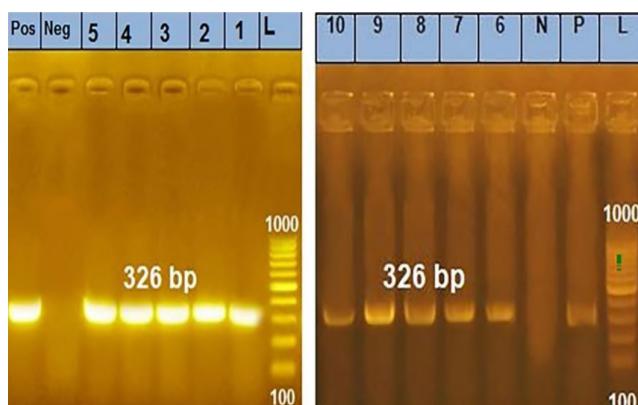
Perbanyak sampel yang dicurigai pada garis sel BHK-21 menghasilkan efek sitopatik karakteristik (CPE) selama tiga bagian berturut-turut 24-48 jam pasca inokulasi (Gbr. 1).



Gambar 1. (A) Garis sel BHK-21 kontrol normal. (B) Sel BHK-21 yang terinfeksi PMK (tahap 1: inisiasi infeksi dan pembulatan sel, dan perataan dimulai, foto diambil setelah 12 jam). (C) sel BHK-21 yang terinfeksi PMK (tahap 2, hampir 100% sel terinfeksi, foto diambil setelah 24 jam infeksi). (D) sel BHK-21 yang terinfeksi PMK (tahap 3) (D).

Karakterisasi molekuler FMDV oleh PCR

Sampel FMDV (n.=10) diuji keberadaan VP1 (gen target) pada ukuran yang diharapkan: 326 (Gbr. 2).



Gambar 2. Deteksi FMDV oleh PCR (elektroforesis gel agarosa dari produk PCR) Primer spesifik mengatur fragmen DNA yang diamplifikasi sebesar 326 bp setara dengan ukuran produk amplifikasi (amplikon) yang diharapkan dari FMDV. Jalur: (L) tangga DNA 100 bp. (Pos): produk PCR positif dari galur rujukan virus PMK. (Neg): kontrol negatif (tanpa primer). Jalur (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10): +5 sampel.

Temuhan hematologi

Pedet yang sakit menunjukkan penurunan yang signifikan dalam jumlah sel darah merah, konsentrasi Hb dan PCV% dibandingkan dengan kelompok kontrol. Selain itu, leukogram anak sapi yang sakit menunjukkan leukopenia dan limfopenia yang signifikan (Tabel 1).

Tabel 1. Parameter hematologi (Nilai rata-rata ± SE) kontrol sehat dan pedet sakit.

Parameter	Kontrol betis (n=20)	Anak sapi yang sakit (n=20)
sel darah merah (10 ³ /UL)	7,12±0,14	5,24±0,16***
Hb (gm/dl)	11,48±0,10	9,22±0,17***
% PCV	37,38±0,18	28,04±0,21**
TLC (10 ³ /UL)	8,66±0,19	7,09±0,23***
Neutrofil (10 ³ /UL)	3,82±0,41	3,68±0,38
Limfosit (10 ³ /UL)	4,28±0,25	2,89±0,18***
Eosinofil (10 ³ /UL)	0,15±0,005	0,13±0,005
monosit (10 ³ /UL)	0,41±0,02	0,39±0,02

* : Signifikan pada P<0,05; **: Signifikan pada P <0,01; ***: Signifikan pada P <0,001

Analisis biokimia

Data menunjukkan peningkatan signifikan pada troponin jantung, enzim lipase, glukosa, asam lemak non-esterifikasi, asam beta hidrosil butirat, aktivitas AST, ALT, dan BUN. Di sisi lain, insulin serum dan amilase menunjukkan penurunan yang signifikan pada anak sapi yang sakit dibandingkan dengan kelompok kontrol yang sehat (Tabel 2).

Tabel 2. Parameter biokimia serum (Nilai rata-rata ± SE) kontrol sehat dan pedet sakit.

Parameter	Kontrol betis (n=20)	Anak sapi yang sakit (n=20)
Troponin jantung (µg/L)	0,24±0,03	14,80±0,62***
Insulin (µLU/ml)	16,42±1,17	12,89±1,06**
Amilase (U/L)	27,26±1,15	21,46±1,20*
Lipase (U/L)	33,58±2,12	47,98±3,85**
Glukosa (mg/dl)	70,2±3,63	94,15±4,60***
Asam lemak non-esterifikasi (mmol/L)	0,56±0,05	1,44±0,22**
Asam beta hidrosil butirat (mmol/L)	1,35±0,30	4,74±0,43***
AST (IU/L)	63,9±2,74	98,7±3,62***
ALT (IU/L)	31,6±0,65	52,8±2,32***
Nitrogen urea darah (mg/dl)	22,5±0,40	27,3±0,51***
Kreatinin (mg/dl)	1,72±0,007	1,74±0,008

* : Signifikan pada P<0,05; **: Signifikan pada P <0,01; ***: Signifikan pada P <0,001

Pemeriksaan post-mortem

Jantung membentuk garis-garis putih keabu-abuan di dinding miokard yang dipisahkan oleh area yang padat. Mukosa saluran cerna hiperemik dengan pembentukan vesikel (Gbr. 3A) Pankreas hiperemik dan kencang (Gbr. 3B). Hati, dan ginjal membesar dan pucat.

Pemeriksaan histopatologi

Jantung betis menunjukkan karakteristik nekrosis koagulatif dengan infiltrasi limfo-histiositik masif di samping beberapa neutrofil bersama dengan edema fokal antara miofibril jantung (Gbr. 3C & D). Kerusakan endotel, perivaskular dan intermus-

edema kular yang mengandung benang fibrin dan sel leukosit terutama limfosit dan neutrofil (Gambar 3E). Perikardium diinfiltrasi dengan sejumlah sel radang mononuklear yang bercampur dengan benang fibrin (Gbr. 3F).

Pankreas menunjukkan edema interlobular pada septa dengan nekrosis dan atrofi kelenjar eksokrin dan endokrin pankreas bersama dengan jaringan fibrosa edematous yang diinfiltrasi oleh leukosit di sekitar saluran pankreas. Selain itu, saluran pankreas menunjukkan metaplasia atau deskuamasi pada lapisan epitel dengan degenerasi dan hialinasi pada serat otot polosnya selain nekrosis kelenjar pankreas yang berdekatan dan infiltrasi limfositik (pankreatitis nekrotik) (Gbr. 4C). Beberapa pulau Langerhans menunjukkan hiposelularitas dan perubahan degeneratif eosinofilik hialin (Gbr. 4D).

Hati menunjukkan nekrosis koagulatif hati fokal dan infiltrasi fokal oleh sel inflamasi ringan terutama limfosit dan dilatasi sinusoid (Gbr. 4E). Area portal Th4e menunjukkan hiperplasia epitel bilier dan kongesti interstitial periductal sentral (Gambar 4F). Belakangan, hewan yang bertahan hidup menunjukkan agregasi leukosit interstitial di antara hepatosit.

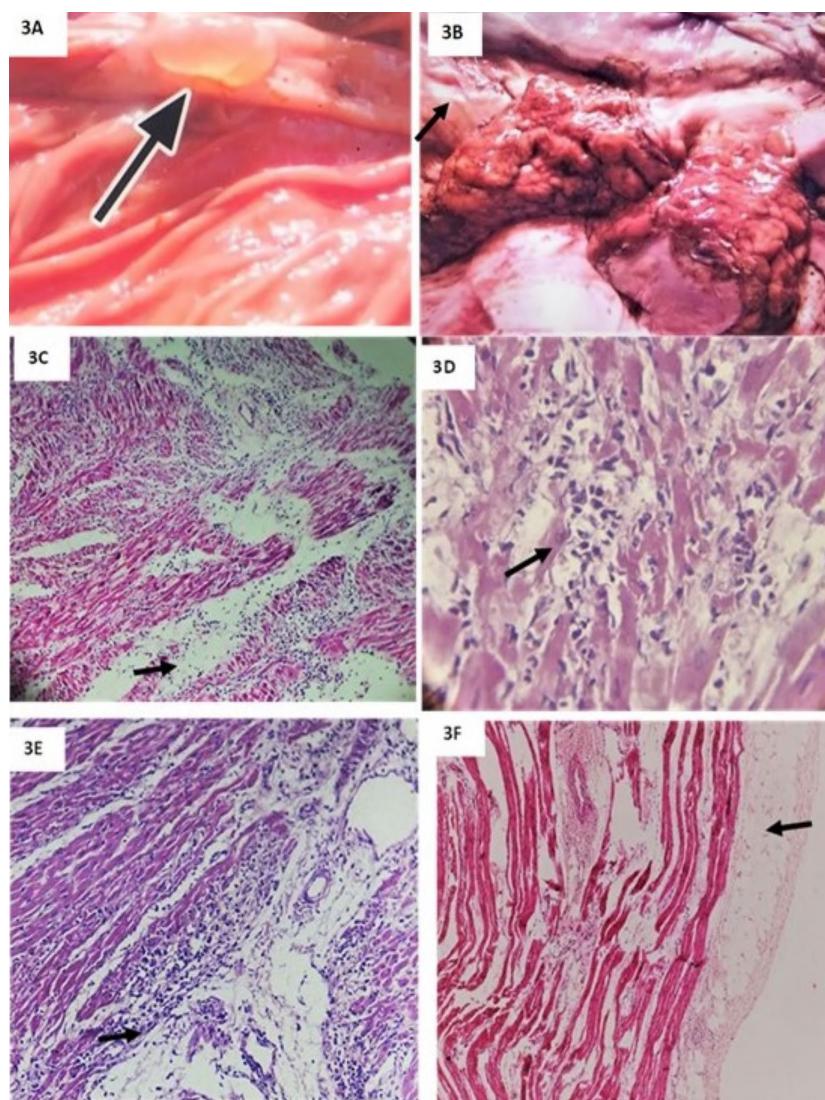
Ginjal menunjukkan pembengkakan keruh, degenerasi hidropik, hiperselularitas beberapa glomeruli dengan tidak adanya ruang glomerulus kapsul bowman, dan hipertrofi endotelial.

plasia (Gbr. 4G). Pada kasus lanjut, ginjal menunjukkan nekrosis koagulatif parah pada beberapa tubulus ginjal dan perdarahan fokal pada parenkim ginjal (Gbr. 4H). Beberapa glomeruli mengungkapkan perubahan degeneratif dan penyusutan di beberapa jumbai glomerulus.

DISKUSI

Di Mesir, meskipun pemerintah sering memvaksinasi anak sapi dengan vaksin PMK, ada banyak wabah PMK di Mesir setiap tahun. Sejak PMK endemik di Mesir dan telah terjadi banyak wabah yang melibatkan serotype O, A, dan SAT-2 untuk waktu yang lama (Abd El-Rhman *et al.*, 2021). Secara imunologis, area pengkodean protein virus 1 (VP1) dari strain FMDV bertanggung jawab atas kekebalan protektif, spesifitas serotype, perlakuan virus sel, dan heterogenitas antigenik. Laboratorium referensi dunia telah menguji teknik RT-PCR menggunakan primer untuk PMK untuk diagnosis virus PMK rutin. Metode ampuh untuk deteksi FMDV yang akurat adalah RT-PCR (Paixão *et al.*, 2008). Ketika FMDV menginfeksi kultur jaringan BHK-21, biasanya menyebabkan sitopatologi dan kematian sel yang signifikan. (Herra *et al.*, 2008).

Dalam penelitian ini, vesikel yang belum pecah atau baru saja pecah dari lidah anak sapi yang dicurigai secara klinis digunakan sebagai percobaan untuk mengisolasi FMDV dari jaringan epitel. Sampel disuntikkan ke dalam kultur sel BHK-21 yang konfluen dan dikembangkan dari CPE. 12 jam setelah infeksi, karakteristik CPE mulai bermanifestasi,



Gambar 3. (A) Pembentukan vesikel pada permukaan retikulum. (B) Pankreas hiperemik dan kencang. (C & D) Jantung menunjukkan nekrosis koagulatif parah dari serat otot jantung dengan infiltrasi limfo-histiositik masif mengantikan otot miokard dan edema. (E) Jantung menunjukkan edema perivaskular yang mengandung benang fibrin dan sel leukosit. (F) Perikardium diinfiltrasi dengan banyak sel inflamasi mononuklear yang bercampur dengan benang fibrin (panah) (H&E X 100.200&400).

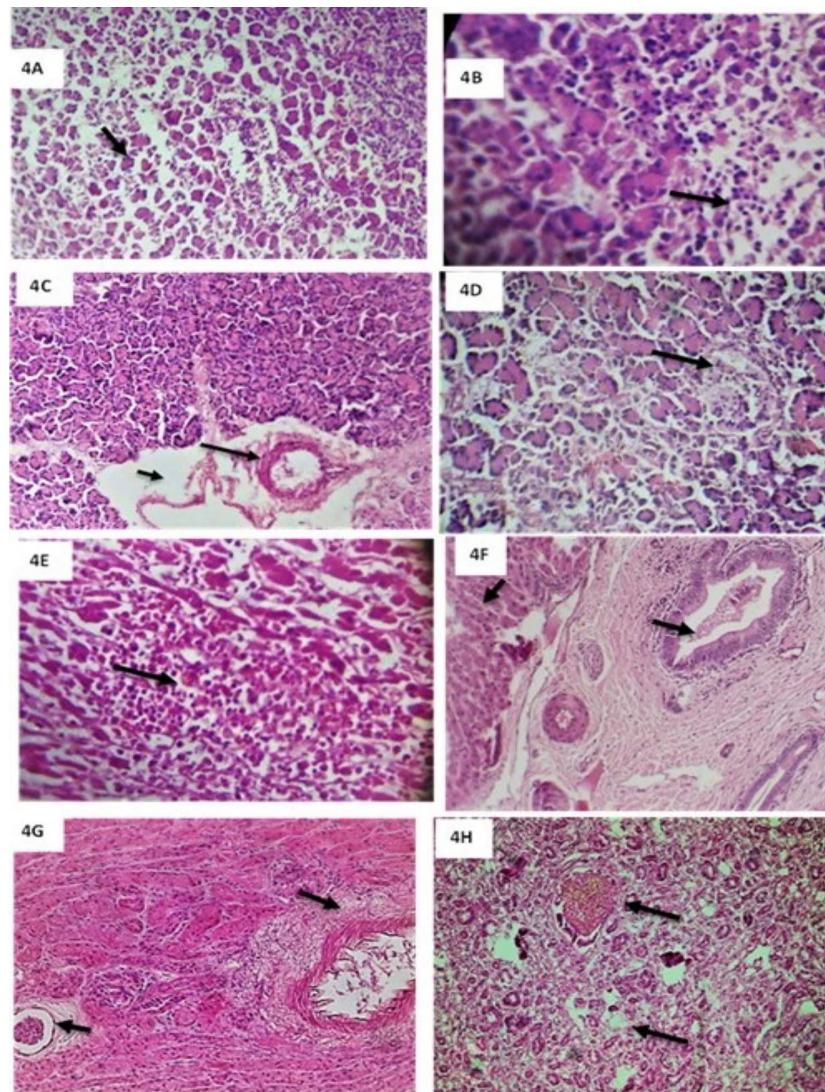
yang terdiri dari perataan dan pembulatan sel, produksi sel berinti banyak, pembubaran jembatan intraseluler. Dalam waktu 48 jam, lebih dari 60% sel telah mati, dan dalam 72 jam, lapisan tunggal sel telah terpisah dari permukaan bejana kultur. Isolasi sel FMDV BHK-21 adalah teknik yang sangat sensitif.

Untuk memberikan konfirmasi lebih lanjut, diagnosis Molekuler (RT-PCR) digunakan sebagai deteksi cepat dan uji konfirmasi menurut OIE (2012), RT-PCR dilakukan dengan memilih primer berbasis gen virus VP1 sebagai wilayah yang dilestarikan. RNA diekstraksi dari sampel RT-PCR dilakukan dengan menggunakan set primer tertentu yang menghasilkan fragmen yang diamplifikasi sebesar 326 bp, yang setara dengan ukuran amplikon FMDV yang diharapkan. Ukuran fragmen gen protein perlakuan sama pada strain referensi FMDV dan sampel uji jaringan epitel. Akibatnya, ditentukan bahwa 10 sampel yang diperiksa adalah PMK-positif.

Hewan yang sakit dalam penyelidikan saat ini memiliki berbagai gejala klinis yang sebelumnya didokumentasikan oleh Alexendersen *et al.* (2003) dan Alsaad *et al.*, (2020). Namun, gejala dan tingkat keparahan PMK mungkin berbeda antara ras hewan, dan bahkan di dalam ras, kemungkinan besar disebabkan oleh strain dan serotipe virus, faktor genetik hewan, atau sistem kekebalan mereka (Alsaad *et al.*, 2020). Temuan klinis demam yang meningkatkan denyut jantung dan pernapasan serta bising juga telah dilaporkan pada miokard.

ditis karena PMK, seperti yang terlihat sebelumnya (Karapinar *et al.*, 2010). Oleh karena itu, hasil ini menggambarkan gambaran klinis dari insufisiensi sirkulasi terkait miokarditis. Suhu tubuh, denyut nadi, laju pernapasan, dan irama jantung abnormal pada auskultasi tanpa lesi vesikuler PMK semuanya telah dijelaskan pada anak sapi menyusui oleh Karapinar *et al.* (2010) sebagai perubahan klinis utama pada pedet yang terinfeksi PMK. Mungkin ada atau mungkin tidak ada lesi vesikuler bersamaan saat miotropisme FMDV berkembang. Menurut Arzt *et al.*, (2011) adanya miotropisme dan vesikel disebut pembesaran multitropisme (otot dan epitel).

Analisis hematologi hewan yang terinfeksi PMK mengungkapkan penurunan yang signifikan dalam jumlah sel darah merah, konsentrasi hemoglobin, dan PCV%. Temuan serupa dicatat oleh Ghanem dan Abdel-Hamid (2010) dan Gattani *et al.* (2011). Oleh karena itu, endokrinopati yang berkembang sebagai akibat dari infeksi PMK mungkin menjadi penyebab utama anemia (Gokce *et al.*, 2004), atau sebagai akibat dari konsumsi vitamin B12 dan asam folat yang tidak mencukupi dalam makanan, masalah metabolisme hati, dan penurunan penyerapan karena kerusakan usus (Nasr El-Deen *et al.*, 2017). Namun, dari studi histopatologi kami, hati dan ginjal hewan yang terinfeksi menderita degenerasi dan nekrosis fokal, karena erythropoietin adalah zat vital yang diproduksi oleh ginjal dan bertanggung jawab untuk proses erythropoiesis, seseorang dapat membuat alasan utama untuk anemia pada hewan yang terinfeksi PMK.



Gambar 4. (A & B) Pankreas menunjukkan edema interlobular pada septa dengan nekrosis dan atrofi kelenjar eksokrin. (C) Edema interstisial, metaplasia lapisan epitel dengan degenerasi dan hialinosis pada serat polos pankreas. (D) Pulau Langerhans menunjukkan hiposelularitas, nekrosis kelenjar eksokrin, dan edema. (E) hati menunjukkan infiltrasi fokal sel mononuklear terutama limfosit di antara hepatosit nekrotik. (F) hati menunjukkan hiperplasia sel epitel yang melipasi saluran empedu dan perubahan degeneratif hepatoselular. (G) Ginjal menunjukkan pembengkakan keruh, degenerasi hidropik, dan hiperplasia endotel. (H) Ginjal menunjukkan nekrosis koagulatif parah pada tubulus ginjal, edema interstisial, dan perdarahan fokal (H&E X100,200 dan 400)

., 1991).

Leukopenia yang disebabkan oleh limfopenia ditemukan pada kasus infeksi FMDV (gp.2). Penurunan jumlah limfositik tersebut dapat disebabkan oleh imunosupresi sementara yang disebabkan oleh infeksi FMDV sel T dan B selama periode singkat ketika infeksi mencapai puncak viremia (Diaz dan Sevilla, 2006). Imunosupresi transien ini mendorong penyebaran virus secara luas dan menyebar ke lingkungan (Parida *et al.*, 2006). Apalagi Olabode *et al.* (2013) mencatat penurunan jumlah leukosit total yang signifikan pada sampel darah yang diambil dalam tiga hari pasca infeksi penyakit mulut dan kuku.

Jumlah neutrofil, monositik, dan eosinofilik pada kelompok yang sakit tidak menunjukkan perubahan yang signifikan. Hasil serupa juga dicatat oleh Krupakaran *et al.* (2009) dan Ghanem dan Abdel-Hamid (2010).

Tanda-tanda biokimia paling awal dari cedera otot jantung adalah troponin jantung serum (Boccara *et al.*, 2000). Karena cTnI adalah 100% spesifik jaringan untuk jantung, ini merupakan alat yang hebat untuk digunakan sebagai penanda biokimia untuk mengidentifikasi kerusakan pada otot jantung (Bodor *et al.*, 1995).

Menurut Limet *et al.* (2005), temuan histologis peradangan adalah tanda selanjutnya dari kerusakan miokard setelah infeksi virus daripada kadar troponin jantung darah. Jumlah perubahan inflamasi dan degeneratif pada miokardium kemungkinan tercermin dari peningkatan cTnI serum, yang berkorelasi terbalik dengan keparahan penyakit.

Kerusakan dan degenerasi sel jantung ditunjukkan oleh peningkatan signifikan kadar cTnI pada pedet yang terinfeksi PMK dibandingkan dengan pedet kontrol. Temuan ini didukung oleh karya Sobhyet *et al.* (2018) dan Alyet *et al.* (2020) dan terhubung dengan aksi miotropisme FMDV, yang menyebabkan insufisiensi jantung dan kerusakan miokard, terutama pada jaringan jantung (Sharma *et al.*, 2004).

Hasil ini didukung oleh nekrosis miokardium pada bagian histopatologi. Lesi karakteristik infark miokard pada jantung biasanya diamati pada infeksi virus PMK terutama pada anak sapi muda yang dapat menjadi penyebab kematian mendadak dan kematian yang tinggi. Otot jantung betis mengungkapkan nekrosis miokard dan infiltrasi limfohistiositik multifokal di samping beberapa neutrofil. Hasil ini memiliki kesepakatan dengan Ali, *et al.* (2016) dan Gab-Allahet *et al.* (2018) yang mencatat miokarditis histiocytic getah bening multifokal. Dalam penelitian kami, kadar enzim lipase serum, asam lemak non-esterifikasi (NEFA), dan asam beta hidroksil butirat (BHBA) sangat meningkat pada anak sapi yang sakit dibandingkan dengan kelompok kontrol, hasil kami disetujui oleh González, *et al.* (2011) dan Emanet *et al.* (2018), peningkatan (NEFA) juga bisa karena peningkatan mobilisasinya dari jaringan adiposa ke darah (Baird, 1982), dan selanjutnya, meningkatkan kadar enzim lipase pada pedet yang terinfeksi. Peningkatan (BHBA) disebabkan oleh mobilisasi lemak yang berlebihan dan akumulasi asetil-koenzim A yang diubah menjadi asetoasetat dan kemudian direduksi menjadi BHBA oleh BHBA dehidrogenase (Baird, 1982). Dalam penelitian kami, ada peningkatan yang signifikan dalam kadar glukosa dan penurunan yang signifikan dalam kadar insulin dan amilase pada anak sapi yang terinfeksi, hasil kami sesuai dengan Nasr El-Deen *et al.* (2017) dan Saadounet *et al.* (2019). Konsentrasi BHBA yang tinggi disertai dengan resistensi insulin yang lebih tinggi dan konsentrasi NEFA yang lebih tinggi terkait dengan sekresi insulin yang lebih rendah (Keresteset *et al.*, 2009). Itu juga akan menjelaskan hipoinsulinemia yang diamati dalam penelitian kami saat ini. Hiperglikemia disebabkan oleh penghancuran langsung sel-sel pankreas oleh virus PMK akibat replikasi virus PMK di dalam pankreas yang mengakibatkan penghancuran sel penghasil insulin (sel beta di pankreas) dan selanjutnya menyebabkan hipoinsulinemia. Hasil ini didukung oleh nekrosis sel pankreas seperti yang ditunjukkan pada histopatologi. Penurunan kadar enzim amilase serum dalam penelitian ini mungkin disebabkan oleh pankreatitis akut (Krehbielet *et al.*, 1995) atau akibat hipoinsulinemia seperti yang dikemukakan oleh Patel *et al.* (2006).

Menurut hasil investigasi saat ini, pemeriksaan biokimia serum pedet yang telah dilakukan secara klinis

terinfeksi FMD mengungkapkan peningkatan yang cukup besar dalam aktivitas AST dan ALT yang mungkin disebabkan oleh efek merusak virus pada otot miokard dan hepatosit, temuan ini setuju dengan penelitian sebelumnya (Nath *et al.*, 2014; Nasr El Dienet *et al.*, 2017). Namun, peningkatan kadar kreatinin dan BUN pada pedet yang sakit dapat disebabkan oleh kelaparan, dehidrasi, demam, peningkatan katabolisme, dan cedera jaringan, yang semuanya menyebabkan azotemia prarenal (Kaneko *et al.*, 1997). Hasil serupa dilaporkan oleh Saravanet *et al.* (2020).

Pemeriksaan mikroskopis pankreas menunjukkan pankreatitis nekrotik, edema interlobular di antara septa dengan nekrosis, dan atrofi kelenjar eksokrin dan endokrin pankreas yang diinfiltasi oleh sel bulat (terutama limfosit) di sekitar saluran pankreas. Beberapa pulau Langerhans menunjukkan degenerasi eosinofilik hialin dan hiposeptular. Pendapat penulis menganggap lesi di pankreas ini perlu penelitian lebih lanjut untuk mengeksplorasi apakah itu adalah organ target utama untuk infeksi dan replikasi virus. Arzt *et al.* (2011) mencatat atrofi pankreas pada bagian eksokrin dan endokrin dengan edema dan nekrosis selain tidak adanya beberapa lumen asinar. Juga, lesi sebelumnya sebagian setuju dengan yang diperoleh oleh Thomas (2002) yang mencatat pulau pankreas dan menunjukkan degenerasi acini pada sapi yang terinfeksi kronis.

Pemeriksaan hati mengungkapkan nekrosis koagulatif hati multi-fokal dan infiltrasi fokal oleh sel inflamasi ringan terutama limfosit dan dilatasi sinusoid. Laporan-laporan ini sangat sesuai dengan hasil Brownet *et al.* (1996) dan Aliet *et al.* (2016) yang mencatat nekrosis koagulatif sentrilobular, perubahan lemak, dan beberapa area portal diinfiltasi oleh beberapa limfosit. Selain itu, lesi pada kapsul hati dan parenkim (fibrosis) disebabkan oleh infeksi bersamaan oleh patogen lain.

Ginjal dalam penelitian ini mengungkapkan nekrosis koagulatif parah pada tubulus ginjal dan perdarahan fokal pada parenkim ginjal. Beberapa glomeruli adalah perubahan degeneratif dan penyusutan beberapa jumbai glomerulus Gab-Allahet *et al.* (2018) menemukan pembuluh darah yang sangat tersumbat, nekrosis tubulus ginjal, degenerasi hialin, dan jumbai glomerulus nekrotik. Selain itu, Lubroth (2002) menjelaskan bahwa lesi pada hati dan ginjal disebabkan oleh infark otot jantung yang menyebabkan nekrosis fokal dan adanya basil clostridial yang menyebabkan infeksi bakteri sekunder.

KESIMPULAN

Kesimpulannya, temuan penelitian ini menunjukkan bahwa bentuk jantung PMK pada hewan muda tidak menunjukkan lesi vesikular atau gejala klinis patognomi. Pendekatan yang sangat sensitif untuk mendekripsi cedera sel miokard pada tahap awal penyakit adalah pengukuran troponin jantung darah. Pankreatitis nekrotik, atrofi kelenjar pankreas dan pulau Langerhans jelas membutuhkan investigasi lebih lanjut untuk menentukan apakah lesi ini mungkin menjadi salah satu penyebab kematian akibat hipoinsulinemia. Miokarditis yang disebabkan oleh FMDV berkorelasi erat dengan usia dan lebih sering terjadi pada pedet yang lebih muda.

UCAPAN TERIMA KASIH

Para penulis mengakui dukungan baik dari profesor Dr. Mohamed Abdo Ebrahim Kepala peneliti Biokimia. Balai Penelitian Kesehatan Hewan (AHRI), Pusat Penelitian Pertanian (ARC).

KONFLIK KEPENTINGAN

Para penulis menyatakan bahwa mereka tidak memiliki konflik kepentingan.

REFERENSI

Abd El-Rhman, M., Salem, SA, Bazid AI, Abo El-Hassan DG, 2021. Mengenangkan lekuler dan serologis dari serotype virus penyakit kaki dan mulut yang saat ini beredar di Mesir. J. Vet Irak. Sc. 35,

581-588.

- Aktas, MS, Ozkanlar,Y., Oruc, E., Sozduutmaz, I.,Kirbas, A., 2015. Myocarditis terkait dengan penyakit kaki dan mulut pada anak sapi yang sedang menyusui. Dokter hewan. Arsip. 85, 273-282.
- Alexandersen, S., Zhang Z., Donaldson, AI, Garland, AJ, 2003. The patogenensis dan diagnosis penyakit mulut dan kuku. J.Komp. kesedihan. 129, 1-36.
- Ali, AA, Hafez, MH, Ahmad, B., Hasanin, SA, Algabri, N., Sheire, HA, 2016. Investigasi patologis dan molekuler pada wabah virus kaki dan mulut di antara ternak sapi di Kegubernuran Dakahlia, Mesir. Zag. Dokter hewan. J.44.128-137.
- Alsaad, K., Al-Aitaish, H., Ahmed, J., 2020. Evaluasi enzim jantung dan respon fase akut sebagai biomarker untuk diagnosis cepat miokarditis pada betis dengan PMK. J. Vet Irak. Sains. 34, 31-37.
- Aly, M., Nayel, M., Salama, A., Ghazy,E., Elshahawy, I., 2020. Tropo jantung nin I sebagai biomarker jantung memiliki nilai prognostik dan prediktif untuk kelangsungan hidup yang buruk pada anak sapi kerbau Mesir dengan penyakit kaki dan mulut. Vet. Dunia, 13, 890-895.
- Arzt, J., Juleff, N., Zhang, Z., Rodriguez, L., 2011. Patogenensis Kaki dan Penyakit Mulut I: Jalur Viral pada Sapi. Trans. dan Emer. Dis. 58, 291-304.
- Aslani, MR, Mohri, M., Movassaghi, A., 2013. Serum troponin I sebagai indikator miokarditis pada domba yang terkena penyakit kaki dan mulut. Dokter hewan. Res. Forum 4, 59-62.
- Baird, GD, 1982. Ketosis primer pada sapi perah berproduksi tinggi: klinis dan gangguan subklinis, pengobatan, pencegahan, dan pandangan. J. Ilmu Susu. 65, 1-10.
- Barker, I., Van Dreumel, A., Palmer N., 1993. Sistem pencernaan. Di: Patologi Hewan Domestik, edisi ke-4. (Jubb, KVF, PC Kennedy, N. Palmer, Eds.). Academic Press, San Diego, CA., hlm. 141-144.
- Barry, AF, Aline Alfieri, AF, Stipp, DT, Alfieri, AA, 2009. Bovine corona-deteksi virus dalam kumpulan sampel tinja diare positif untuk rotavirus kelompok sapi. Braz. Lengkungan. Biol.Technol. 52, 45-49.
- Boccaro, G., Pouzeratte, R., Troncin, A., Bonardet, A., Boulanan, P., Mann 2000. Risiko cedera jantung selama fundoplikasi laparoskopik, troponin jantung I, dan studi EKG. Acta Anestesiol. Pindai. 44, 398-402.
- Bodor, GS, Porterfield, D., Voss, E., 1995. Cardiac troponin I is not ex-ditekan pada janin dan jaringan otot rangka manusia dewasa yang sehat atau sakit. Klinik. kimia 41, 1710-1715.
- Brown, CC, Piccone, ME, Mason, PW, McKenna, T., Grubman, M., 1996. Patogenesis virus penyakit kaki dan mulut tipe liar dan tanpa pemimpin pada sapi. J. Virol, 70, 5638-5641.
- Chevenne, D., Letailleur, A., Trivin, F., Porquet, D., 1998. Pengaruh hemolis pada konsentrasi insulin ditentukan oleh RIA IRMA. Klinik. kimia 44, 354-356.
- Diaz, S., Sevilla, S., 2006. Penipisan limfosit selektif pada awal tahap respon imun terhadap infeksi virus penyakit kaki dan mulut pada babi. J. Virol, 80, 2369-2379.
- Domingo, E., Baranowski, E., Escarmism C., Sobrino, F., 2002. Kaki dan virus penyakit mulut. Comp Immunol Mikrobiol Menginfeksi Dis. 25, 297-308.
- Eman, AK, Salama, MF, Ahmed, E., Nabil, AH, 2018. Perubahan di beberapa parameter biokimia pada sapi yang terkena penyakit kaki dan mulut di gubernuran dahlia, Mesir. Dokter Hewan Mansoura. Kedokteran J.19, 1-14.
- Feldman, BF, Zinkl, J., Jain, N., 2000. Schalm Vet. Hemat. Edisi ke-5, Philadelphia, Lippincott Williams, dan Wilkins, hlm. 1120-1124.
- Ferris, N., Nordengrahn, A., Hutchings, G., Reid, S., King, D., Ebert, K., Paton, D., Kristersson, T., Brocchi, E., Grazioli, S., Merza, M., 2009. Pengembangan dan validasi laboratorium perangkat aliran lateral untuk mendeteksi virus penyakit kaki dan mulut dalam sampel klinis. J. Virolo. Metode. 155, 10-17.
- Gab-Allah, M., Abdel-Baset, I., El-Mashad, Shawky, A., Moustafa, A., El-maghriby, 2018. Studi Patologi Penyakit Mulut dan Kuku di Kegubernuran Kaluobia. Benha Vet. Kedokteran J.34, 1, 195-208.
- Gattani, A., Gupta, KK, Joshi, G., Gupta, SR, 2011. Profil Metabolik penyakit kaki dan mulut menekan domba di daerah semi-kering. J. Stress Physiolo. & Ahli Biokimia. 7, 148-153.
- Ghanem, M., Abdel-Hamid, OM, 2010. Klinis, hematologis, dan bio-perubahan kimia dalam sindrom intoleransi panas (terengah-engah) pada sapi Mesir setelah penyakit mulut dan kaki alami (PMK). Trop. Ani. Produk Kesehatan 42, 1167-1173.
- Gokce, G., Gokce, HI, Erdogan, HM, Gunes, V., Citil, M., 2004. Perubahan dalam beberapa parameter hematologis dan biokimia pada sapi yang menderita penyakit mulut dan kuku. Turki J. Vet. Ani. Sci, 28, 723-727.
- González, FD, Muiño, R., Pereira, V., Campos, R., Benedito, J., 2011. Rela-hubungan antara indikator darah lipomobilisasi dan fungsi hati selama awal laktasi pada sapi perah hasil tinggi. J.Vet.
- Sci.12, 251-25.
- Henry, RJ, 1974. Penentuan kreatinin serum. Kimia Klinis: Prinsip dan teknik. Edisi ke-2, Harper and Row., hlm. 548-551.
- Herrera, M., Grande-Pérez, A., Perales, C., Domingo, E., 2008. Ketekunan virus penyakit kaki-dan-mulut dalam kultur sel ditinjau kembali: implikasi untuk kontingenensi dalam evolusi. Jenderal Virol. 89, 232-244.
- Jamal, SM, dan Belsham, GJ, 2013. Penyakit kaki dan mulut: Masa lalu, masa depan ent, dan masa depan. Dokter hewan. Penelitian. 44, 116.
- Jubb, K., Kennedy, PG, dan Palmer, N., 1991. Patologi. Rumah. Ani. Edisi ke-5, Academic Press, Orlando, Florida, AS.
- Kaneko, J., Harvey, J., Bruss, M., 1997. Biokimia Klinis Domestik Hewan. Edisi ke-5. Academic Press San Diego, California, AS., hlm. 661-668.
- Karapinar, T., Dabak DO, Kuloglu T., Bulut, H., 2010. Tropo jantung tinggi konsentrasi plasma nin I pada betis dengan miokarditis. Bisa. Dokter hewan. J.51, 397-399.
- Kerestes, M., Faigl, V., Kulcsar, M., 2009. Per persalinan sekresi insulin dan respon insulin seluruh tubuh pada sapi perah yang menunjukkan berbagai bentuk pola keton dengan atau tanpa metrititis nifas. Rumah. Ani. Endokri. 37, 250-261.
- Krehbiel, CR, Britton, RA, Harmon, DL, Wester, TJ, Stock, R., 1995. The efek asidosis rumen pada penyerapan asam lemak volatil dan aktivitas plasma enzim pankreas pada domba. J.An. Sains. 73, 3111-3121.
- Krupakaran, RP, Porcheziyan, T., Sivseelan, S., 2009. Biokimia dan he-profil matologi penyakit kaki dan mulut yang mempengaruhi sapi persilangan di distrik Karur Tamil Nadu. Dokter hewan. Praktek. 10, 37-38.
- Lim, BK, Shin, JO, Choe, SC, 2005. Cedera miokard terjadi lebih awal dari peradangan miokard pada miokarditis virus eksperimental akut. Exp. Mol. Kedokteran 28, 37,51-57.
- Lott, JA, dan Turner, K., 1975. Evaluasi oksidase glukosa Trinder metode untuk mengukur glukosa dalam serum dan urin. Klinik. kimia 21, 1754-60.
- LuBroth, J., 2002. Penyakit Mulut dan Kuku review bagi praktisi. Klinik Dokter Hewan N. Am: Makanan Anim. Prakt., 18, 475-499.
- Murray, R., 1984. Alanine aminotransferase. Kaplan LA., Clin Chem CV Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton., hlm. 1088-1090.
- Nasr El-Deen, NA, Neamat-Allah, ANF, Rizk, LG, Fareed, R., 2017. Seropenanda logis, hematologi, biokimia dan oksidatif selama infeksi serotype O penyakit kaki dan mulut. Mesir. Buletin UASVM Vet. Kedokteran 74, 218- 226.
- Nath, R., Prasad, RL, Deka, SS, Adil, A., Senapatti, M., Islam, M., 2014. Dampak penyakit mulut dan kuku pada aktivitas ovarium pada sapi. Sch. J.Agric. Dokter hewan. Sains. 2, 166-168.
- OIE, 2012. Manual Terrestrial 2012. Bab 2.1.5. Gangguan kaki dan mulut meredakan. https://www.oie.int/filea/dmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.08_PMK.
- OIE, 2021. Manual Terrestrial. Bab 1.1.3, pengangkutan bahan biologis real. https://www.oie.int/filea/dmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.08_PMK.
- Olabode, HO, Kazeem, HM, Raji, MA, Ibrahim, ND, Adeh, BM, Obafemi, FM, 2013. Variasi hematologi terkait dengan infeksi virus penyakit kaki dan mulut sapi. J.Vet. Advan. 3, 245-250.
- Paixão, A., Paiva, J., Reis, M., Barbosa, C., Serra, R., Silva, T., Beckham, B., Martin, N., Clarke, L., Santos, R., 2008. Diagnosis penyakit kaki dan mulut dengan reaksi berantai transkripsi polimerase terbalik waktu-nyata dalam kondisi lapangan di Brasil. Dokter hewan. Res. 4, 53-62.
- Parida, S., Reid, SM, Cox, SJ, Statham, RJ, Mahapatra, M., Anderson, J., Barnett, PV, Charleston, B., Paton, DJ, 2006. Produksi interferon-gamma in vitro dari seluruh darah virus penyakit mulut dan kaki (FMDV) yang divaksinasi dan menginfeksi ternak setelah inkubasi dengan FMDV yang tidak aktif. Vaksin 24.964-969.
- Patel, R., Pariente, JA, Martinez, MA, Salido, GM, Singh, J., 2006. Efek Insulin pada Pelepasan Amilase yang Ditimbulkan Asetilkolin dan Mobilisasi Kalsium pada Sel Asinar Pankreas Tikus yang Diinduksi Streptozotocin. Sejarah Akademi Ilmu Pengetahuan New York 1084, 58-70.
- Patton, CJ, Crouch, SR, 1977. Penentuan urea secara enzimatik. Anal. Kimia, 49: 466-469. Prinsip dan Teknik. Edisi ke-2, Harper and Row Publishers. New York.
- Saadoon, AS, Al-Obaidi, QT, Al-Mahmood, S., Albaroodi, SY, 2019. Aspek Klinis-patologis dan Biokimia Penyakit Mulut dan Kuku pada Betis. Advan. Ani Vet. Sains. 7, 835- 843.
- Saravanan, SV, Umapathi, M., Priyanka, M., Hosamani, BP, Sreenivasa, BH, Patel, K., Narayanan., Basagoudanava, SH, 2020. Profil hematologi dan biokimia serum pada sapi secara eksperimental terinfeksi virus penyakit mulut dan kuku. Dokter Hewan Dunia 13, 427-432.
- Sharma, S., Jackson, P., Makan, J., 2004. Troponin jantung. J.Clin. Patol. 57, 1025-1026.

- Smith, Wilson 2006. Asam Lemak Bebas dan Aterosklerosis. Klinik J. endokrinol. Metab. 91, 2506-2508.
- Smith, B., 2015. Obat Penyakit Dalam Hewan Besar. edisi ke-5 Elsevier Mosby, St Louis., hal.777-799.
- Sobhy, NM, Bayoumi, YH, Mor, SK, El-Zahar, HI, Goyal, SM, 2018. Wabah penyakit kaki dan mulut di Mesir: Epidemiologi molekuler, evolusi, dan signifikansi prognostik biomarker jantung. Antar.J.Vet. Sains dan Kedokteran. 6, 22- 30.
- Suvarna, SK, Layton, C., Bancroft, JD, 2013. Teori dan Praktik Bancroft teknik Histologis. edisi ke-7 Elsevier, Churchill Livingstone, Inggris.
- Tamhane, AF, Dunlop, D., 2000. Statistik dan analisis data dari Elemen- tar ke Upper Saddle River Menengah, AS.
- Teklegiorghis, T., Moormann, R., Weerdmeester, K., Dekker, 2016. Sebuah Kaki dan penularan penyakit mulut di Afrika: implikasi untuk kontrol, ulasan. Transbound Emerg. Dis. 63, 136-151.
- Thomas, JR, 2002. Keseluruhan Temuan Patologis. Teks Ikhtisar Editorial Direplikasi pada keseluruhan Penyakit PAG – Penyakit mulut dan kuku. Pusat Kesehatan Satwa Liar Nasional, Video Tersedia; Nekropsi Ungulata Liar.
- Tietz, NW, Fioreck, EA, 1966. Sebuah metode spesifik untuk penentuan lipase serum penambangan. Clinica Chimica Acta 13, 352.
- Winn-Deen, ES, Yeotikar, PV, Bapat, ST, Bilolikar, SC, Kulkarni, SS, 2003. Profil Metabolik Sapi Sehat dan Sapi Terkena Penyakit Mulut dan Kuku. Dokter hewan. Catatan. 153, 19-20.
- Young, DS, 2000. Pengaruh obat pada Lab klinik. Tes, Edisi ke-5. Pers AACC.

Makalah Penelitian Panjang Penuh

Interaksi dalam produksi biofilm dan kerentanan obat *Candida kefir* dengan *Escherichia coli* dan *Streptococcus dysgalactiae* isolasi dari mastitis sapi

Israel Daniel Ricardo-González¹, Laura Hernández-Andrade^{2*}, Ana Lilia Del Monte-Rodríguez², Marco Antonio Santillan-Flores², Miguel Ángel Blanco Ochoa¹, Luis Octavio Campuzano-Reyes¹ dan Alberto Jiménez-Saavedra³

¹Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 3000 Edificio A, Delegación Coyoacán, Col. Cd Universitaria CP 04510 México.

²Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, CENID-Salud Animal e Inocuidad, INIFAP, Carretera México-Toluca, Km 15.5. Colón Pal Alto, CP 05110. Delegación Cuajimalpa, Ciudad de México.

³Instituto Mexicano del Seguro Social, México.

Diterima 18 Februari 2022; Diterima 4 Juli 2022

Bovine mastitis adalah penyakit dengan dampak ekonomi yang tinggi pada peternakan sapi perah dan telah dijelaskan bahwa spesies *Candida* yang berbeda dapat menyebabkannya. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk membuktikan produksi biofilm oleh strain *Candida Kefir*, untuk melakukan evaluasi komparatif produksinya dengan teknik tabung dan pelat, untuk mengetahui interaksinya dengan *Escherichia coli* dan *Streptococcus dysgalactiae* isolasi dari bovine mastitis dan mengetahui kerentanan obat masing-masing. Identifikasi *C. kefir* dilakukan dengan fermentasi dan asimilasi karbohidrat, konfirmasi identifikasi dan konsentrasi hambat minimum untuk antimikotik dilakukan dengan Vitek2 Sistem. Uji pembentukan biofilm pelat dan tabung dilakukan dalam rangkap tiga. Analisis varians (ANOVA) dan uji Tukey dilakukan, serta korelasi Spearman terhadap data yang diperoleh. Dalam tes pelat, pembentukan biofilm ditunjukkan pada tujuh *C. kefir* isolat, serta sinergi dalam kombinasi dengan *E. coli* dan *S. dysgalactiae*. Namun, inokulum yang mengandung ketiga mikroorganisme berperilaku serupa dengan inokulum yang hanya mengandung *C. kefir* dan *S. dysgalactiae*. Itu mungkin untuk menunjukkan korelasi antara tes pembentukan biofilm dalam tabung dan pelat. Ini adalah laporan pertama di Meksiko tentang *C. kefir*, serta produksi biofilm pada mastitis klinis sapi.

Kata kunci: mastitis, *Candida kefir*, *Escherichia coli*, *Streptococcus dysgalactiae*, biofilm, kerentanan obat

PENGANTAR

Mastitis adalah respon inflamasi kelenjar susu terhadap lesi fisik atau infeksi mikroba. Kondisi ini memiliki dampak yang sangat besar pada produksi susu, kesejahteraan hewan dan kualitas susu

ekonomi unit produksi (Ávila dan Gutiérrez, 2018; Romero et al., 2018).

Terdapat lebih dari 135 mikroorganisme yang teridentifikasi sebagai agen penyebab mastitis sapi

yang paling sering adalah *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus* spp dan *Mycoplasma* spp (Watts, 1988). Mikroorganisme lain seperti ragi, kapang, alga dan virus juga dapat menyebabkan proses peradangan pada kelenjar susu (Watts, 1988). Meskipun kejadian mastitis oleh jamur umumnya rendah, mereka dapat dianggap sebagai agen penyebab infeksi mammae, ketika pengobatan antimikroba tidak efektif (Bourtzi-Hatzopoulou et al., 2003; Krukowski et al., 2000).

Jamur ditemukan terutama di tanah; beberapa ragi dapat ditemukan sebagai flora normal selaput lendir seperti di rongga vagina, mulut, dubur dan rumen. Mereka dapat mengkolonisasi kulit kelenjar susu dalam jumlah kecil dan umumnya merupakan mikroorganisme oportunistik yang menyebabkan penyakit dalam kondisi imunosupresi (Hassan et al., 2018). Sumber asalnya adalah tanah, tumbuhan, air, bahan organik, tangan pemerah, cangkir susu, dan jarum suntik multidosis atau perawatan yang mungkin terkontaminasi, atau yang belum ditangani secara higienis yang dapat menyebabkan kembalinya kondisi tersebut, setelah perawatan ditangguhkan atau perbaikan tanpa perawatan apapun. Penularan dapat terjadi melalui cangkir susu, sapi ke sapi, langsung melalui lingkungan dan dari sapi ke sapi selama proses pemerasan (Bourtzi-Hatzopoulou et al., 2003).

Secara umum, infeksi ragi mastitis memiliki presentasi yang rendah di peternakan sapi perah komersial, dengan prevalensi yang dilaporkan sekitar 3%. Namun demikian, ada laporan prevalensi yang lebih tinggi seperti di Brasil hingga 17,3% (De Casia dos Santos dan Marin, 2005); di Yunani, 6,2% (Bourtzi-Hatzopoulou et al., 2003) dan di Polandia, 7,07%, dengan *Candida krusei* isolasi pada 41,33% kasus dan *C. kefyr* dalam 32% kasus (Wawron et al., 2010). Laporan lain menyebutkan prevalensi 1 sampai 4% pada kasus mastitis subklinis, dan sampai 25% pada mastitis klinis, pada peternakan sapi perah. (Wawron et al., 2010; Bourtzi-Hatzopoulou et al., 2003).

Selama beberapa dekade terakhir, telah terjadi peningkatan infeksi yang disebabkan oleh *Candida* (Sartori et al., 2014). Ketika ragi menyerang kelenjar susu, mereka dapat menyebabkan mastitis umum yang tidak parah yang resisten terhadap pengobatan biasa, dan kambuh beberapa hari setelah menyelesaikan pengobatan dan membaik bila tidak ada pengobatan. Mikroorganisme penyebab mastitis yang paling sering adalah *Candida albicans*, meskipun spesies lain telah digambarkan sebagai penyebab mastitis, seperti *Candida krusei*, *Candida parakrusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida guillermondii*, *Candida famata*, *Candida utilis*, *Candida rugosa*, *Candida dieri*, *Candida kefyr* (Costa et al., 1993; Krukowski et al., 2000; Segundo et al., 2011).

* Penulis yang sesuai. Email: hernandezandrade@yahoo.com.

Banyak spesies kandida menghasilkan enzim hidrolitik, toksin dan hemolisin, dapat beradaptasi dengan habitat yang berbeda dan menghasilkan biofilm, yang merupakan komunitas terstruktur yang tertanam dalam matriks ekstraseluler yang umumnya terdiri dari air, karbohidrat, protein, dan heksosamin. (Panizo dan Reviakina, 2001), dan menempel pada permukaan atau mikroorganisme lain (Flemmins et al., 2016). Ini adalah salah satu faktor virulensi terpenting karena memastikan keabadian bakteri di kelenjar susu (Vanderhaeghen et al., 2014).

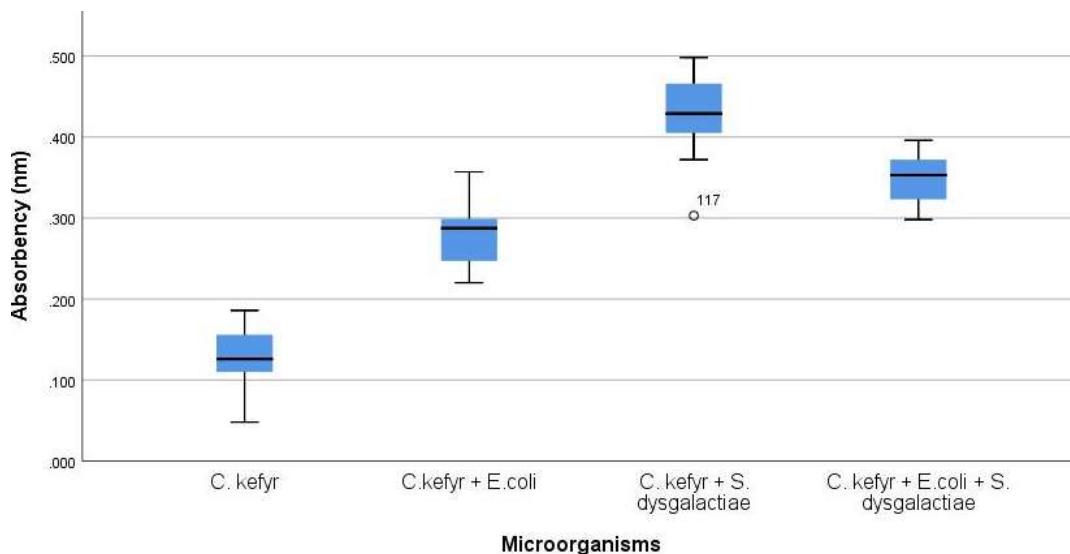
Kemampuan untuk membentuk biofilm dikaitkan dengan proses infeksi dan peningkatan resistensi terapi antijamur (Turkyilmaz dan Kaynarca, 2010). Ragi dapat menghasilkan polisakarida yang membuatnya lebih ganas, agresif dan sulit dihilangkan (Olson et al., 2002; Panizo dan Reviakina, 2001). Dalam kasus *C. albicans* mereka menghasilkan biofilm dalam 40% kasus, sementara jenis lainnya *Candida* menghasilkan biofilm pada 60% kasus (Panizo dan Reviakina 2001).

Escherichia coli merupakan salah satu mikroorganisme lingkungan yang paling sering pada kasus mastitis sapi. Di antara faktor virulensinya adalah toksin, adhesin, dan produksi kapsul. Berulang *e. coli* mastitis dapat memperoleh persistensnya dari produksi biofilm (Gomes et al., 2016). *Streptococcus dysgalactiae* adalah mikroorganisme lain yang sering terjadi pada mastitis klinis dan subklinis sapi yang menghasilkan penentu virulensi seperti fibronektin dan fibrinogen (Gomes et al., 2016), serta, menghasilkan biofilm, yang membuat pemberantasan dari peternakan sapi perah menjadi sulit (Olson et al., 2002). Tujuan dari penelitian ini adalah untuk membandingkan pembentukan biofilm dengan teknik pelat dan tabung, untuk mengetahui interaksi dalam pembentukan film dengan *C. kefyr*, *E. coli* dan *Streptococcus* serta untuk mengetahui kerentanan antimikroba di masing-masingnya.

BAHAN DAN METODE

Sampel

Mikroorganisme yang dianalisis dalam penelitian ini diisolasi dari sampel susu yang diambil dari peternakan sapi perah di Negara Bagian Querétaro México dan dikirim ke CENID Animal Health and Food Safety of the INIFAP Institute. Sampel susu berasal dari sapi dengan mastitis klinis, diunggulkan ke agar McConkey dan agar Darah, dan diinkubasi pada suhu 37 ° C selama 24 jam. Pengamatan jenis dan warna koloni dilakukan, dan apusan diwarnai Gram untuk memverifikasi kemurnian kultur. Setelah keberadaan ragi terdeteksi pada sembilan sampel (kode, A, B, C, D, E, F, G, H, I), mereka diunggulkan dalam Sabouraud Dextrose Agar, dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 hingga 48 jam. . Pada beberapa sampel, selain isolat ragi, ditemukan bakteri Gram-positif dan Gram-negatif. Koloni-koloni ini kemudian dimurnikan, dan diidentifikasi



Gambar 1. Perbandingan absorbansi yang diperoleh dari kelompok mikroorganisme dalam uji kepatuhan pelat.
IBM SPSS Versi 22

E.coli dan *S.dysgalactiae* dibuat dengan pewarnaan Gram dan uji biokimia tradisional menggunakan tabel identifikasi.

Tes biokimia identifikasi ragi

Metodologi yang digunakan adalah yang dijelaskan oleh Castillo (1974).

Fermentasi karbohidrat

Kaldus dasar dengan fenol merah, dengan konsentrasi 1% ditambahkan maltosa, laktosa, dekstrosa atau galaktosa digunakan.

Tes asimilasi karbohidrat

Kaldus fenol merah dengan karbohidrat ditambahkan dalam konsentrasi yang disebutkan sebelumnya, ditambah 1% alkohol etilik absolut digunakan. Tes positif dianggap bahwa media menjadi keruh, membuktikan pertumbuhan ragi.

Identifikasi ragi otomatis

Secara paralel, ragi diidentifikasi dengan peralatan Vitek 2 Systems (bioMérieux) menggunakan kartu identifikasi Automatized Yeast Identification (YST), yang berisi 46 tes biokimia yang menentukan penggunaan karbon dan nitrogen, serta aktivitas enzimatik.

Kerentanan antijamur dengan Vitek 2

Kartu AST-YSO7 digunakan untuk menentukan konsentrasi penghambatan minimum *C. kefir* strain seperti Amfoterisin (0,25 hingga 8 µg/ml), Caspofungin (0,25 hingga 4 µg/ml), Flukonazol (1 hingga 64 µg/ml), Flusitosin (1 hingga 64 µg/ml), Mikafungin (0,06 hingga 4 µg/ml), Vorikonazol (0,12 hingga 8 µg/ml).

Kerentanan terhadap tes antibiotik

Kerentanan antimikroba dari *E.coli* dan *Streptococcus dysgalactiae* strain diperoleh dengan metode Kirby Bauer (Leber et al., 2016).

Biofilm uji tabung

Tes tabung dilakukan secara terpisah untuk *C.kefir*, *E.coli*, *S.dysgalactiae*, serta untuk masing-masing kombinasi dari *C.kefir* dan *E.coli*; *C.kefir* dan *Streptococcus dysgalactiae* (Gambar 1).

Persiapan inokulum

Teknik yang diusulkan oleh Bonilla et al. (2012) digunakan, kaldus soytrypticase diinokulasi dengan segar *Kandida* budaya, dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Setelah diinkubasi, tabung disentrifugasi pada 1000 rpm selama 10 menit. Endapan yang diperoleh dipisahkan dan ditempatkan dalam larutan garam fisiologis dalam tabung untuk sentrifugasi kedua selama 10 menit dengan kecepatan 1000 rpm. Endapan kembali ditangguhkan dalam 3 ml kaldus trypticase kedelai dalam tabung uji polistirene, diinkubasi pada suhu 37 °C selama 48 jam dalam posisi horizontal. Sebagai kontrol pembentukan biofilm positif, *S.aureus* Strain Cowan, yang biasa digunakan sebagai kontrol positif untuk penelitian mastitis, digunakan secara terpisah dan distandarisasi dengan tabung McFarland 0,5. Tabung kontrol negatif adalah satu dengan kaldus trypticase kedelai steril dan satu lagi dengan larutan garam steril. Tabung dicuci tiga kali dengan pH 7,3, larutan penyanga fosfat (PBS), untuk menghilangkan mikroorganisme yang tidak menempel.

Pewarnaan dan membaca

Setelah dicuci, mereka diatur menggunakan etanol absolut selama 5 menit, kelebihannya dihilangkan dan kemudian dibiarkan kering. Setelah kering, diwarnai dengan larutan kristal violet 0,1% selama satu menit dan dibilas dengan air suling untuk menghilangkan noda berlebih. Tabung positif

adalah mereka yang diamati biofilm bernoda ungu; mereka dikategorikan sebagai: (-) tidak terdeteksi, (+) sensitif (keberadaan lemah), (++) kehadiran menengah dan (+++) kehadiran kuat.

Produksi biofilm di piring

Persiapan inokulum

Sebelum mencuci dan mewarnai tabung, 100 μ l biakan yang diinokulasi dalam tabung ditambahkan ke 100 μ l soy trypticase broth untuk uji pembentukan biofilm. Pengujian dilakukan dalam rangkap tiga, menggunakan pelat mikro polistiren dari 96 sumur dasar datar untuk kultur sel, dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C secara aerobik. Sebagai kontrol positif, *S.aureus* Strain Cowan diinokulasi dalam soy trypticase broth pada pengenceran 1:100, dicapai dengan menempatkan 2 μ l inokulum dalam 198 μ l soy trypticase broth. Setelah waktu inkubasi, kaldu dihilangkan, dan sumur pelat mikro dicuci tiga kali dengan PBS; kemudian difiksasi dengan etanol absolut selama 5 menit. Kelebihan etanol dihilangkan, dan pelat dibiarkan mengering selama satu jam.

Pewarnaan dan membaca

Pelat diwarnai dengan larutan kristal violet 0,1% selama 1 menit, dicuci dengan air suling untuk menghilangkan noda berlebih, dan dikeringkan pada suhu kamar. Pelat dibaca menggunakan pembaca pelat mikro ELISA Labsystemsmultiskan Ascent 354, pada panjang gelombang 492 nm. Uji pelat dan tabung dilakukan dalam rangkap tiga.

Analisis statistik

Rata-rata diperoleh dari hasil serapan dari tiga ulangan uji dan uji analisis varians diterapkan (ANOVA); uji perbandingan rata-rata (Tukey) dengan signifikansi $\alpha \leq 0,05$ diterapkan untuk memverifikasi apakah ada perbedaan statistik antara kontrol negatif dan isolat yang sedang dianalisis, serta antara kepatuhan kelompok berikut: *C. kefir*; *C. kefyr + E. coli*; *C. kefyr + S. dysgalactiae*; dan *C. kefyr + E. coli + S. dysgalactiae*. Uji korelasi bivariat Spearman diterapkan pada 99% untuk menentukan apakah ada hubungan antara kepatuhan dalam tabung dan kepatuhan pada piring. Analisis statistik data dilakukan dengan menggunakan program statistik IBM SPSS Statistics 22.0.

HASIL

Identifikasi

Sembilan isolat ragi (A, B, C, D, E, F, G, H, I) mengikuti pola asimilasi biokimia dan karbohidrat yang sama; oleh karena itu, mereka diklasifikasikan sebagai *C. kefir* dengan metode biokimia dan dengan Vitek 2. Dua sampel susu telah *C. kefyr*, *S. dysgalactiae* dan *E. coli*, sedangkan empat sampel susu memiliki *C. kefir* dan *S. dysgalactiae*, dan sisanya, tiga, saja *C. kefir* diperoleh.

Kerentanan terhadap obat antimikroba dan antijamur

S. dysgalactiae menunjukkan pola kerentanan yang sama

terhadap dua belas obat antimikroba yang dianalisis, yang hanya rentan terhadap cefalotin, cefotaxime dan cefuroxime, yang membuktikan tingkat resistensi yang tinggi yang dimiliki oleh strain yang diisolasi (Tabel 1). *E.coli* hanya sensitif terhadap dua antimikroba dari dua belas obat yang diuji: amikasin dan trimetoprim/sulfametoksazol (Tabel 2). Konsentrasi hambat minimum untuk *C. kefir* strain serupa pada sembilan isolat: amfoterisin, 0,25 μ g/ml; caspofungin, 0,25 μ g/ml; flukonazol, 1 μ g/ml; flusitosin, 1 μ g/ml; micafungin, 0,06 μ g/ml; vorikonazol, 0,12 μ g/ml, dan karenanya tergolong sensitif terhadap obat ini.

Tes tabung pembentukan biofilm

Tes tabung positif dalam semua kasus; namun demikian, enam isolat dari *C. kefir* menyajikan kepatuhan yang paling jelas bila dibandingkan dengan tiga isolat lainnya dan kontrol negatif. Dalam kasus *E.coli* dan *S.dysgalactiae*, ini juga positif, meskipun kontrol positif *S.aureus* selalu memiliki pembentukan biofilm yang lebih besar.

Pembentukan biofilm di piring

Pertumbuhan mikroorganisme diamati di semua sumur, terutama di mana kontrol positif ditempatkan. Ketika terkena pewarnaan ada beberapa tingkat pembentukan biofilm di semua sumur. Ada perbedaan statistik yang signifikan ($P \leq 0,05$) antara tujuh strain ragi, yaitu *E.coli* dan *S.dysgalactiae* strain, serta kontrol positif, jika dibandingkan dengan kontrol negatif. Oleh karena itu, dapat dikatakan bahwa mikroorganisme tersebut memiliki kemampuan untuk membentuk biofilm pada plat. Selanjutnya ragi yang tersisa tidak memiliki perbedaan yang signifikan dengan kontrol negatif.

Mengenai interaksi antara *C. kefir* dan *E. coli*, *C. kefyr* dan *S. dysgalactiae*, dan *C. kefir*, *E. coli* dan *S. dysgalactiae*, mereka semua memiliki perbedaan yang signifikan secara statistik dengan kontrol negatif. Demikian pula, absorbansi yang diamati secara statistik lebih besar daripada yang terlihat pada sampel yang hanya memiliki *C. kefir* (Tabel 3).

Perbedaan signifikan ditemukan ketika membandingkan absorbansi yang diperoleh dari inokulum yang terkandung *C. kefir* dan yang diperoleh dari yang mengandung dua atau tiga mikroorganisme dengan kontrol negatif, serta ketika membandingkan inokulum campuran dengan yang hanya memiliki *C. kefir* (Tabel 4 dan Gambar 1).

Dalam tes tabung, hasil menunjukkan bahwa semua isolat memiliki beberapa tingkat pembentukan biofilm. Sebagian besar sampel khamir, memiliki pembentukan film lemah hingga sedang (+ hingga ++), sedangkan sampel yang mengandung lebih dari satu mikroorganisme memiliki nilai pembentukan biofilm sedang (++) ; semua kontrol positif dalam semua

Tabel 1.Hasil uji kepekaan terhadap obat antimikroba yang dilakukan pada isolat *S.dysgalactiae* berhubungan dengan ragi.

Antimikroba	SEBUAH	B	C	D	e	F
Cefalotin		S	S	Saya	S	S
Ceftazidime		R	R	R	R	R
Eritromisin		Saya	Saya	R	R	R
Ampisilin		R	R	R	R	R
Tetrasiklin		R	R	R	R	R
Trimethoprim/Sulfamethoxazole		S	Saya	Saya	Saya	Saya
Cefotaxime		S	S	S	S	S
Gentamisin		R	R	R	R	R
Cefuroxime		S	S	S	S	S
Pefloksasin		Saya	R	R	R	R
Dicloxacillin		R	R	R	R	R
Penisilin		R	R	R	R	R

S=Sensitif, I= Menengah, R=Tahan. IBM
SPSS Versi 22

Meja 2.Hasil uji kepekaan terhadap obat antimikroba yang dilakukan pada isolat *E.coli* berhubungan dengan ragi.

Antimikroba	SEBUAH	B
Cefalotin		R
Kloramfenikol		R
Ceftriaxone		R
Ampisilin		R
Amikasin		S
Trimethoprim/Sulfamethoxazole		S
Cefotaxime		R
Gentamisin		R
Netilmisin		R
Pefloksasin		R
Karbenisilin		R
Nitrofurantoin		R

S=Sensitif, I= Menengah, R=Tahan. IBM
SPSS Versi 22

Tabel 3.Daya serap diperoleh pada uji kepatuhan pelat.

Mikroorganisme	SEBUAH	B	C	D	e	F	G	H	Saya	(+) CTRL	(-) CTRL
<i>C.kefir</i>	Berarti	0,171	0,177*	0,079	0,132*	0,156*	0,249*	0,114	0,162*	0,164*	1,041*
	+/- SD	0,054	0,055	0,021	0,029	0,041	0,313	0,048	0,030	0,071	0,129
<i>C.kefir +</i>	Berarti	0,336*	0,318*	0,250*	0,317*	0,288*	0,307*	0,290*	0,289*	0,307*	1,207*
	+/- SD	0,035	0,061	0,030	0,031	0,040	0,071	0,058	0,020	0,030	0,103
<i>E.coli</i>	+/- SD	0,035	0,061	0,030	0,031	0,040	0,071	0,058	0,020	0,030	0,103
	Berarti	0,443*	0,382*	0,437*	0,439*	0,410*	0,463*	0,447*	0,430*	0,450*	1,147*
<i>S.dysgalactiae</i>	+/- SD	0,025	0,040	0,045	0,037	0,020	0,029	0,047	0,018	0,033	0,141
	Berarti	0,267*	0,256*	0,228*	0,247*	0,244*	0,267*	0,271*	0,276*	0,245*	1,087*
<i>E.coli +</i>	+/- SD	0,008	0,034	0,028	0,035	0,032	0,022	0,026	0,026	0,032	0,107
	<i>S.dysgalactiae</i>										

*Berbeda nyata dengan kontrol negatif ($p \leq 0,05$). IBM
SPSS Versi 22

Tabel 4.Perbandingan serapan yang diperoleh berdasarkan kelompok mikroorganisme, dalam uji kepatuhan pelat.

Mikroorganisme	Absorbansi
Kontrol Negatif	0,063 +/- 0,06
C.kefir	0,129 +/- 0,03 _{A,C,D} dan E
C.kefyr + E.coli	0,278 +/- 0,04 _{A,B,D} dan E
C. kefyr + S. dysgalactiae	0,432 +/- 0,03 _{A,B} dan C
C. kefyr + S. dysgalactiae + E. coli	0,349 +/- 0,02 _{A,B} dan C

Huruf yang berbeda menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p \leq 0,05$) IBM SPSS Versi 22

Tabel 5.Uji korelasi Spearman untuk menentukan hubungan antara uji tabung dan pelat terhadap pembentukan biofilm.

		Serap	Tabung
Rho Spearman	Serap ($p \leq 0,01$)	Korelasi Koefisien Sig. (2-ekor)	1.000 . 0,689**
		N	54 54
	Tabung ($p \leq 0,01$)	Korelasi Koefisien Sig. (2-ekor)	0,689** 1.000 0,002 .
		N	54 54

* *Uji korelasi dengan keyakinan ($p \leq 0,01$).
IBM SPSS Versi 22

pengulangan menunjukkan nilai kepatuhan yang kuat (+++). Saat membandingkan kedua metode untuk menentukan pembentukan biofilm, uji korelasi bivariat Spearman menghasilkan Rho sebesar 0,689 (Tabel 5).

DISKUSI

Itu *C.kefir*strain diisolasi dari kasus mastitis sapi, menunjukkan kapasitas pembentukan biofilm pada permukaan plastik; namun demikian, tidak banyak informasi yang tersedia tentang pembentukan biofilm oleh mikroorganisme ini ketika berasal dari strain asal hewan. Sebagian besar informasi yang ada diperoleh dengan strain asal manusia (Bonilla et al.,2012; Hernandez et al., 2010).

Namun, hasil yang ditemukan oleh Radford et al. (1998) pada strain yang berasal dari manusia, dapat diekstrapolasi di mana variasi tertentu dapat terlihat jelas dalam pembentukan biofilm pada permukaan material plastik yang berbeda. Berbagai tingkat pembentukan biofilm dalam uji tabung, di mana tiga isolat ragi memiliki tingkat pembentukan biofilm yang lebih rendah jika dibandingkan dengan yang lain, sesuai dengan hasil uji pelat produksi biofilm, di mana strain ini tidak memiliki perbedaan yang signifikan dengan yang negatif.

kontrol. Hal ini dapat dikaitkan dengan pertumbuhan yang tidak teratur dari *C.kefir*strain, yang lebih jelas di zona tertentu dalam tabung maupun di piring, dan pada gilirannya, dapat dikaitkan dengan metode penyemaian atau hanya dengan perilaku alami ragi, seperti yang dijelaskan oleh Vasilas dan Molina (1992).

Fakta bahwa ada perbedaan yang signifikan dalam pembentukan biofilm dalam sampel di mana ragi digabungkan dengan bakteri penghasil biofilm, bisa menjadi indikasi bahwa, jika mikroorganisme ini ditemukan bersama selama infeksi intramammary, mungkin membuat penyakit menjadi sulit. untuk mengobati karena komplikasi yang berkaitan dengan produksi biofilm oleh mikroorganisme seperti infeksi kronis dan resistensi terhadap antimikroba.

Interaksi antara mikroorganisme penghasil biofilm dapat bersifat antagonis, mutualistik atau komensal (Chaves et al., 2007; Burmølle et al.,2006).Sebuah sinergi dalam produksi biofilm ditemukan ketika isolat dari *C. kefyr*, *E. colida* dan *S.dysgalactiae* digabungkan, karena absorbansi meningkat secara signifikan. Karena nilai atau Rho mencapai 0,689 dalam uji korelasi Spearman, dapat disimpulkan dengan keyakinan tinggi ($p \leq 0,01$) bahwa ada korelasi yang baik antara uji pembentukan biofilm yang dilakukan dalam tabung dan yang dilakukan dalam pelat.

Nampaknya peningkatan penggunaan antibiotik selama ini

beberapa tahun, telah berkontribusi pada peningkatan kejadian mastitis mikotik. Telah disarankan bahwa ragi atau jamur berkembang biak selama terapi antibiotik, dirangsang oleh eliminasi flora bakteri antagonis dan pengurangan vitamin A dalam jaringan kelenjar susu (Wawron et al., 2010; Costa et al., 1993). Mastitis mikotik dianggap mastitis lingkungan, terutama disebabkan oleh ragi *Kandida* genus (Watt, 1988).

Türkyilmaz dan Kaynarca (2010), diisolasi dari total 339 sampel susu, 12,1% ragi, 36,6% di antaranya adalah *C. krusei*, 7,3% *C. kefir*, dan 4,9% *C. guilliermondii*. Selanjutnya, yang terakhir mereka melaporkan bahwa 36,6% dari mereka ada pembentukan biofilm, serta dalam 7 strain *C. krusei* dan dalam 4 dari *Candida kefir*.

Vinitha dan Ballal (2007) melaporkan bahwa produksi biofilm lebih jarang dilakukan *Candida albicans* (42,9%) sedangkan jenis lainnya *Candida* menghasilkan lebih banyak, hingga 63,4%. Studi yang dilakukan di Lublin, Polandia, mengisolasi ragi pada 9,6% dari 604 sampel susu, yang paling dominan adalah ragi *C. kefir* dengan 24,1% (Krukowski et al., 2000).

Pada sampel dari kelenjar susu dengan mastitis subklinis, 9,92% dari 383 sampel memiliki *Candida*, mengidentifikasi 15 spesies yang berbeda. Isolasi yang paling sering adalah *C. albicans* 13,15% (5/38) dan *C. krusei* (7,89%; 3/38). Pada 379 sampel susu kasus mastitis klinis, isolat yang paling sering adalah *C. krusei* (40,24%), sedangkan lainnya *Candida* jenis, *C. kefir* di antara mereka, memiliki frekuensi 1,7% (Ksouri et al., 2015).

Menurut studi oleh Wawron et al. (2010) peningkatan penggunaan antibiotik dalam beberapa tahun terakhir merupakan faktor kunci yang berkontribusi terhadap tingginya insiden ragi di kelenjar susu seperti yang mereka tunjukkan. *Candida* spp. adalah agen etiologi yang paling sering diisolasi pada mastitis mikotik pada sapi, sedangkan spesies yang paling banyak termasuk *C. krusei* dan *C. kefir*. Ada perbedaan besar dalam laporan di seluruh dunia tentang isolasi ragi dalam kasus mastitis sapi (Türkyilmaz dan Kaynarca, 2010).

Milanov dkk. (2014) mempelajari sensitivitas terhadap obat antijamur dan menemukan bahwa dua isolat dari *C. kefir* menunjukkan resistensi terhadap nistatin, yang biasa digunakan untuk mengobati mastitis ragi. Isolat lain telah menunjukkan resistensi terhadap flukonazol dan Flusitosin, yang biasa digunakan dalam pengobatan infeksi pada manusia (Hassan et al., 2018; Ochiuzzi et al., 2014). Sebaliknya, dalam penelitian ini ragi yang diisolasi sensitif terhadap obat antimikotik yang diuji.

Kesimpulan

Relevansi kapasitas *C. kefir* strain untuk membentuk biofilm dalam penelitian ini terletak pada implikasi sekunder, karena keberadaannya dapat mencakup adsorpsi mikroorganisme lain dan dengan demikian membentuk perlindungan ketika

dihadapkan dengan agen antimikroba dan / atau antijamur. Efek ini diverifikasi dalam penelitian ini, dengan adanya *S. dysgalactiae* dan *E. coli* terkait dengan *C. kefir*, dalam kasus mastitis klinis.

Kami menyimpulkan bahwa *C. kefir* mampu membentuk biofilm pada bahan plastik, meskipun tidak sekuat yang dihasilkan oleh mikroorganisme lain seperti beberapa *S. aureus* strain, yang kemudian dapat diubah menjadi sumber infeksi jika melekat pada bahan pembuat peralatan pemerasan mekanis. Situasi ini dapat menimbulkan kasus mastitis di mana keberadaan ragi ini dipersulit dengan adanya mikroorganisme lain seperti *S. dysgalactiae* atau *E. coli*, di antara yang lain.

Hubungan yang baik ditemukan antara uji pelat dan tabung untuk pembentukan biofilm, dan oleh karena itu tabung dapat digunakan sebagai indikator pembentukan biofilm dengan *C. kefir* pada permukaan plastik.

Demikian juga, penanganan yang tepat dari proses infeksi kelenjar susu adalah penting, karena penemuan mikroorganisme yang sangat resisten terhadap sebagian besar agen antimikroba yang digunakan secara rutin membuktikan penggunaan obat tersebut secara sembarangan, dan oleh karena itu dianjurkan untuk menggunakan uji kepekaan dalam semua program pengendalian mastitis di peternakan sapi perah.

KONFLIK KEPENTINGAN

Para penulis belum menyatakan adanya konflik kepentingan.

PENGAKUAN

Para penulis berterima kasih kepada INIFAP atas sumber keuangan yang diberikan: SIGI 1317933918

REFERENSI

- Ávila TS, Gutiérrez Ch AJ (2018). Producción de leche con ganado bovino. 3a edición. México AMMVEB, AC ISBN 9786074480153.
- Bonilla RY, Moreno MV, Muñoz HB, Palma CM (2012). Kepatuhan *vitro* de *Candida albicans* en tres diferentes condicionadores de tejidos usados en prostodoncia total. Revista Odontológica Mexicana 16(1):40-45.
- Bourtzi-Hatzopoulou E, Zdragias A, Petridou E, Filiosis GT (2003). Ragi sebagai agen penyebab mastitis sapi di Yunani. Jurnal Masyarakat Kedokteran Hewan Hellenic 54(2):105-110.
- Burmølle M, Webb JS, Rao D, Hansen LH, Sorensen JS, Kjelleberg S (2006). Peningkatan pembentukan biofilm dan peningkatan resistensi terhadap agen antimikroba dan invasi bakteri disebabkan oleh biofilm multispecies sinergis. Mikrobiología Terapana y Lingüística 72(6):396-3923.
- Castillo TE (1974). Algunos aspectos bioquímicos sangre diperlukan para la identificación de especies de *Candida*. Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas 3(1):41-66.
- Chaves SL, Somoes M, Joao VM (2007). Interacción biofilm entre generas bacterianas que se diferencian de acuerdo a su resistencia a los agentes de desinfección. Revista Brasileira de Microbiologia 40(3):619-620.

- Costa EO, Gandra CR, Pires MF, Coutinho SD, Castilho W, Teixeira M (1993). Survei mastitis mikotik sapi pada peternakan sapi perah di Negara Bagian. Mikopatologia 124(1):13-17.
- De Casia dos Santos R, Marin JM (2005). Isolasi dari *Kandida* spp dari susu sapi mastitic di Brazil. Mycopathologia 159(2):251-253.
- Flemming HC, Wingender J, Szewzyk U, Steinberg P, Beras SA, Kjelleberg S (2016). Biofilm: bentuk kehidupan bakteri yang muncul. Ulasan Alam: Mikrobiologi 14(9):563-575.
- Gomes F, Saavedra MJ, Henriques M (2016). mastitis sapi penyakit / patogenitas: bukti peran potensial biofilm mikroba. Patogen dan Penyakit 74(3):ftw006
- Hassan Y, Alhassan AS, Tian Lung TL (2018). *kandida albikan* infeksi kaki interdigital: Sebuah laporan kasus menyoroti pentingnya pengujian kerentanan antijamur. Jurnal Penelitian Mikrobiologi Afrika 12(36):889-896.
- Hernandez SSE, Gonzalez RAS, Rueda-Gordillo F (2010). Capacidad de adhesión de cepas de *kandida albikana* isoladas de una población de niñospotadoraessanos. Revista Odontológica Latinoamericana 2(2):33-37.
- Krukowski H, Tietze M, Majewski T, Różanski P (2000). Survei dari mastitis ragi pada peternakan sapi perah di peternakan kecil di wilayah Lubrin, Polandia. Mikopatologia 150(1):5-7.
- Ksouri S, Djebir S, Hadef Y, Benakhla A (2015). Survei sapi mastitis mikotik dalam berbagai status kelenjar susu di dua wilayah timur laut Aljazair. Mycopathologia 179(3-4):327-31.
- Leber A (2016). Buku Pedoman Prosedur Mikrobiologi Klinis 4th(2016) edisi. ASM Press.
- Milanov D, Prunic B, Velhner M, Bojkovski J (2014). Diagnosis ragi mastitis pada sapi perah. Lucrari Stiintificemedicina Veterinara 47(1) Timisoara.
- Ochiuzzi ME, Arechavala A, Guelfand L, Maldonado I, Soloaga R y Red de Micología CABA, Argentina (2014). Evaluasi daya tahan AST-YSO1 dari sistem Vitek 2 meningkatkan kepekaan terhadap antiinfeksi levaduras del género *Kandida*. Revista Argentina de Microbiología 46(2):111-118.
- Olson ME, Ceri H, Morck DW, Buret GA, Baca RP (2002). Biofilm bakteri: pembentukan dan kerentanan komparatif terhadap antibiotik. Penelitian Kedokteran Hewan Jurnal Kanada 66(2):86-92.
- Panizo MM, Reviakina V (2001). Adhesinas y receptores involucrados dan fenomena kepatuhan *kandida albikana* las células epiteliales. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología 21(1):05-11.
- Radford DR, SP Manis, Challacombe SJ, Walter JD (1998). Ketaatan dari *Candida albicans* untuk bahan dasar gigi tiruan dengan permukaan akhir yang berbeda. Jurnal Kedokteran Gigi 26(7):577-583.
- Romero J, Benavides E, Meza C (2018). Menilai dampak keuangan mastitis subklinik di Colombian Dairy Farms. Perbatasan dalam Ilmu Kedokteran Hewan. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00273> Sartori LCA, Santos RC, Marin JM (2014). Identifikasi *Kandida* spesies yang diisolasi dari sapi yang menderita mastitis di empat negara bagian Brasil. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia 6(5):1615- 1617.
- Segundo ZC, Cervantes ORA, Ducoing WAE, De la Peña MA, Villa TL (2011). Isolasi ragi dari kelenjar susu sapi di bawah status mastitis berbeda di Dataran Tinggi Meksiko. Revista Iberoamericana de Micología. 28(2):79-82.
- Türkyilmaz S, Kaynarca S (2010). Produksi lendir oleh ragi diisolasi dari sapi mastitis subklinik. Acta Veterinary Brno 79(4):581-586, doi: 10.2754/avb201079040581
- Vanderhaeghen W, Piepers S, Leroy F, Van Coillie E, Haesebrouck F, De Vliegher S (2014). Tinjauan yang diundang: Efek, ketekunan dan virulensi koagulase-negatif *Stafilococcus* spesies yang berasosiasi dengan kesehatan ambing ruminansia. Jurnal Ilmu Susu 97(9):5275-5293.
- Vasilas A, Molina L (1992). Pengaruh variasi morfologi pada *kandida albikan* adhesi pada gigi tiruan akrilik *in vitro*. Arsip Biologi Lisan 37(8):613-622.
- Vinitha M, Ballal M (2007). Biofilm sebagai penanda virulensi pada *Kandida* diisolasi dari darah. Jurnal Dunia Ilmu Kedokteran 2(1):46-48. Watts JL (1988): Agen etiologi mastitis sapi. Dokter hewan Mikrobiologi 16(1):41-66.
- Wawron W, Bochniarz R, Piech T (2010). Mastitis ragi pada sapi perah di bagian timur tengah Polandia. Buletin Institut Kedokteran Hewan di Pulawy 54(2):201-204.

Efek dari *Plectranthus scutellarioides* (L.) Ekstrak Daun sebagai Antibakteri Alami Terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* Terisolasi Dari Sapi Perah dengan Mastitis Subklinis

Farah Shafina Hanum¹, Adiana Mutamsari Witaningrum², Yulianna Puspitasari³

¹Siswa,²Departemen Kesehatan Masyarakat Veteriner,³Departemen Kedokteran Hewan Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga

Penulis yang sesuai:farahshfina@yahoo.com

ABSTRAK

Mastitis merupakan salah satu penyebab rendahnya produksi susu pada sapi perah, dan dapat disebabkan oleh bakteri seperti *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Daun *Plectranthus scutellarioides* (L.) memiliki senyawa antibakteri seperti flavonoid, eugenol, polifenol, steroid, tanin, dan sebagainya. Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratoris yang bertujuan untuk menguji aktivitas antibakteri *P. scutellarioides* (L.) ekstrak daun dengan analisis etanol pro sebagai pelarutnya *E. coli* dan *S. aureus* bakteri yang diisolasi langsung dari sampel susu sapi perah dengan skor CMT (+) 3, dengan mengukur kemampuan inhibisinya yang ditunjukkan dengan adanya zona bening menggunakan metode difusi agar-well. Konsentrasi ekstrak yang diuji adalah 5%, 10%, 20% dan 40%. Hasil uji antibakteri dari *P. scutellarioides* (Ekstrak daun L.) dengan pelarut etanol pa menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap *E. coli* dan *S. aureus* bakteri diisolasi langsung dari sampel susu sapi dengan mastitis subklinis pada konsentrasi tertentu.

Kata kunci: *Plectranthus scutellarioides*(L.), Mastitis, Sapi Perah, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*

Diterima:14-10-2022

Diperbaiki:15-11-2022

Diterima:12-01-2022

PENDAHULUANN

Produk susu perah merupakan produk pangan alami dengan gizi tinggi yang digunakan untuk memenuhi kebutuhan protein hewani manusia. Senyawa penting yang terdapat dalam susu antara lain karbohidrat (laktosa), lemak, vitamin dan mineral (Safitri dan Swarastuti, 2013). Berdasarkan data Ditjen Peternakan dan Kesehatan Hewan tahun 2021, populasi sapi perah 0,5 juta, jumlah kebutuhan susu dalam negeri 4,3 juta ton per tahun, sedangkan produksi susu segar dalam negeri 0,9 juta ton per tahun. , sehingga produk susu dalam negeri hanya menyumbang 22% dari jumlah kebutuhan susu dan sisanya dipenuhi dari impor susu. Peternakan sapi perah di Indonesia didominasi oleh usaha skala kecil dimana peternak rata-rata memiliki 2-4 ekor sapi perah dewasa per keluarga (Surani, 2011). Karena usaha berskala kecil

memiliki pekerja yang terbatas, hal ini mengakibatkan pengelolaan dan pemeliharaan sapi yang kurang baik, sehingga produksi dan kualitas susu menjadi rendah. Peternak memiliki peran penting dalam menjalankan produksi susu, kurangnya pengetahuan tentang manajemen kebersihan dan cara pemerasan yang benar dapat mengakibatkan penyakit pada sapi yang diikuti dengan penurunan produksi susu. Salah satu penyakit yang sering ditemukan pada sapi perah adalah mastitis (Tewari, 2014).

Mastitis adalah penyakit radang kelenjar susu yang disebabkan oleh beberapa faktor, antara lain infeksi bakteri, trauma, dan luka ambing (Tewari, 2014). Mastitis diketahui memiliki 2 jenis penyakit, yaitu mastitis subklinis dan mastitis klinis. Mastitis subklinis adalah jenis yang tidak menunjukkan gejala klinis dan biasanya diketahui melalui pemeriksaan

mastitis, baik dengan California Mastitis Test (CMT) atau tes laboratorium. Sedangkan mastitis klinis menunjukkan gejala klinis berupa pembengkakan dan pengerasan ambing diikuti nyeri dan panas, penurunan fungsi ambing, produksi dan kualitas susu (Nurhayati dan Martindah, 2015). Bakteri penyebab mastitis terbagi menjadi dua kelompok, lingkungan seperti coliform (*Escherichia coli* and *Klebsiella*), pseudomonas, dan *Streptococcus uberis*, serta patogen menular seperti *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus dysgalactiae* dan mereka menyebabkan mastitis subklinis dan klinis akut atau kronis pada inang yang rentan (Garvey, 2019). Pengobatan yang digunakan untuk mastitis umumnya adalah antibiotik seperti streptomisin, ampisilin, kloksasilin, penisilin, dan tetrasiplin, selain itu juga menyebabkan resistensi antibiotik pada bakteri patogen (Yang et al., 2019). Tumbuhan yang bersifat bakteriostatik dapat digunakan untuk pengobatan mastitis pada sapi perah sebagai alternatif pengganti antibiotik karena tidak menyebabkan bakteri menjadi resisten sehingga dapat digunakan dalam jangka waktu yang lama (Radzikowskiet al., 2020).

Plectranthus scutellarioides (L.) Tanaman ini merupakan tanaman hias yang berasal dari keluarga Lamiaceae. *P. scutellarioides*(L.) tinggi tanaman 30-150 cm dengan bentuk daun mirip dengan bentuk hati (Tabalubun, 2013), daunnya juga memiliki lekukan sempit yang terus menerus di kedua ujungnya yang ditopang oleh tangkai daun (Mentari, 2018). Ukuran daunnya panjang 6-12 cm, lebar 5-8 cm, strukturnya berbulu dan tampak seperti beludru, warna daunnya merah marun di bagian tengah, hijau di tepi daun, sedangkan Pangkal daunnya lebar dan membulat, ujungnya lancip (Kalita et al., 2020). *P. scutellarioides*(L.) tanaman mengandung antiinflamasi, antimikroba dan antioksidan, antibakteri

khasiat, serta kemampuan mempercepat penyembuhan luka (Rahmawati, 2018 dalam Utamiet al.,2020), dan juga digunakan sebagai antidiabetes, imunodulator, antihistamin, antihelminthic (Novanti dan Susilawati, 2017). Penelitian ini bertujuan untuk menguji efek antibakteri dari *P. scutellarioides*(L.) daun extract against *S.aureus* dan *E.coli* diisolasi dari sapi perah dengan mastitis subklinis.

METODE

Untuk mengetahui aktivitas antibakteri dari *P. scutellarioides*(L.) ekstrak daun terhadap *E.coli* dan *S.aureus* bakteri diisolasi langsung dari sapi perah dengan mastitis subklinis, penelitian ini menggunakan metode difusi sumur agar dimana adanya zona bening menunjukkan kemampuan *P. scutellarioides*(L.) ekstrak daun untuk menghambat pertumbuhan *E.coli* dan *S.aureus* diisolasi dari sapi perah dengan mastitis subklinis.

Sampel yang digunakan adalah *P. scutellarioides*(L.) daun yang dipilih berdasarkan ciri-ciri : daun segar, tidak berlubang, kotor, jamur atau penyakit lainnya. Sampel bakteri yang digunakan untuk pengujian diisolasi langsung dari susu sapi yang memiliki skor CMT (+) 3. Alat yang digunakan untuk penelitian ini adalah dayung California Mastitis Test(CMT), botol plastik, kotak pendingin styrofoam, autoklaf, inkubator, ose, mikroskop cahaya, pembakar bunsen, blender, cawan petri , jangka sorong, tabung reaksi, timbangan analitik, evaporator, gelas ukur, mikropipet, corong, botol vial, gelas beaker, toples kaca. Sedangkan bahan yang digunakan untuk penelitian ini adalah Bahan penelitian yang digunakan untuk penelitian ini adalah reagen CMT, plat Mannitol Salt Agar (MSA), plat Eosin Methylene Blue Agar (EMBA), cover glass, object glass, crystal violet, larutan Lugol, alkohol 95%, safranin, minyak imersi, H₂O₂ 3%,

plasma darah kelinci, tusuk gigi, air pepton, reagen kovac, kaldu MR/VP, indikator MR, alfa naphtol, KOH 40%, simmons citrate agar, *P. scutellarioides* (L.) daun, pelarut etanol pa, kertas saring, aquadest steril, aluminium foil, serbuk oxytetracycline, serbuk ciprofloxacin, Nutrient Agar (NA), NaCl fisiologis, pelat Mueller Hinton Agar (MHA), dan tip mikropipet.

Prosedur Penelitian

Ada beberapa prosedur untuk penelitian ini. Pertama, pengambilan sampel. Sampel daun diambil dari toko tanaman toga di sekitar Kecamatan Pakal, Surabaya. Sampel susu diambil dari sebuah peternakan di Kecamatan Mulyorejo, Surabaya, setelah dilakukan uji CMT di tempat. Langkah selanjutnya adalah isolasi dan identifikasi bakteri. Sampel susu yang diuji (+) 3 untuk mastitis dengan CMT dikulturkan pada media MSA dan EMBA, kemudian diinkubasi pada suhu 37^oC selama 24 jam. Identifikasi bakteri untuk koloni yang tumbuh pada MSA adalah uji katalase dan koagulase. Identifikasi bakteri untuk koloni yang tumbuh pada EMBA adalah tes IMViC. Pewarnaan Gram juga dilakukan pada kedua koloni.

Langkah selanjutnya adalah ekstraksi daun iler. Daun yang terkumpul dicuci dengan air mengalir sebelum dikeringkan dengan metode pengeringan oven. Haluskan daun menjadi partikel yang lebih kecil menggunakan blender untuk memperluas kontak dan meningkatkan interaksi dengan pelarut (Ningsihet *et al.*, 2017). Masukkan 60 gram simplisia ke dalam toples kaca yang kedap udara, tidak bocor, dan juga dilapisi aluminium foil, kemudian tambahkan pelarut etanol pa sebanyak 225 ml (Mpila *et al.*, 2012). Rendam simplisia dalam pelarut selama 3 x 24 jam dengan sesekali diaduk pada suhu ruang. Setelah 3 hari berlalu, saring *P. scutellarioides* (L.) larutan ekstrak daun, dan pisahkan filtrat dan residunya. Residunya adalah

diremeraseri 1 x 24 jam, kemudian produk akhir diembunkan menggunakan rotary evaporator untuk menguapkan pelarut dalam ekstrak (Kurnijasanti, 2019).

Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan dengan beberapa tahapan. Berbagai konsentrasi dari *P. scutellarioides* (L.) Ekstrak daun R. Br yang akan diuji adalah 5%, 10%, 20%, dan 40%. Mereka dibuat dengan mengencerkan ekstrak di setiap 1 ml larutan CMC (Mpila *et al.*, 2012), seperti di bawah ini:

Tabel 1. Perhitungan berbagai pembuatan konsentrasi ekstrak

Tidak. Ekstrak CMC (gr)	(ml)	Konsentrasi
1. 0,4 gr	1 ml	40%
2. 0,2 gr	1 ml	20%
3. 0,1 gr	1 ml	10%
4. 0,05 gr	1 ml	5%

Larutan stok kontrol positif dengan konsentrasi 5 mg/ml dibuat dengan cara menghancurkan tablet ciprofloxacin 500 mg dalam 100 ml aquades steril, kemudian diambil 1 ml dari stok dan ditambahkan 100 ml aquadest steril sehingga konsentrasinya menjadi 50mg/ml (Hendriana, 2018). Larutan kontrol positif ampicilin dibuat dengan menimbang 50 mg ampicilin dan dilarutkan dengan 100 ml aquadest steril, kemudian dipipet 2 ml larutan tersebut kemudian ditambahkan aquadest steril hingga 10 ml, kemudian dipipet 1 ml larutan tersebut, lagi dan volumenya dibuat hingga 10 ml (Angrainy dan Darwin, 2017). Kontrol negatif yang digunakan adalah aquadest steril.

Pembuatan suspensi bakteri uji dilakukan dengan cara mengkulturkan bakteri tersebut pada Nutrient Agar dan diinkubasi semalam, kemudian bakteri tersebut diencerkan dalam larutan NaCl fisiologis, kemudian kekeruhannya distandarisasi dengan McFarland 0,5 atau setara dengan $1,5 \times 10^8$ CFU/ml agar bakteri sesuai dengan

standar untuk pengujian sensitivitas (Prayoga, 2013). Balurkan suspensi bakteri pada seluruh permukaan Muellen Hinton Agar secara merata (Rif'anet al., 2014). Uji inhibisi dari *P. scutellarioides* (Ekstrak daun L.) menggunakan metode difusi sumuran agar. Gunakan pembolong dengan diameter 6 mm untuk membuat lubang sebelum diisi dengan berbagai konsentrasi *P. scutellarioides* (L.) ekstrak daun: 5%, 10%, 20%, 40%, ampisilin dan siprofloxasin sebagai kontrol positif dan antibiotik standar sebagai pembanding, serta aquadest steril sebagai kontrol negatif; inkubasi pada 37^oC selama 24 jam. Aktivitas antibakteri dari *P. scutellarioides* (L.) ekstrak daun adalah diamati secara visual dan diukur diameter zona bening dengan caliper.

Analisis data

Data yang diambil adalah berbagai ukuran zona hambat yang diamati secara visual dan diukur untuk mengetahui aktivitas antibakteri dari ekstrak tersebut. *P. scutellarioides* (Daun L.) dalam berbagai konsentrasi terhadap bakteri penyebab mastitis selanjutnya akan dijelaskan secara deskriptif.

HASIL DAN DISKUSI

Ekstrak dari *P. scutellarioides* (L.) daun menggunakan pelarut etanol yang merupakan pelarut universal yang mampu melarutkan senyawa polar seperti tanin, flavonoid, dan polifenol senyawa, serta senyawa semipolar seperti alkaloid (Ghani, 2019). Ekstrak produk daun iler yang diperoleh setelah diuapkan seberat 2,30 gram. Warnanya hijau tua dan konsistensinya kental, tidak tumpah saat dituang. Untuk sampel bakteri yang diisolasi dari susu sapi perah dengan skor CMT (+) 3, koloni yang tumbuh pada EMBA tampak hijau metalik, sedangkan koloni yang tumbuh pada MSA tampak kekuningan. Identifikasi bakteri

koloni yang tumbuh pada EMBA dilakukan dengan uji IMViC. Hasil uji indol positif, menunjukkan cincin merah yang menandakan reaksi positif.

Uji MR menunjukkan hasil positif dengan warna larutan menjadi merah. Hasil uji VP negatif karena tidak menunjukkan adanya perubahan warna pada larutan. Hasil uji sitrat pada Simmons Citrate Agar (SCA) menunjukkan reaksi negatif yang ditunjukkan dengan tidak adanya perubahan warna pada agar. Pewarnaan Gram menunjukkan bakteri berbentuk batang yang berwarna merah muda. Sedangkan identifikasi koloni bakteri yang tumbuh pada MSA dilakukan dengan uji koagulase dan katalase. Uji koagulase menunjukkan adanya partikel kecil yang menebal dan halus, sedangkan uji katalase menunjukkan adanya gelembung. Pada pewarnaan Gram, bakteri tampak berbentuk coccus dengan warna keunguan. Semua tes menunjukkan hasil positif.

Metode yang digunakan untuk menguji aktivitas antibakteri ekstrak daun iler pada penelitian ini adalah difusi sumuran agar menggunakan media Muellen Hinton Agar (MHA) dengan empat kali pengulangan untuk meminimalisir kesalahan data pada penelitian. Menurut Nurhayati et al. (2020), metode difusi sumur agar memiliki keunggulan dalam mengukur zona hambat dengan mudah karena bakteri aktif tidak hanya pada permukaan agar tetapi juga aktif di bagian bawah.

Kontrol positif dari penelitian ini adalah ampisilin untuk *S. aureus* dan ciprofloxacin untuk *E. coli* pengujian. Diameter sensitif zona hambat ampisilin terhadap *Staphylococcus spp.* menurut CLSI adalah ≥29 mm, dan ciprofloxacin juga tercatat memiliki kriteria diameter zona hambat yang sensitif terhadap *Enterobacteriaceae* bakteri, yaitu ≥31 mm. Di bawah ini adalah hasil metode difusi sumur agar yang

diameter diukur dengan menggunakan jangka sorong.

Berdasarkan hasil uji difusi sumuran agar terhadap ekstrak daun iler *E.coli* menunjukkan bahwa ekstrak dengan konsentrasi 10%, 20% dan 40% menunjukkan aktivitas antibakteri, sedangkan ekstrak dengan konsentrasi 5% tidak menunjukkan aktivitas antibakteri. Diameter zona hambat terbesar ditunjukkan oleh ekstrak dengan konsentrasi 40% yang memiliki rata-rata zona hambat 9,83 mm. Disusul dengan konsentrasi 20% yang memiliki rata-rata zona hambat 8,69 mm. Zona hambat terkecil ditunjukkan oleh konsentrasi 10% yang memiliki rata-rata zona hambat sebesar 3,905 mm. Kontrol (+) dengan ciprofloxacin memiliki diameter zona hambat sebesar 44,92 mm. Kontrol (-) tidak menunjukkan adanya zona hambat.

Sementara itu, hasil melawan *S.aureus* pada tabel 4.2, ekstrak menunjukkan adanya aktivitas antibakteri pada konsentrasi 40% sedangkan ekstrak konsentrasi 5%, 10%, dan 20% tidak membentuk zona hambat. Konsentrasi 40% memiliki rata-rata zona hambat sebesar 7,315 mm. Kontrol (+) dengan ampicilin menunjukkan zona hambat sebesar 58,12 mm, sedangkan kontrol (-) tidak menunjukkan adanya zona hambat.

Kriteria penilaian kekuatan aktivitas agen antibakteri menurut Davis dan Stout (1971) dalam Rahayu (2019) adalah sebagai berikut:
sebuah. Diameter zona hambat > 20 mm:
a. sangat kuat
b. Diameter zona hambat 10-20 mm: kuat
c. Diameter zona hambat 5-10 mm: sedang
d. Diameter zona hambat < 5 mm: lemah

Berdasarkan hasil uji difusi sumuran agar dan dari kategorisasi di atas, ekstrak daun iler terhadap *S.aureus* bakteri atthe

konsentrasi 40% dapat dikategorikan dalam kemampuan inhibisi sedang. Kontrol (+) dengan ampicilin memiliki daya hambat yang sangat kuat. *E.coli* memiliki zona hambat lemah hingga sedang pada ekstrak 10%, 20% dan 40% jika dibandingkan dengan kontrol (+) yang memiliki daya hambat sangat kuat.

Ekstrak daun iler dengan konsentrasi yang lebih tinggi menghasilkan zona hambat yang lebih besar untuk pertumbuhan bakteri karena adanya perbedaan kadar zat aktif pada masing-masing konsentrasi sehingga mempengaruhi zona hambat atau aktivitas antimikroba dari ekstrak tersebut (Isra, 2018). Semakin tinggi konsentrasi ekstrak maka semakin banyak kandungan senyawa antibakteri aktifnya (Ningtyas, 2010 dalam Lingga *et al.*, 2016). Pada penelitian ini ekstrak dengan konsentrasi 40% yang merupakan konsentrasi tertinggi diuji terhadap *E.coli* menunjukkan diameter zona hambat terbesar dibandingkan konsentrasi 5%, 10% dan 20%. Diameter zona hambat terbesar terhadap *S.aureus* juga dihasilkan oleh ekstrak dengan konsentrasi 40% yang merupakan konsentrasi tertinggi dibandingkan dengan konsentrasi yang lebih rendah.

Senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak etanol daun iler adalah flavonoid, alkaloid dan tanin (Rizal *et al.*, 2018). Flavonoid bekerja dengan cara menghambat sintesis asam nukleat, menghambat fungsi membran sel dan menghambat metabolisme energi (Rijayanti, 2014 dalam Nurhasanah dan Gultom, 2020), tanin menyebabkan denaturasi protein yang menyebabkan gangguan pada metabolisme bakteri (Angelina *et al.*, 2015 dalam Rahayu 2019), alkaloid bekerja dengan cara mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri sehingga menyebabkan lapisan tidak terbentuk sempurna dan menyebabkan kematian sel (Ningsihet *et al.*, 2016 di Nurhasanah dan Gultom, 2020).

Meja 2. Hasil pengujian aktivitas antibakteri dari *P. scutellarioides*(L.) ekstrak terhadap *E.coli*

Konsentrasi	Diameter Zona Penghambatan (mm)				Berarti
	1	2	3	4	
5%	0	0	0	0	0
10%	0	7,98	7,64	0	3.905
20%	9,24	8,92	8,12	8,48	8,69
40%	11,64	9,12	8,84	9,72	9,83
Kontrol (+) Ciprofloxacin			44,92		
Kontrol (-)			0		

Tabel 3. Hasil pengujian aktivitas antibakteri dari *P. scutellarioides*(L.) ekstrak terhadap *S.aureus*

Konsentrasi	Diameter Zona Penghambatan (mm)				Berarti
	1	2	3	4	
5%	0	0	0	0	0
10%	0	0	0	0	0
20%	0	0	0	0	0
40%	7,14	7,24	7,22	7,66	7.315
Kontrol (+) Ciprofloxacin			58,12		
Kontrol (-)			0		

Hasilnya juga menunjukkan hal itu *E.coli* lebih sensitif terhadap larutan ekstrak daun iler lebih dari *S.aureus*. Menurut Radji (2011) dalam Mpila et al. (2012), bakteri gram negatif memiliki lapisan peptidoglikan yang tipis, sedangkan bakteri gram positif memiliki lapisan peptidoglikan yang tebal. Jatuh tempo ke itu perbedaan struktur dinding sel, bakteri gram negatif lebih sensitif terhadap guncangan fisik seperti pemberian antibiotik atau agen antibakteri lainnya dibandingkan dengan bakteri gram positif. Dalam studi ini, *E.coli* yang merupakan bakteri Gram-negatif lebih sensitif terhadap ekstrak yang diuji dibandingkan *S.aureus*, yang merupakan bakteri gram positif.

Kontrol positif dengan ampicilin untuk *S.aureus* dan ciprofloxacin untuk *E.coli* menunjukkan hasil yang lebih besar daripada ekstrak daun iler pada berbagai konsentrasi. Hal ini mungkin karena ekstrak herbal memiliki banyak senyawa aktif yang dapat menimbulkan berbagai interaksi yang berpotensi memiliki sifat antagonis

sehingga kurang efektif membunuh bakteri, sedangkan antibiotik hanya memiliki senyawa tunggal (Gupta et al., 2015 di Afdhila et al., 2021). Menurut Ningtyas (2010) dalam Lingga et al. (2015), peningkatan konsentrasi senyawa antibakteri yang terkandung dalam konsentrasi yang lebih tinggi diduga akan meningkatkan penetrasi senyawa antibakteri ke dalam interior sel bakteri yang akan menyebabkan kematian sel, sehingga semakin tinggi konsentrasi maka akan semakin banyak pula kematian sel yang ditimbulkan.. Selain itu kecilnya zona hambat yang dihasilkan oleh larutan ekstrak dapat disebabkan karena pelarut yang digunakan adalah etanol yang merupakan pelarut universal yang dapat melarutkan berbagai senyawa, bahkan yang tidak memiliki aktivitas antibakteri, sehingga komponen antibakteri yang diperoleh tidak maksimal cukup. Ketika konsentrasi ekstrak etanol tinggi, konsentrasi senyawa yang tidak memiliki aktivitas antibakteri juga tinggi, sehingga kemampuan untuk

menekan pertumbuhan bakteri (Sinarsih *et al.*, 2016 dalam Rahayu, 2019).

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa *P. scutellariooides* (Ekstrak daun L.) dengan pelarut etanol pa menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap *E. coli* dan *S. aureus* bakteri diisolasi langsung dari sampel susu sapi dengan mastitis subklinis pada konsentrasi tertentu.

REFERENSI

- Afdhila, ZL, H. Elyani dan A. Yahya.
2021. Pengaruh Kloroform Dan Etil Ekstrak *Salvadora persica* To Inhibition Zone of *Stafilocokus aureus* Dan *Streptococcus mutan*. Jurnal Kedokteran Komunitas, 9(1): 1-14.
- Anggrainy, H. dan AM Darwin. 2017. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Batang Inggu (*Ruta angustifolia*(L.) Pers) Terhadap *Streptococcus mutans*. Majalah Farmasi, vol. 14(2): 31-35. Garvey, M. 2019. Sapi Kronis Mastitis: Bahaya Keamanan Pangan dan Kesehatan Masyarakat. Jurnal Internasional Ilmu Gizi & Pangan, vol 8(5): 001-006.
- Ghani, SN 2019. Analisa Kandungan Kimia Senyawa Non Polar dan Polar Berdasarkan Umur Tanaman Dari Daun Kelapa Sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.) [Skripsi]. Fakultas Farmasi. Universitas Sumatera Utara Medan.
- Hendriana, A. 2018. Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi Dari Ekstrak Metanol Daun *Piper Crocatum* Ruiz & Pav. Terhadap *Staphylococcus aureus* Tahan Ampisilin [Skripsi]. Universitas Sanata Darma Yogyakarta.
- Kalita, H., J. Basumatary, S. Sharmin dan C. Bordoloi. 2020. Studi Bunga dan Anatomi *Plectranthus scutellariooides* (L.) R.Br. (Lamiaceae) Dari Udalguri, Assam, India. Arsip Tumbuhan, vol. 20(2): 5883-5888.
- Kurnijasanti, R. dan Candrarisna, M., 2019. Pengaruh ekstrak batang pisang ambon (*Musa paradisiaca* L.) terhadap regulasi IL-1 β , IL-6 dan TNF- α pada enteritis tikus. *Jurnal Irak Ilmu Kedokteran Hewan*, 33(2), hal.407-413.
- Lingga, AR, U. Pato dan E. Rossi. 2016. Uji Antibakteri Ekstrak Batang Kecombrang (*Nicolaia speciosa* Horan) Terhadap *Staphylococcus aureus* Dan *Escherichia coli*. *JOM Faperta*, 3(1): 1-15.
- Mentari, C. 2018. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Iler (*Plectranthus scutellariooides*(L.) R.Br.) terhadap *Vibrio cholerae* [Karya Tulis Ilmiah]. Politeknik Kesehatan Bandung.
- Mpila, Deby A., Fatimawali dan Wiyono, Erny I. 2012. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Mayana (*Coleus atropurperus*[L] Benth) terhadap Etanol *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* dan *Pseudomonas aeruginosa* secara *In-vitro*. *Farmakon*, 1(1): 13-21.
- Novanti, H. dan Y. Susilawati. 2017. Tinjauan: Aktifitas Farmakologi Daun Iler (*Plectranthus scutellariooides* (L.) R.Br.). *Farmaka*, vol. 15(1): 146-152.
- Nurhasanah dan ES Gultom. 2020. Uji Aktifitas Antibakteri Ekstrak Metanol Daun Kirinyuh (*Chromolaena berbau*) terhadap Bakteri MDR (*Multi Obat Tahan*)

dengan Metode KLT Bioautografi. *Jurnal Biosains*, vol. 6(2): 45-52.

Nurhayati, IS dan E. Martindah. 2015. Pengendalian Mastitis Subklinis melalui Pemberian Antibiotik Saat Periode Kering pada Sapi Perah. *WARTAZOA*, vol 25(2): 065-074.

Prayoga, E. 2013. Perbandingan Efek Ekstrak Daun Sirih Hijau (*Piper sirihL.*) dengan Metode Difusi Disk dan Sumuran Terhadap Tumbuh Bakteri *Staphylococcus aureus* [Skripsi]. Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan. Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah Jakarta.

Radzikowski, D., A. Kalinska, U. Ostaszewska dan M. Golebiewski. 2020. Solusi alternatif antibiotik dalam pengobatan mastitis sapi perah - review. Makalah dan Laporan Ilmu Hewan, vol. 38(2): 117-133.

Rahayu, N. 2019. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Pagoda (*Clerodendrum paniculatum* L.) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Propionibacterium acnes* jerawat, *Stafilocokus aureus* dan *Staphylococcus epidermidis*[Skripsi]. Fakultas Farmasi dan Kesehatan. Institut Kesehatan Helvetia.

Rahmawati, AS dan R.Erina. 2020. Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan Uji Anova Dua Jalur. *OPTIKA: Jurnal Pendidikan Fisika*, vol. 4(1): 54-62.

Rif'an, A., S. Chasbullah, L.P, Juita dan E.Emiati. 2014. Efek Farmakologis Ekstrak Daun Torbangun(*Coleus amboinicusL.*) sebagai Antibakteri dalam Pengobatan Bovine Mastitis secara *Di Vitro*[Laporan Akhir]. Institut Pertanian Bogor.

Rizal, NM, Nurhaeni, A. Ridhay. 2018. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Mayana (*Coleus atropurpureus*[L Benth) Tingkat Berdasarkan Kepolaran Pelarut.*Kovalen*,4(2): 180-189.

Safitri, MF dan A.Swarastuti. 2013. Kualitas Kefir Berdasarkan Konsentrasi Kefir Grain. *Jurnal Aplikasi Teknologi Pangan*, vol. 2(2):87-91.

Surani, S. 2011. Strategi Pengembangan Usaha Ternak Sapi Perah (Studi Kasus di Desa Sukorejo, Kecamatan Musuk, Kabupaten Boyolali). Fakultas Pertanian. Universitas Sebelas Maret. Tabalubun, EM 2013. Efek Analgesik Infusan Daun Iler (*Coleus atropurpureus*L. Benth) dengan Metode Rangsang Kimia pada Mencit Betina [Skripsi]. Fakultas Farmasi. Universitas Sanata Dharma.

Tewari, A. 2014. Mastitis Sapi: An penyakit sapi perah yang penting. *Tukang Susu India*, 62-5.

Utami, NF, SM Nurdyanti, Sutanto, U.Suhendar. 2020. Pengaruh Berbagai Metode Ekstraksi Pada Perawatan Kadar Flavonoid Ekstrak Etanol Daun Iler (*Plectranthus scutellarioides*). Fitofarmaka Jurnal Ilmiah Farmasi, vol. 10(1): 76083. Yang, WT, CY Ke, WT Wu, RP Lee dan YH Tseng.2019. Pengobatan Efektif Bovine Mastitis dengan Intramammary Infusion of *Angelica dahurica* dan *Rhem resmi*Ekstrak. Pengobatan Pelengkap dan Alternatif Berbasis Bukti, vol. 2019: 1-8.

Analisis resistensi antimikroba dan korelasi genetik *Escherichia coli* pada mastitis sapi perah

Ke Li, Mingyuan Hou, Lin Zhang, Mengyue Tian, Ming Yang, Li Jia, Yanyan Liang, Dongmin Zou, Ruonan Liu, Yuzhong Ma

Kolese Kedokteran Hewan, Universitas Pertanian Hebei,
Baoding, Hebei 071001, Tiongkok
dkma@hebau.edu.cn

Diterima: 23 Maret 2022 Diterima: 28 September 2022

Abstrak

Pengantar: *Escherichia coli* adalah patogen lingkungan yang tersebar luas yang sering menyebabkan mastitis sapi perah. Bakteri ini sangat mampu memperoleh resistensi antimikroba, yang dapat berdampak parah pada keamanan pangan hewan dan kesehatan manusia. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menyelidiki resistensi antimikroba dan korelasi genetik *E.coli* dari kasus mastitis sapi perah di Cina utara. **Bahan dan metode:** Empat puluh strain *E.coli* dari 196 sampel susu mastitis dikumpulkan, kerentanan terhadap 13 antibiotik umum dan prevalensi gen resistensi diuji pada strain ini, dan karakteristik genetik diidentifikasi dengan pengetikan urutan multilokus. **Hasil:** Hasil penelitian menunjukkan bahwa sebagian besar isolat resisten terhadap berbagai obat (MDR) (75%), dan tingkat resistensi terhadap cefazolin, trimethoprim-sulfamethoxazole dan ampicilin berturut-turut adalah 77,5%, 55,0%, dan 52,5%. Gen perwakilan dari isolat adalah *aadA* (62,5%) dan *tetB* (60,0%). Pengetikan urutan multilokus menunjukkan 19 jenis urutan (ST) yang berbeda dan 5 kompleks klon (CC) dalam 40 isolat, terutama diwakili oleh ST10 dan CC10. Strain dari ST atau CC yang sama menunjukkan tingkat keterkaitan genetik yang tinggi, tetapi karakteristik resistensi antimikroba sangat berbeda. **Kesimpulan:** Paling *E.coli* isolat dalam penelitian adalah strain MDR. Beberapa galur dari ST atau CC yang sama menunjukkan karakteristik resistensi yang beragam terhadap antimikroba biasa. Karena itu, *E.coli* dari mastitis sapi perah di Cina utara harus diselidiki untuk menjelaskan resistensi antimikroba dan genotipe.

Kata kunci: *Escherichia coli*, karakteristik molekuler, resistensi antimikroba, korelasi genetik, mastitis sapi perah.

Pengantar

Mastitis sapi perah adalah penyakit yang umum di lebih dari satu benua dan menyebabkan penurunan produksi dan kualitas susu, yang menyebabkan kerugian ekonomi yang signifikan di industri susu (36). *Escherichia coli* adalah patogen mammae yang penting di lingkungan peternakan sapi perah dan terkait erat dengan gejala inflamasi yang parah (15). Saat ini antibiotik banyak digunakan untuk mencegah dan mengobati mastitis sapi perah. Di Amerika Serikat, diperkirakan lebih dari 80% dari total volume pemberian antibiotik digunakan dalam kegiatan produksi hewan (14). Meskipun penggunaan antimikroba biasanya membawa efek positif, masalah resistensi antimikroba (AMR) juga muncul (18). Sebuah studi nasional dilakukan di Cina untuk menentukan tingkat AMR pada patogen mastitis umum (termasuk *E.coli*) menginfeksi

peternakan sapi perah dan penelitian menunjukkan peningkatan prevalensinya (9). Resistensi antimikroba mengurangi tingkat kesembuhan mastitis sapi dan menimbulkan ancaman besar bagi kesehatan masyarakat dan kesejahteraan hewan (42).

Bakteri resisten antimikroba sering memiliki gen resistensi antibiotik, yang terbukti menjadi faktor pendorong resistensi obat (39). Bakteri ini dapat menyebar di antara inang yang berbeda, yang mentransduksi gen resistensi antibiotik menjadi strain yang mungkin dalam beberapa kasus sudah memiliki resistensi obat tertentu, yang menyebabkan munculnya bakteri multi-drug-resistant (MDR) (35).

Sebagai populasi berstruktur klon, *E.coli* diklasifikasikan ke dalam kelompok filogenetik yang berbeda dan kompleks klon (CCs) dengan mengetik urutan multilocus (MLST) (23). Dengan membandingkan catatan urutan basis data dengan hasil MLST, gen housekeeping spesifik dari *E.coli* diindikasikan untuk menunjukkan ST yang berbeda; perbandingan seperti itu dianggap sebagai pengetikan molekuler yang andal

MAJALAH EDISI 10 TAHUN 2022, DESEMBER 2022

© 2022 K. Li dkk. Ini adalah artikel akses terbuka yang didistribusikan di bawah lisensi Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>)

metode untuk mengeksplorasi korelasi genetik populasi mikroba (24). Investigasi epidemiologi baru-baru ini menunjukkan bahwa resistensi antibiotik dari *E.coli*/strain menunjukkan keragaman dalam populasi mikroba yang berbeda. Ini juga membawa lebih banyak tantangan untuk pencegahan dan pengobatan mastitis sapi perah di klinik hewan (32). Dalam menghadapi masalah resistensi antibiotik yang berkembang dan potensi ancaman terhadap kesehatan manusia, perlu dilakukan analisis resistensi antibiotik dari berbagai *E.coli*/populasi. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk memahami keadaan resistensi antimikroba saat ini dan karakteristik genetik *E.coli*/strain dari mastitis sapi perah dan untuk memberikan informasi yang berguna untuk penggunaan rasional antibiotik di klinik.

Bahan dan metode

Pengambilan sampel dan *E.coli*/isolasi. Antara Juni 2019 dan Oktober 2021, 196 sampel susu mastitis dikumpulkan dari berbagai peternakan sapi perah yang berlokasi di Xushui, Qingyuan, Quyang, dan Mancheng di Tiongkok utara. Kriteria yang mendefinisikan mastitis klinis adalah nyeri lokal di daerah kelenjar susu disertai dengan tanda peradangan yang parah atau umum, termasuk pembengkakan ambing, nyeri saat disentuh, demam, dan depresi (30, 40). Mengikuti konvensi, puting didesinfeksi dengan tingtur yodium 2% dan etanol 75% dan tiga aliran awal dicabut. Sampel susu segera dikumpulkan secara aseptik dalam tabung steril. Sampel diletakkan di atas es dan dikirim ke laboratorium dalam waktu 4 jam. Volume susu 10 µL dikultur secara aerobik pada suhu 37 °C selama 12 jam dalam agar darah (Aobox, Beijing, China) dengan 5% darah domba. Identifikasi utama dari *E.coli*/isolat berdasarkan karakteristik pewarnaan Gram dan pertumbuhan pada Eosin-Methylene Blue (EMB) Agar (Solarbio, Beijing, China). 16S rDNA dari semua isolat diamplifikasi dalam PCR menggunakan primer universal 27F (5'-AGAGTT TGATCMTGGCTAG-3') dan 1492R (5'-TACGGY TACCTGTTACGACTT-3') (37). Prosedur reaksi adalah sebagai berikut: 300 detik pada 95 °C diikuti oleh 35 siklus 30 detik pada 95 °C, 30 detik pada 57 °C dan 60 detik pada 72 °C. Produk PCR diurutkan oleh Shanghai Sangon Biotech Co., Ltd (China) dan dibandingkan dengan urutan yang dicatat di GenBank. Yang dikonfirmasi *E.coli*/isolat disimpan dalam gliserol steril 25% pada suhu -80 °C.

Uji kepekaan antimikroba *E.coli*/isolat.

Kerentanan terhadap agen antimikroba ditentukan dengan metode Kirby-Bauer seperti yang dijelaskan oleh pedoman Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) (11). Isolat yang dikonfirmasi dari *E.coli*/diuji untuk kerentanan terhadap 13 agen antimikroba yang biasa digunakan di Cina. Persiapan termasuk beta-laktam, aminoglikosida, makrolida, tetrasiiklin, sulfonamida dan kuinolon; pilihannya adalah ampicilin (AMP, 10 µg), amoksisisilin (AMX, 10 µg), ceftriaxone (CRO, 30 µg), cefazolin (CFZ, 30 µg), gentamisin (GEN, 10 µg), streptomisin (STR, 10 µg), neomisin (NER, 30 µg),

amikasin (AMI, 30 µg), eritromisin (EM, 15 µg), doksisiklin (DOX, 30 µg), trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT, 25 µg), ciprofloxacin (CIP, 5 µg) dan enrofloxacin (ENR, 5 µg). Agen antimikroba dibeli dari China Institute of Veterinary Drugs Control. Multidrug resistance (MDR) didefinisikan sebagai resistensi terhadap tiga atau lebih kelas antibiotik. *Escherichia coli* ATCC 25922 digunakan sebagai strain referensi.

Ekstraksi DNA. Koloni tunggal dari biakan bakteri segar pada EMB Agar diambil dan diinokulasi ke dalam 5 mL kaldu Luria-Bertani segar dan diinkubasi dengan pengocokan selama 12 jam. Ekstraksi DNA dicapai dengan menggunakan kit ekstraksi Cepat DNA (Tiangen, Beijing, China) mengikuti instruksi pabriknya. Semua konsentrasi persiapan DNA diukur menggunakan spektrofotometer Nanodrop ND-2000 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) dan disesuaikan menjadi sekitar 100 ng/mL. Ekstrak DNA disimpan pada suhu -20 °C.

MLST dan kelompok filogenetik. Satu pasang primer untuk masing-masing *adk, fumC, gyrB, icd, mdh, purA* dan *recA* gen rumah tangga dirancang menggunakan data dari database MLST publik (<https://pubmlst.org/data>) dan kemudian digunakan dalam PCR (43). Prosedur reaksi adalah sebagai berikut: denaturasi awal pada 94 °C selama 5 menit, 35 siklus denaturasi pada 94 °C selama 45 detik, anil pada suhu yang berbeda selama 45 detik (Tabel 1), ekstensi pada 72 °C selama 60 detik, dan ekstensi akhir pada 72 °C selama 7 menit. Produk diurutkan oleh Shanghai Sangon Biotech Co., Ltd. Urutan gen rumah tangga diproses oleh BioEdit (<https://www.bioedit.com>) untuk mendapatkan nomor gen rumah tangga dan diserahkan ke database online Achtman (<http://enterobase.warwick.ac.uk/species/index/ecoli>) untuk perbandingan. ST masing-masing isolat diperoleh dari database. Sebuah pohon merentang minimum dibangun menggunakan algoritma goeBURST dalam perangkat lunak Phyloviz1.0 (<http://www.phyloviz.net>) (38). Selanjutnya, urutan selanjutnya dipangkas dan digabungkan (3.370 bp) untuk melakukan analisis filogenetik molekuler menggunakan metode kemungkinan maksimum di MEGA 7.0. Bootstrap dengan 1.000 ulangan diterapkan untuk memperkirakan keandalan pohon filogenetik. Pohon itu divisualisasikan dengan perangkat lunak online iTOL (<https://itol.embl.de>) untuk menganalisis distribusi gen resistensi obat dan fenotipe resistensi di *E.coli*/isolat.

Deteksi gen resistensi antimikroba. Gen terdeteksi oleh PCR dengan resistensi terhadap antimikroba berikut: beta-laktam (*blaTEM, blaSHV* dan *blaOXA*), aminoglikosida (*aad(2')*, *aacA4* dan *aadA*), makrolida (*erm(Pita erm(C))*), tetrasiiklin (*tet(A)* dan *tet(B)*), sulfonamida (*sul1* dan *sul2*) dan kuinolon (*qnrB*) (1, 2, 28, 44). Prosedur reaksi PCR adalah sebagai berikut: denaturasi awal pada 94 °C selama 5 menit, 30 siklus denaturasi pada 94 °C selama 30 detik, anil pada suhu yang berbeda selama 30 detik (Tabel 1), ekstensi pada 72 °C selama 30 detik, dan ekstensi akhir pada 72 °C selama 10 menit. Produk PCR divisualisasikan dengan elektroforesis gel agarosa 1%.

Analisis statistik.Uji chi-kuadrat dan koefisien korelasi Pearson digunakan untuk membandingkan korelasi antara resistensi isolat terhadap antibiotik tertentu dan kepemilikan isolat terhadap gen resistensi yang sesuai. Tingkat signifikansi ditetapkan pada $P < 0,05$ untuk prosedur statistik. Semua analisis dilakukan dengan menggunakan SPSS 21.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Hasil

Isolat.Secara keseluruhan, 40 (20,41%) *E.coli* isolat dari 196 sampel susu yang diuji adalah biakan positif. Tingkat isolasi dari *E.coli* di Xushui, Qingyuan, Quyang dan Mancheng adalah 22,22% (16/72), 24,14% (7/29), 17,86% (5/28) dan 17,91% (12/67).

(12/67). **Uji kepekaan antimikroba.**Hasil uji kepekaan diinterpretasikan menurut kriteria CLSI (Tabel 2). Uji kepekaan antimikroba menunjukkan bahwa sebagian besar isolat resisten terhadap CFZ (77,5%), SXT (55,0%) dan AMP.

(52,5%). Sebaliknya, sebagian besar isolat rentan terhadap AMI (95,0%), CIP (82,5%) dan GEN (67,5%). Selain itu, beberapa *E.coli* isolat diklasifikasikan sebagai menengah rentan terhadap EM (52,5%), NER (37,5%), dan ENR (27,5%) (Tabel 2). Untuk analisis, kerentanan menengah dianggap sebagai resistensi (7). Dalam penelitian ini, 29 (72,5%) MDRE.*coli* strain terdeteksi. Profil resistensi antimikroba yang paling umum adalah AMP-AMX-CRO-CFZ-GEN-STR-NER-EM-DOX-SXT-CIP-ENR ($n = 4$, 13,8%). Resistensi terhadap delapan obat antibakteri adalah kejadian resistensi ganda yang paling umum ($n = 6$, 20,7%) (Tabel 3).

Gen resistensi antimikroba.Dalam penelitian ini, 40 galur (100,0%) dari *E.coli* dengan gen resistensi terdeteksi, dan gen yang paling sering terdeteksi adalah gen resistensi aminoglikosida, *aadA* ($n = 25$, 62,5%), gen resistensi tetrasiklin, *tet(B)* ($n = 24$, 60,0%) dan *tet(A)*, ($n = 18$, 45,0%) dan gen resistensi makrolida, *erm(B)* ($n = 16$, 40,0%). Gen resistensi terhadap beta-laktam atau makrolida, *blaTEM* dan *erm(C)*, tidak terdeteksi dalam penelitian ini (Tabel 3).

Tabel 1.Sekuens primer, ukuran produk, suhu anil dan referensi yang digunakan untuk PCR dalam penelitian

Gen	Urutan primer (5'-3')	Ukuran produk (bp)	Anil suhu (°C)	Referensi atau GenBank aksesi no.
<i>blaTEM</i>	ATAAAATTCTTGAAGACGAAA GACAGTTACCAATGCTTAATC	643	53	(25)
<i>blaSHV</i>	TTTGTGCTTCTTACTCGCCTTA GCCAGATCCATTCTATCATGCCTA	198	56	DQ247972
<i>blaOXA</i>	TCAACTTCAAGATCGCA GTGTTTAGAATGGTGA	591	53	(25)
<i>aac(2')</i>	ACTGTGATGGGATAACCGCTC CTCCGTAGCGTTTCAGCTA	482	54	(26)
<i>aacA4</i>	CTTCAGGATGGCAAGTTGGT TCATCTCGTTCTCGCTCAT	286	55	(26)
<i>aadA</i>	CTGGAGGTCACTGCGTGC CCGTGGATTGCCAAAGGTC	274	55	X68089
<i>erm(B)</i>	AAAACTTACCCGCATACCA TTTGGCGTGTTTCATTGCTT	126	53	MN461246
<i>erm(C)</i>	GCTCGTGCATTCTGGGAGT AGCCTAGCAGCCATTCTATC	375	53	GQ483470
<i>tet(SEBUAH)</i>	CGGAGCAGAAACAAGAAAGCG GGATCAGGACCGGATACACCAT	345	57	(26)
<i>tet(B)</i>	CATTAATAGGCGCATCGCTG TGAAGGTCATCGATAGCAGG	391	53	(26)
<i>sul1</i>	GCCTGGAAC TGCTGCTGATGC TCGCCTGCCAACCGAACTCT	314	59	(27)
<i>sul2</i>	GCGCTCAAGGCAGATGGCATT GCGTTGATAACGGCACCCGT	793	57	(27)
<i>qnrB</i>	GATCGTGAAGCCAGAAAGG ACGATGCCTGGTAGTTGTCC	513	55	(25)
<i>adk</i>	ATTCTGCTTGGCGCTCCGGG CCGTCAACTTTCGCGTATT	583	54	(20)
<i>fumC</i>	TCACAGGTCCGCCAGCGCTTC GTACGCAGCGAAAAAGATT	806	54	(20)
<i>gyrB</i>	TCGGCGACACGGATGACGGC ATCAGGCCCTCACGCGCATC	911	60	(20)
<i>icd</i>	ATGGAAAGTAAAGTAGTTGTTCCGGCACA GGACGCAGCAGGATCTGTT	878	54	(20)
<i>mdh</i>	ATGAAAGTCGCAGCTCGGCCGCTGCTGGCGG TTAACGAACTCTGCCAGAGCGATATCTTCTT	932	60	(20)
<i>purA</i>	CGCGCTGATGAAAGAGATGA CATACGTAAGGCCACGCAGA	816	54	(20)
<i>recA</i>	CGCATTGCTTACCCCTGACC TCGTCGAAATCTACGGACCGGA	780	58	(20)

Meja 2.Kerentanan 40*E.coli*/strain ke 13 antibiotik yang biasa digunakan di Cina

Antibiotika	Distribusi dari <i>E.coli</i> /strain (jumlah strain/%)			Kriteria keputusan/Diameter dari zona hambat (mm)		
	R	Saya	S	R	Saya	S
Ampisilin	21/52,5%	6/15,0%	13/32,5%	≤13	14-16	≥17
Amoksisilin	18/45,0%	3/7,5%	19/47,5%	≤13	14-17	≥18
Ceftriaxone	19/47,5%	1/2,5%	20/50,0%	≤19	20-23	≥24
Cefazolin	31/77,5%	8/20,0%	1/2,5%	≤19	20-22	≥23
Gentamisin	13/32,5%	0	27/67,5%	≤12	13-14	≥15
Streptomisin	12/30,0%	5/12,5%	23/57,5%	≤11	12-14	≥15
Neomisin	1/2,5%	15/37,5%	24/60,0%	≤11	12-16	≥17
Amikasin	1/2,5%	1/2,5%	38/95,0%	≤14	15-16	≥17
Eritromisin	17/42,5%	21/52,5%	2/5,0%	≤13	14-22	≥23
Doksisisiklin	14/35,0%	5/12,5%	21/52,5%	≤10	11-13	≥14
Trimethoprim-sulfametoksazol	22/55,0%	0	18/45,0%	≤12	13-16	≥17
Ciprofloxacin	7/17,5%	0	33/82,5%	≤15	16-20	≥21
Enrofloksasin	6/5,0%	11/27,5%	23/57,5%	≤15	16-23	≥24

R – tahan; Saya – perantara; S - rentan

Tabel 3.Jenis urutan, fenotipe resistensi, dan gen resistensi pada 40*E.coli*/strain

PENGENAL	Lokasi	MLST	fenotipe resistensi	Gen resistensi
1	Xushui	ST10	AMP-AMX-CRO-CFZ-GEN-STR-EM-DOX-SXT-ENR AMP-AMX-	<i>aada, qnrB</i>
2	Xushui	ST10	CRO-CFZ-GEN-STR-NER-EM-DOX-SXT-CIP-ENR AMP-AMX-CRO-	<i>aada, tet(B)</i>
3	Xushui	ST359	CFZ- GEN-STR-NER-EM-DOX-SXT-CIP-ENR CFZ-EM	<i>blaSHV, aadA</i>
4	Xushui	ST10		<i>aada, tet(B), sul2</i>
5	Xushui	ST10	AMP-AMX-CRO-CFZ-STR-NER-EM-DOX-SXT-CIP-ENR AMP-AMX-	<i>aada, sul2</i>
6	Xushui	ST1585	CRO-CFZ-GEN-STR-NER-NER-EM-DOX-SXT-CIP-ENR	<i>aacA4, aadA</i>
7	Xushui	ST359	AMP-AMX-CRO-CFZ-GEN-STR-NER-AMI-EM-DOX-SXT-CIP-ENR	<i>blaSHV, blaOXA, aadA</i>
8	Xushui	ST359	AMP-AMX-CRO-CFZ-GEN-NER-EM-DOX-SXT-ENR	<i>blaOXA, aacA4, aadA</i>
9	Xushui	ST359	AMP-AMX-CRO-CFZ-GEN-STR-EM-DOX-SXT-CIP-ENR CFZ-	<i>blaSHV, blaOXA, aadA, tet(B)</i>
10	Xushui	ST10	EM	<i>aada, sul2</i>
11	Xushui	ST10	CFZ-EM	<i>aada, tet(B), sul2</i>
12	Xushui	ST359	AMP-AMX-CRO-CFZ-GEN-NER-EM-SXT-ENR	<i>blaOXA, aadA, sul2</i>
13	Xushui	ST1125	AMP-AMX-CRO-CFZ-STR-SXT	<i>aada, tet(B)</i>
14	Xushui	ST1585	AMP-AMX-CRO-CFZ-EM-DOX-SXT-ENR	<i>blaSHV, aadA, tet(B)</i>
15	Xushui	ST327	AMP-AMX-CRO-CFZ-EM-DOX-ENR AMP-	<i>aada, tet(B)</i>
16	Xushui	ST937	AMX-CRO-CFZ-STR-EM-SXT-ENR AMP-CFZ-	<i>aada, tet(B)</i>
17	Qingyuan	ST10717	STR-NER -EM-DOX-SXT CFZ-NER-EM-DOX	<i>aad(2), aada, erm(B), tet(SEBUAH), tet(B) erm</i>
18	Qingyuan	ST942		<i>(B), tet(SEBUAH), sul1, sul2</i>
19	Qingyuan	ST446	AMP-CFZ-GEN-STR-NER-EM-DOX-SXT AMP-	<i>aad(2), aada, erm(B), tet(SEBUAH), tet(B) aac</i>
20	Qingyuan	ST1310	AMX-CRO-CFZ-GEN-STR-NER-AMI-EM AMP-	<i>(2), erm(B), tet(SEBUAH), tet(B), sul2 aad(2), erm(B), tet(SEBUAH), sul1 aad(2), erm(B), tet</i>
21	Qingyuan	ST515	AMX-CRO-CFZ-STR-EM-DOX-SXT-ENR AMP	<i>(SEBUAH), tet(B), sul1 aad(2), tet(SEBUAH), sul2</i>
22	Qingyuan	ST48	-CFZ-NER-EM	<i>aad(2), erm(B), tet(SEBUAH)</i>
23	Qingyuan	ST10	CFZ-NER-EM	<i>aad(2), tet(SEBUAH)</i>
24	Quyang	ST1252	AMP-AMX-CRO-CFZ-STR-EM-SXT-ENR	<i>aad(2), tet(SEBUAH), tet(B) tet</i>
25	Quyang	ST1079	AMP-CFZ-EM	<i>(SEBUAH), tet(B)</i>
26	Quyang	ST154	CFZ	<i>aad(2), erm(B), tet(SEBUAH), tet(B), sul2</i>
27	Quyang	ST1585	AMP-AMX-CRO-CFZ-GEN-STR-NER-EM-DOX-SXT-CIP-ENR AMP-	<i>aadA, erm(B)</i>
28	Quyang	ST1167	AMX-CRO-CFZ-STR-NER-NER-EM-DOX-SXT	<i>aad(2), erm(B), tet(SEBUAH)</i>
29	Mancheng	ST1610	AMP-CFZ-EM	<i>aad(2), tet(SEBUAH)</i>
30	Mancheng	ST10	NER-EM	<i>aad(2), tet(SEBUAH), sul1, sul2 aac</i>
31	Mancheng	ST2741	CFZ-EM	<i>(2), aada, tet(SEBUAH), tet(B) aac</i>
32	Mancheng	ST2741	CFZ-EM	<i>(2), tet(SEBUAH), tet(B)</i>
33	Mancheng	ST48	AMP-CFZ-GEN-STR-EM-DOX-SXT-ENR	<i>aad(2), aada, erm(B), tet(SEBUAH), tet(B), sul1</i>
34	Mancheng	ST10	AMP-AMX-CRO-CFZ-EM-DOX-SXT-ENR	<i>aad(2), erm(B), tet(SEBUAH), tet(B), sul2</i>
35	Mancheng	ST906	AMP-AMX-CRO-CFZ-EM-SXT	<i>aad(2), tet(SEBUAH), tet(B), sul1, qnrB</i>
36	Mancheng	ST48	CFZ-EM	<i>erm(B), tet(B), sul1</i>
37	Mancheng	ST48	CFZ-EM	<i>aada, erm(B), tet(B), sul1</i>
38	Mancheng	ST48	CFZ-EM	<i>aad(2), tet(B) aada, erm</i>
39	Mancheng	ST906	CFZ-EM	<i>(B), sul1</i>
40	Mancheng	ST48	AMP-AMX-CFZ-GEN-EM-DOX-SXT	

AMP – ampisilin; AMX – amoksisilin; CRO – ceftriaxone; CFZ – sefazolin; GEN – gentamisin; STR – streptomisin; NER – neomisin; AMI – amikasin; EM – eritromisin; DOX – doksisiklin; SXT – trimetoprim-sulfametoksazol; CIP – ciprofloxacin; ENR – enrofloksasin

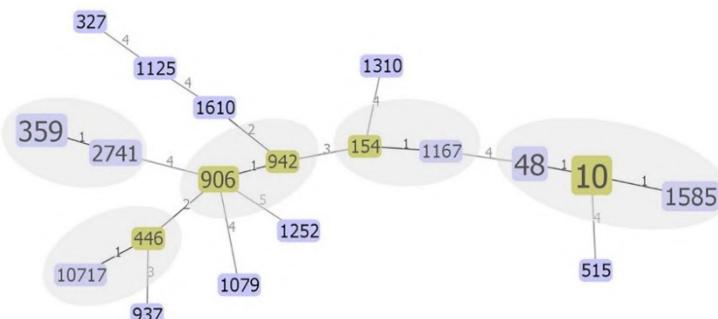
Tabel 4.Koefisien korelasi Pearson (r) dari gen resistensi dan antibiotik yang sesuai

Perlwanan gen	Antimikroba												
	AMP	AMX	CRO	CFZ	GEN	STR	NER	AMI	EM	DOX	SXT	CIP	ENR
<i>blaSHV</i>	0,231	0,317	0,333	0,053	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>blaOXA</i>	-0,114	0,248	0,124	-0,059	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>aad(2)</i>	-	-	-	-	-0,27 3	-0,12 5	-0,083	0,035	-	-	-	-	-
<i>aacA4</i>	-	-	-	-	0,331	0,035	0,281	-0,053	-	-	-	-	-
<i>aadA</i>	-	-	-	-	0,427	0,353	0,105	-0,059	-	-	-	-	-
<i>erm(B)</i>	-	-	-	-	-	-	-	-0,04 7	-	-	-	-	-
<i>tet(SEBUAH)</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-0,156	-	-	-	-
<i>tet(B)</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-0,347	-	-	-	-
<i>sul1</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,174	-	-
<i>sul2</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,343	-	-
<i>qnrB</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-0,106	0,035

AMP – ampicilin; AMX – amoksikilin; CRO – ceftriaxone; CFZ- sefazolin; GEN- gentamisin; STR – streptomisin; NER – neomisin; AMI – amikasin; EM – eritromisin; DOX – doksisisiklin; SXT – trimetoprim-sulfametoksalol; CIP – ciprofloxacin; ENR – enrofloxacin Koefisien korelasi Pearson (r) yang ditunjukkan dengan huruf tebal adalah signifikan pada $P < 0,05$

R positif menunjukkan hubungan positif antara kedua variabel, sedangkan r negatif menunjukkan hubungan negatif

- Mewakili antimikroba tanpa gen resistensi antibiotik yang sesuai

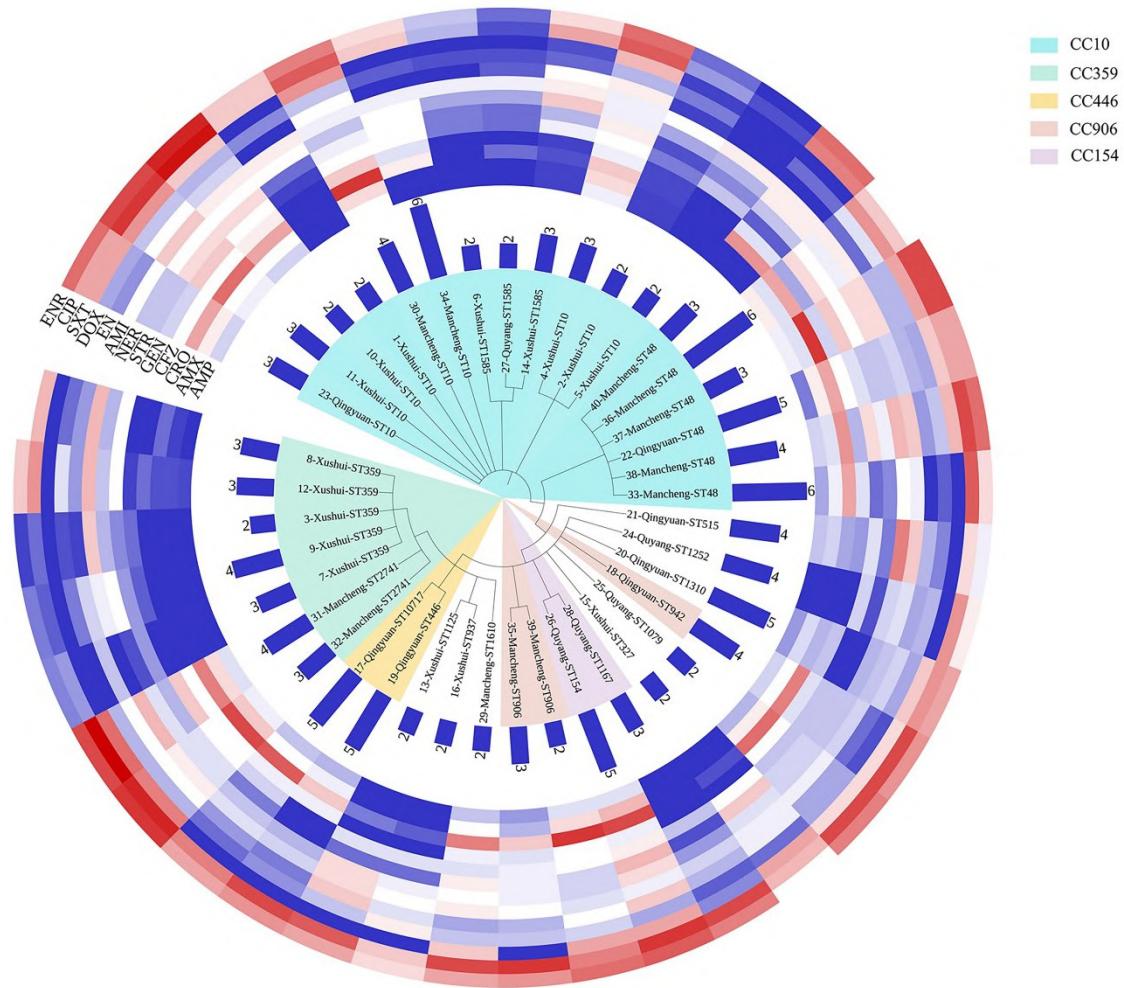


Gambar 1.Pohon rentang minimum penuh menggunakan algoritme goeBURST ($n = 40$). Setiap kotak mewakili tipe sekuen tunggal (ST), dan kelilingnya sebanding dengan jumlah isolat dalam setiap ST. Daerah abu-abu mewakili kompleks klon. Angka di atas garis (1-5) mewakili jumlah alel yang berbeda antara kedua tipe ST. Simpul utama ditunjukkan dengan warna hijau zaitun

Asosiasi gen resistensi dan antibiotik yang sesuai. Hubungan antara gen resistensi dan antibiotik yang sesuai *E.coli* strain dievaluasi (Tabel 4). Hasil penelitian menunjukkan bahwa empat jenis antimikroba, yaitu amoxicillin (AMX), ceftriaxone (CRO), gentamicin (GEN), dan streptomycin (STR), berkorelasi positif dengan gen resistensi yang sesuai pada *E.coli* strain ($P < 0,05$).

MLST dan analisis filogenetik. Sembilan belas ST diidentifikasi di antara semua 40 strain, yang paling umum adalah ST10 ($n = 9$, 22,5%), diikuti oleh ST48 ($n = 6$, 15,0%), ST359 ($n = 5$, 12,5%) dan ST1585 ($n = 3$, 7,5%); 13 ST disajikan hanya sekali. Tidak ada ST baru yang ditemukan dalam penelitian ini (Tabel 3). Lima node utama yang terdiri dari 14 *E.coli* isolat ditemukan dengan analisis pohon rentang minimum dari semua tipe ST. Berdasarkan level varian lokus tunggal, 40 *E.coli* strain diklasifikasikan sebagai lima kompleks klon (CC10, CC154, CC359, CC446 dan CC906) dan jenis urutan utamanya masing-masing adalah ST10, ST154, ST359, ST446 dan ST906. Hanya ada sepasang perbedaan alelik antara tipe ST yang bertetangga di kompleks klon ini (Gbr. 1).

Pohon evolusi menunjukkan hubungan genetik yang erat antara strain dalam kompleks klon yang sama, seperti CC154 (area ungu, Gambar 2) dan CC446 (area kuning, Gambar 2). Strain di CC10 (area biru, Gbr. 2) didistribusikan dalam kelompok pohon evolusi yang berbeda, sedangkan strain ST48 lebih jauh terkait dengan strain ST10 dan ST1585 (Gbr. 2). Melalui analisis resistensi antimikroba, terlihat adanya perbedaan profil resistensi obat dan pembawa gen pada strain ST atau CC yang sama. Misalnya, dua *E.coli* strain di CC446 (ID17 dan ID19) (Gbr. 2) memiliki profil resistensi obat yang serupa dan membawa jumlah gen resistensi yang sama, dan lima strain ST359 (ID3, ID7, ID8, ID9 dan ID12) (Gbr. 2) juga cocok satu sama lain dengan cara yang sama. Kecenderungan sebaliknya ditemukan untuk dua galur di CC154 (ID26 dan ID28) (Gbr. 2) dan enam galur ST10 (ID1, ID10, ID11, ID23, ID30 dan ID34) (Gbr. 2): dibandingkan dengan galur lain di kelompok CC yang sama atau tipe ST yang sama, strain ini menunjukkan perbedaan yang luar biasa dalam profil resistensi obat dan jumlah gen resistensi antimikroba (Gbr. 2).



Gambar 2. Analisis filogenetik molekuler dan resistensi antimikroba 40 *E.coli*/isolat. Pohon evolusi disimpulkan menggunakan metode kemungkinan maksimum berdasarkan model Tamura-Nei. Pohon konsensus bootstrap yang disimpulkan dari 1.000 ulangan diambil untuk mewakili sejarah evolusi taksa yang dianalisis. Cabang-cabang pohon evolusi diberi nama dengan ID, lokasi, dan tipe *STE.coli*/isolat. Kompleks klon yang sama disorot di area warna yang sama. Ketinggian grafik batang biru di pinggiran pohon evolusi mewakili jumlah gen yang resisten terhadap obat (2–6) yang dibawa oleh *E.coli*/isolat. Diameter zona penghambatan antibiotik yang berbeda (6–34 mm) ditampilkan sebagai peta panas di mana merah mewakili diameter resistansi tinggi (cenderung rentan) dan biru mewakili diameter resistansi rendah (cenderung resisten)

Diskusi

Escherichia coli merupakan bakteri lingkungan primer yang dapat menyebabkan mastitis pada ternak sapi perah. Kajian sebelumnya menunjukkan bahwa sapi perah dengan mastitis disebabkan oleh *E.coli* umumnya menunjukkan tanda-tanda klinis yang parah seperti kemerahan, bengkak, nyeri, dan demam, dan bahkan kematian dapat terjadi akibat penyakit tersebut (10). Menanggapi wabah mastitis coliform atau ancamannya pada ternak sapi, antibiotik dalam jumlah besar telah digunakan di seluruh dunia. Penggunaan antibiotik yang berlebihan sangat parah di China. Secara statistik, lebih dari 23% antibiotik yang digunakan di dunia untuk produksi hewan pangan digunakan di Cina, dan proporsinya diproyeksikan meningkat menjadi 30% pada tahun 2030 (5, 34). Praktik yang dipertanyakan ini telah menyebabkan munculnya AMR di *E.coli* strain. Sayangnya, efek buruk dari resistensi antimikroba pada bakteri belum menarik

perhatian yang cukup dalam produksi ternak (31). Ada hubungan genetik yang rumit di antara *E.coli*/strain karena kompleks klon. Menelusuri ini dapat memberikan informasi yang bermanfaat untuk lebih memahami aturan resistensi antimikroba di suatu wilayah. Oleh karena itu, adalah konstruktif untuk menganalisis perspektif untuk *E.coli* resistensi antimikroba pada peternakan sapi perah dari titik awal komunitas filogenetik.

Pada penelitian ini, laju isolasi dari *E.coli* dalam sampel susu di wilayah Cina utara adalah 20,41%, lebih tinggi dari laporan sebelumnya (7,8%) (6). Perbedaan seperti itu mungkin terkait dengan ukuran sampel, perbedaan regional, dan metode deteksi. Hasil pengujian kerentanan menunjukkan bahwa proporsi strain MDR setinggi 72,5%, lebih tinggi dari tingkat 40% yang dilaporkan dalam sampel susu dari Mesir (31) tetapi lebih rendah dari 87,8% yang dilaporkan di Timur Tengah (41). Seperti yang baru-baru ini dilaporkan oleh Cheng et al.(9), MDR

E.coli pada mastitis sapi merupakan masalah pada peternakan sapi perah Cina yang cukup besar. Paling *E.coli*/strain menunjukkan resistensi yang luas terhadap antibiotik beta-laktam cefazolin (77,5%), ampisilin (52,5%), ceftriaxone (47,5%) dan amoksisilin (45,0%), sedangkan situasi sebaliknya terlihat untuk neomisin (2,5%) dan amikasin (2,5%). %) yang merupakan antibiotik aminoglikosida. Sebagai perbandingan, sebuah studi tentang kerentanan antimikroba dari sembilan patogen ambing yang diisolasi dari susu mastitis klinis sapi di Eropa menunjukkan tingkat resistensi yang lebih tinggi terhadap ampisilin dan tetrakisiklin dan yang lebih rendah terhadap antibiotik beta-laktam amoksisilin/asam klavulanat dan cefazolin (12). Kami menemukan perbedaan nyata dalam pola konsumsi antimikroba antara Eropa dan China (13), yang mencerminkan kombinasi faktor termasuk strategi pemasaran farmasi, pola resep dokter hewan, pedoman pemerintah untuk penggunaan antimikroba yang tepat dan manfaat ekonomi pertanian di berbagai daerah (33). Oleh karena itu, kami menyimpulkan bahwa temuan kami muncul dari penggunaan antibiotik yang tidak tepat di peternakan di wilayah yang diselidiki. Selain itu, kami menemukan bahwa muncul resistensi terhadap gentamisin yang sampai sekarang biasanya efektif, yang dapat dijelaskan dengan penggunaan jangka panjang antibiotik ini pada peternakan sapi perah (19).

Ada banyak mekanisme resistensi antimikroba pada bakteri. Dalam kebanyakan kasus, keberadaan gen resistensi antimikroba berkorelasi kuat dengan fenotipe resisten (3, 22), dan asal genetik memperburuk masalah resistensi antimikroba (21) karena gen resistensi antimikroba dapat ditularkan baik secara vertikal maupun horizontal melalui plasmid, transposon dan integrator dalam populasi bakteri. Studi ini menemukan bahwa lebih dari separuh isolat membawa *aadA* dan *adetB* gen dan tidak ada yang membawa *blaTEM* dan *ermC* gen, yang konsisten dengan penelitian sebelumnya yang dilakukan di wilayah timur laut Yordania menunjukkan tingkat yang relatif tinggi *E.coli*/pengangkutan gen resistensi ini (17). Untuk mengetahui pengaruh perbedaan distribusi gen resistensi terhadap resistensi antibiotik pada *E.coli*/strain (8), kami menganalisis korelasi antara antibiotik dan gen resistensi yang sesuai *E.coli*/isolat. Hasil penelitian menunjukkan bahwa resistensi terhadap amoksisilin dan ceftriaxone berkorelasi positif dengan gen resistensi terhadap betalaktam (Tabel 4). Asosiasi ini dianggap sebagai alasan utama resistensi yang meluas *E.coli*/untuk antibiotik beta-laktam di peternakan daerah: meskipun sejumlah besar gen resistensi beta-laktam tidak terdeteksi, tren ini dapat menjadi hasil dari pengangkutan gen resistensi lain terhadap beta-laktam dan juga disebabkan oleh mekanisme resistensi rumit lainnya, seperti produksi beta-laktamase spektrum luas (4). Selanjutnya, beberapa *E.coli*/strain tidak menunjukkan hubungan antara antibiotik yang mereka tolak dan gen resistensi yang sesuai. Liuet *et al.* (22) melaporkan bahwa sebagian besar gen resistensi antibiotik tidak menunjukkan korelasi dengan antibiotik yang sesuai/tidak sesuai dalam memberikan resistensi yang diharapkan kecualiatet(A) gen resistensi pada bakteri dari sungai

sumber air minum. Hasil kami hanya sebagian konsisten dengan temuan ini. Mungkin tekanan seleksi lingkungan mempengaruhi keragaman dan penyebaran resistensi antimikroba di *E.coli*/strain (22, 27). Dalam studi lebih lanjut, hubungan antara resistensi antimikroba dari *E.coli*/dan berbagai faktor lingkungan perlu diperjelas.

Pengetikan urutan multilokus adalah metode yang kuat dan dapat direproduksi untuk menganalisis hubungan genetik dalam genetika populasi dan sering digunakan dalam penyelidikan epidemiologi molekuler (29). Pada percobaan ini 40 *E.coli*/strain dibagi menjadi 19 ST dan 5 CC. Sebagian besar galur dengan tipe ST atau CC yang sama memiliki kekerabatan genetik yang serupa, yang sejalan dengan penelitian sebelumnya (43) dan terlihat pada pohon rentang minimum dan pohon filogenetik (Gambar 1 dan 2). Menariknya, tidak seperti CC lainnya di pohon filogenetik, galur ST48 memiliki hubungan yang jauh dengan galur ST lain di CC10. Namun, hanya ada sepasang gen 'housekeeping' (*adk*) perbedaan antara regangan ST48 dan ST10 pada pohon rentang minimum, dan kami berspekulasi bahwa fenomena ini disebabkan oleh perbedaan dalam *adk* urutan (38). Kami juga memasukkan peta panas kerentanan antimikroba dan jumlah gen resistensi ke dalam pohon filogenetik dan menemukan bahwa karakteristik molekuler sangat berbeda pada CC yang sama atau pada galur ST yang sama; ini konsisten dengan laporan bahwa sensitivitas antimikroba dari *E.coli* sangat berbeda dari daerah ke daerah (16). Kami mengaitkan polimorfisme dari *E.coli*/ karakteristik molekuler hingga perbedaan tingkat kebersihan lingkungan, model pengelolaan peternakan dan penggunaan antibiotik pada peternakan sapi perah di berbagai daerah.

Sebagai kesimpulan, penelitian ini menjelaskan karakteristik molekuler dari resistensi antimikroba dan korelasi genetik dari *E.coli*/dari sapi perah mastitic di Cina utara. Peternakan di wilayah studi kami terkontaminasi dengan MDR *E.coli*/yang dapat disebabkan oleh penggunaan antibiotik yang tidak tepat. Tingkat deteksi yang tinggi dari isolat MDR dan perbedaan resistensi menunjukkan bahwa langkah-langkah harus diambil untuk mengurangi risiko keamanan pangan hewani dan kesehatan manusia, seperti penggunaan hanya antimikroba yang bijaksana dengan memperhatikan AMR *E.coli*/dan genotipe di peternakan sapi perah Cina utara.

Pernyataan Konflik Kepentingan: Para penulis menyatakan bahwa tidak ada konflik kepentingan terkait penerbitan artikel ini.

Pernyataan Pengungkapan Keuangan: Penelitian ini didukung oleh Hebei Key Research and Development Program (19226611D).

Pernyataan Hak Hewan: Susu diambil sampelnya melalui ekspresi melalui puting susu dan tidak ada prosedur lebih lanjut yang dilakukan pada sapi penelitian. Tidak diperlukan pernyataan hak binatang. Pengumpulan sampel telah disetujui oleh peternakan yang relevan.

Referensi

1. Ahmed AM, Furuta K., Shimomura K., Kasama Y., Shimamoto T.: Karakterisasi genetik resistensi multiobat pada *Shigella* spp. dari Jepang. *J Med Microbiol* 2006, 55, 1685–1691, doi: 10.1099/jmm.0.46725-0.
2. Ahmed AM, Motoi Y., Sato M., Maruyama A., Watanabe H., Fukumoto Y., Shimamoto T.: Hewan kebun binatang sebagai reservoir bakteri gram negatif yang mengandung integron dan gen resistensi antimikroba. *Appl Environ Microbiol* 2007, 73, 6686–6690, doi: 10.1128/aem.01054-07.
3. Ai W., Zhou Y., Wang B., Zhan Q., Hu L., Xu Y., Guo Y., Wang L., Yu F., Li X.: Laporan Pertama Koeksistensi blaSFO-1 dan Gen blaNDM-1β-Laktamase serta Gen Resistensi Colistin mcr-9 dalam Plasmid yang Dapat Dipindah tangankan dari Isolat Klinis *Enterobacter hormaechei*. *Front Microbiol* 2021, 18, 12, 676113, doi: 10.3389/fmicb.2021.676113.
4. Alam MZ, Aqil F., Ahmad I., Ahmad S.: Insidensi dan transferabilitas resistensi antibiotik pada bakteri enterik yang diisolasi dari air limbah rumah sakit. *Braz J Microbiol* 2013, 44, 799–806, doi: 10.1590/s1517-83822013000300021.
5. Kolaborator Resistensi Antimikroba: Beban global resistensi antimikroba bakteri pada tahun 2019: analisis sistematis. *Lancet* 2022, 399, 629–655, doi: 10.1016/S0140-6736(21)02724-0.
6. Aslam N., Khan S., Usman T., Ali T.: Genotipe filogenetik, gen virulensi dan kerentanan antimikroba dari *Escherichia coli* isolat dari kasus mastitis sapi. *J Dairy Res* 2021, 88, 78–79, doi: 10.1017/S002202992100011X.
7. Bahadore M., Motamedifar M., Derakhshandeh A., Firouzi R., Motamedi Boroojeni A., Alinejad M., Naziri Z.: Keterkaitan genetik dari *Escherichia coli*/populasi tinja dan strain yang menyebabkan infeksi saluran kemih pada hospes yang sama. *MikrobiologiOpen* 2019, 8, e00759, doi: 10.1002/mbo3.759.
8. Cai W., Fu Y., Zhang W., Chen X., Zhao J., Song W., Li Y., Huang Y., Wu Z., Sun R., Dong C., Zhang F.: Efek sinergis dari baicalein dengan cefotaxime terhadap *Klebsiella pneumoniae* melalui penghambatan ekspresi gen CTX-M-1. *BMC Microbiol* 2016, 16, 181, doi: 10.1186/s12866-016-0797-1.
9. Cheng J., Qu W., Barkema HW, Nobrega DB, Gao J., Liu G., De Buck J., Kastelic JP, Sun H., Han B.: Profil resistensi antimikroba dari 5 patogen mastitis sapi umum di peternakan sapi perah Cina yang besar. *J Dairy Sci* 2019, 102, 2416–2426, doi: 10.3168/jds.2018-15135.
10. Cheng W., Han S.: Bovine mastitis: faktor risiko, strategi terapi, dan pengobatan alternatif – Tinjauan. *Asia-Austral J Anim Sci* 2020, 33, 1699–1713, doi: 10.5713/ajas.20.0156.
11. Institut Standar Klinik dan Laboratorium: VET08: Standar Kinerja Disk Antimikroba dan Uji Kerentanan Pengenceran untuk Bakteri yang Diisolasi Dari Hewan, Edisi Keempat. CLSI, Wayne, PA, 2018.
12. El Garch F., Youala M., Simjee S., Moyaert H., Klee R., Truszkowska B., Rose M., Hocquet D., Valot B., Morrissey I., de Jong A., Studi VetPath Kelompok: Kerentanan antimikroba dari sembilan patogen ambing yang ditemukan dari susu mastitis klinis sapi di Eropa 2015–2016: hasil VetPath. *Mikrobiol Dokter Hewan* 2020, 245, 108644, doi: 10.1016/j.vetmic.2020.108644.
13. Badan Obat Eropa.: Laporan ESV AC Kedua. Laporan Konsumsi Antimikroba Pengawasan Eropa (ESV AC). Penjualan agen antimikroba veteriner di 19 negara EU/EEA pada tahun 2010, 2018.
14. Gelband H., Miller-Petrie M., Pant S., Gandra S., Levinson J., Barter D., White A., Laxminarayan R.: Keadaan antibiotik dunia. Pusat Dinamika Penyakit, Ekonomi & Kebijakan, Washington, DC, 2015.
15. Ghanbarpour R., Oswald E.: Distribusi filogenetik gen virulensi di *Escherichia coli*/diisolasi dari mastitis sapi di Iran. *Res Vet Sci* 2010, 88, 6–10, doi: 10.1016/j.rvsc.2009.06.003.
16. Holmer I., Salomonsen C., Jorsal S., Astrup L., Jensen V., Høg B., Pedersen K.: Resistensi antibiotik pada bakteri patogen babi dan kaitannya dengan penggunaan antibiotik. *BMC Vet Res* 2019, 15, 449, doi: 10.1186/s12917-019-2162-8.
17. Ismail Z., Abutarbush S.: Karakterisasi molekuler resistensi antimikroba dan gen virulensi *Escherichia coli* diisolasi dari mastitis sapi. *Vet World* 2020, 13, 1588–1593, doi: 10.14202/vetworld.2020.1588-1593.
18. Iwano H., Inoue Y., Takasago T., Kobayashi H., Furusawa T., Taniguchi K., Fujiki J., Yokota H., Usui M., Tanji Y., Hagiwara K., Higuchi H., Tamura Y.: Bacteriophage ΦSA012 Memiliki Kisaran Inang yang Luas terhadap *Staphylococcus aureus* dan Kapasitas Litik Efektif dalam Model Mastitis Tikus. *Biologi* 2018, 7, 8, doi: 10.3390/biology7010008.
19. Kimera Z., Mshana S., Rweyemamu M., Mboera L., Matee M.: Penggunaan dan resistensi antimikroba pada hewan penghasil makanan dan lingkungan: perspektif Afrika. *Antimicrob Resist Infect Control* 2020, 9, 37, doi: 10.1186/s13756-020-0697-x.
20. Levin-Reisman I., Ronin I., Gefen O., Braniss I., Shores N., Balaban NQ: Toleransi antibiotik memfasilitasi evolusi resistensi. *Sains* 2017, 355, 826–830, doi: 10.1126/science.aaj2191.
21. Li Y., Yang L., Fu J., Yan M., Chen D., Zhang L.: Genotipe dan pengurutan flukus tinggi dari elemen patogen bakteri - integron. *Microb Pathog* 2018, 116, 22–25, doi: 10.1016/j.micpath.2017.12.073.
22. Liu Y., Chen Y., Feng M., Chen J., Shen W., Zhang S.: Kemunculan antibiotik dan gen resistensi antibiotik dan korelasinya pada sumber air minum tipe sungai, Cina. *Environ Sci Pollut Res Int* 2021, 28, 42339–42352, doi: 10.1007/s11356-021-13637-8.
23. Maiden MC, Bygraves JA, Feil E., Morelli G., Russell JE, Urwin R., Zhang Q., Zhou J., Zurth K., Caugant DA, Feavers IM, Achtman M., Spratt BG: Urutan multilokus mengetik: pendekatan portabel untuk identifikasi klon dalam populasi mikroorganisme patogen. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998, 95, 3140–3145, doi: 10.1073/pnas.95.6.3140.
24. Maiden MC, Jansen van Rensburg MJ, Bray JE, Earle SG, Ford SA, Jolley KA, McCarthy ND: MLST ditinjau kembali: pendekatan gen demi gen untuk genomik bakteri. *Nat Rev Microbiol* 2013, 11, 728–736, doi: 10.1038/nrmicro3093.
25. Martínez JL: Antibiotik dan gen resistensi antibiotik di lingkungan alami. *Sains* 2008, 321, 365–367, doi: 10.1126/science.1159483.
26. Mather AE, Denwood MJ, Haydon DT, Matthews L., Mellor DJ, Coia JE, Brown DJ, Reid SW: Prevalensi *Salmonella* genomic island 1 varian pada manusia dan hewan *Salmonella typhimurium* DT104 dapat dibedakan menggunakan pendekatan Bayesian. *PLoS One* 2011, 6, e27220, doi: 10.1371/journal.pone.0027220.
27. Natarajan M., Kumar D., Mandal J., Biswal N., Stephen S.: Studi virulensi dan pola resistensi antimikroba pada diaregenik *Escherichia coli*/diisolasi dari spesimen tinja diare dari anak-anak dan orang dewasa di rumah sakit tersier, Puducherry, India. *J Health Popul Nutr* 2018, 37, 17, doi: 10.1186/s41043-018-0147-z.
28. Navajas-Benito EV, Alonso CA, Sanz S., Olarte C., Martínez-Olarde R., Hidalgo-Sanz S., Somalo S., Torres C.: Karakterisasi molekuler resistensi antibiotik pada *Escherichia coli*/strain dari peternakan sapi perah dan sekitarnya. *J Sci Food Agric* 2017, 97, 362–365, doi: 10.1002/jsfa.7709.
29. Núñez-Samudio V., Pecchio M., Pimentel-Peralta G., Quintero Y., Herrera M., Landires I.: Epidemiologi Molekuler *Escherichia coli*/Isolat Klinis dari Central Panama. *Antibiotik* 2021, 10, 899, doi: 10.3390/antibiotics10080899.
30. Oliveira L., Ruegg PL: Pengobatan mastitis klinis yang terjadi pada sapi di 51 peternakan sapi perah besar di Wisconsin. *J Dairy Sci* 2014, 97, 5426–5436, doi: 10.3168/jds.2013-7756.
31. Ombarak RA, Zayda MG, Awasthi SP, Hineno A., Yamasaki S.: Serotype, Potensi Patogen, dan Resistensi Antimikroba *Escherichia coli*/Diisolasi dari Sampel Susu Mastitis Bovine Subklinikis di Mesir. *Jpn J Infect Dis* 2019, 72, 337–339, doi: 10.7883/yoken.JJID.2018.538.

32. Osman KM, Kappell AD, Elhadidy M., ElMougy F., El-Ghany WAA, Orabi A., Mubarak AS, Dawoud TM, Hemeg HA, Moussa IMI, Hessain AM, Yousef HMY: Pemberian unggas sebagai reservoir potensial untuk resistensi antimikroba *Escherichia coli*: Risiko terhadap kesehatan masyarakat dan keamanan pangan. *Sci Rep* 2018, 8, 5859, doi: 10.1038/s41598-018-23962-7.
33. Patel S., Wellington M., Shah R., Ferreira M.: Pengawasan Antibiotik pada Hewan Penghasil Makanan: Tantangan, Kemajuan, dan Peluang. *Clin Ther* 2020, 42, 1649–1658, doi: 10.1016/j.clinthera.2020.07.004.
34. Qiao M., Ying G., Singer A., Zhu Y.: Review resistensi antibiotik di Cina dan lingkungannya. *Environ Int* 2018, 110, 160–172, doi: 10.1016/j.envint.2017.10.016.
35. Rossolini GM, Arena F., Pecile P., Pollini S.: Pembaruan tentang krisis resistensi antibiotik. *Curr Opin Pharmacol* 2014, 18, 56–60, doi: 10.1016/j.coph.2014.09.006.
36. Seegers H., Fourichon C., Beaudeau F.: Efek produksi terkait mastitis dan ekonomi mastitis pada ternak sapi perah. *Vet Res* 2003, 34, 475–491, doi: 10.1051/veteres:2003027.
37. Song X., Wu H., Yin Z., Lian M., Yin C.: Bakteri Endofit Diisolasi dari *Panax ginseng* Meningkatkan Ginsenosida Akumulasi dalam Kultur Akar Ginseng Advent. *Molekul* 2017, 22, 837, doi: 10.3390/molecules22060837.
38. Souto AC, Bonfietti LX, Ferreira-Paim K., Trilles L., Martins M., Ribeiro-Alves M., Pham CD, Martins L., Dos Santos W., Chang M., Brito-Santos F., Santos DC, Fortes S., Lockhart SR, Wanke B., Melhem MS, Lazéra MS, Meyer W.: Analisis Genetik Populasi Mengungkapkan Keanekaragaman Genetik yang Tinggi di Brasil *Cryptococcus gattii*: Populasi VGII dan Pergeseran Asal Global dari Hutan Hujan Amazon ke Gurun Semi-kering di Timur Laut Brasil. *PLoS Negl Trop Dis* 2016, 10, e0004885, doi: 10.1371/journal.pntd.0004885.
39. Sukumar S., Roberts AP, Martin FE, Adler CJ: Wawasan Metagenomik ke Resistensi Antibiotik yang Dapat Ditransfer pada Bakteri Mulut. *J Dent Res* 2016, 95, 969–976, doi: 10.1177/0022034516648944.
40. Suojala L., Simojoki H., Mustonen K., Kaartinen L., Pyörälä S.: Khasiat enrofloxacin dalam pengobatan klinis akut yang terjadi secara alami *Escherichia coli* mastitis. *J Dairy Sci* 2010, 93, 1960–1969, doi: 10.3168/jds.2009-2462.
41. Tartner Y., Abd El-Aziz N., Gharieb R., El Damaty H., Enany S., Soliman E., Abdellatif S., Attia A., Bahnass M., El-Shazly Y., Elbedwi M., Ramadan H.: Pengurutan Seluruh Genom Bakteri Gram-Negatif yang Diisolasi Dari Bovine Mastitis dan Susu Mentah: Kemunculan Pertama Gen Resistensi Colistin mcr-10 dan Fosfomycin fosA5 di *Klebsiella pneumoniae* Timur Tengah. *Front Microbiol* 2021, 12, 770813, doi: 10.3389/fmicb.2021.770813.
42. Wang D., Wang Z., Yan Z., Wu J., Ali T., Li J., Lv Y., Han B.: mastitis sapi *Staphylococcus aureus*: profil kerentanan antibiotik, gen resistensi dan pengetikan molekuler dari strain yang resisten terhadap methicillin dan yang sensitif terhadap methicillin di Cina. *Infect Genet Evol* 2015, 31, 9–16, doi: 10.1016/j.meegid.2014.12.039.
43. Wirth T., Falush D., Lan R., Colles F., Mensa P., Wieler L H., Karch H., Reeves PR, Maiden MC, Ochman H., Achtman M.: Sex and virulence in *Escherichia coli*: perspektif evolusioner. *Mol Microbiol* 2006, 60, 1136–1151, doi: 10.1111/j.1365-2958.2006.05172.x.
44. Zhang A., Wang H., Tian G., Zhang Y., Yang X., Xia Q., Tang J., Zou L.: Karakterisasi fenotipik dan genotipik resistensi antimikroba pada bakteri feses dari 30 panda raksasa. *Int J Antimicrob Agents* 2009, 33, 456–460, doi: 10.1016/j.ijantimicag.2008.10.030.

Keefektifan Dugaan Nanopartikel Perak dalam Pengobatan Endometritis Pascapersalinan pada Sapi Perah

Gamal El-Amrawi¹, Dina RS Gad El-Karim^{2*}

¹Departemen Teriogenologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Alexandria, Mesir.

²Departemen Patologi dan Patologi Klinik, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Alexandria, Mesir.

* Korespondensi

Dina RS Gad El-Karim

Departemen Patologi dan Patologi Klinik, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Alexandria, Mesir.

Alamat email: dina.shabaan@alexu.edu.eg

Abstrak

Endometritis postpartum klinis akibat invasi bakteri adalah salah satu penyakit paling umum yang menyerang sapi perah pada periode postpartum; antibiotik banyak digunakan sebagai pengobatan untuk mengatasi kasih sayang ini. Belakangan ini, resistensi bakteri terhadap antibiotik akibat penggunaan yang tidak terkontrol menjadi salah satu masalah serius yang dihadapi komunitas medis, sehingga tujuan penelitian ini adalah untuk mendeteksi keefektifan partikel nano-perak sebagai pengobatan endometritis postpartum pada sapi perah Holstein. Pada 35-40 hari postpartum, dua puluh satu sapi Holstein didiagnosis menderita endometritis postpartum, tergantung pada pemeriksaan klinis dan ultrasonografi. Protokol pengobatan termasuk infus intrauterin dengan 50 ml larutan nanopartikel perak (50 ppm/ml) selama lima hari berturut-turut, dan analog PGF-2 α dosis tunggal sebagai pengobatan untuk hewan dengan korpus lutetum pada ovariumnya. Pada 7 hari pasca perawatan, faktor nekrosis tumor tingkat serum-alfa (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), protein C-reaktif (CRP) dan serum amiloid-A (SAA) dan menurun secara signifikan ($P<0,01$). Juga, tingkat ceruloplasmin dan haptoglobulin (Hp) dalam serum mencatat penurunan yang signifikan ($P<0,05$) setelah pengobatan dengan nanopartikel perak. Selain itu, sekresi uterus ditemukan dengan penurunan yang signifikan atau hilang sama sekali, dan penurunan ketebalan endometrium terdeteksi setelah pemeriksaan ultrasonografi. Pada pemeriksaan ulang (49-54 hari postpartum), 14 hewan dari 21 hewan (66,6%) berhasil sembuh dari endometritis. Tingkat kebuntingan pada hari ke-40 pascapelayanan adalah 71,4% (10 dari 14 ternak ditemukan bunting setelah inseminasi pada estrus yang diamati). Sebagai sebuah kesimpulan, penelitian ini membuktikan kemanjuran nanopartikel perak sebagai pengobatan endometritis postpartum pada sapi perah Holstein. Jadi, itu bisa mengantikan pengobatan antibiotik dalam kasus seperti itu untuk menghindari masalah resistensi antibiotik.

KATA KUNCI

Endometritis pascapersalinan, Nano-silver, Sapi perah.

PENGANTAR

Peradangan endometrium yang terjadi lebih dari tiga minggu atau lebih setelah partus pada sapi perah tanpa tanda-tanda penyakit sistemik yang jelas dapat disebut endometritis postpartum (Sheldon *et al.*, 2006). Kontaminasi bakteri uterus setelah partus mungkin terjadi, tetapi terjadinya endometritis postpartum klinis tergantung pada tantangan antara kekebalan inang, virulensi mikroba yang menyerang dan akhirnya beberapa faktor lingkungan (Potter *et al.*, 2010). Endometritis klinis akan mengganggu siklus ovarium, menunda involusi uterus atau merusak jaringannya (Bonnetet *et al.*, 1993; Sheldon *et al.*, 2002) yang dapat memperpanjang interval beranak, menurunkan tingkat konsepsi berikutnya atau menyebabkan pemusnahan hewan karena kegagalan konsepsi berulang (Gilbertet *et al.*, 1998). Spesies bakteri yang paling umum yang terlibat dalam terjadinya endometritis klinis adalah *Escherichia coli*, *Fusobacterium necrophorum*, *Arcanobacterium pyogenes* dan *Prevotella* spesies (Huszenicza *et al.*, 1991, Sheldon *et al.*, 2002). Adanya keputihan abnormal adalah salah satu tanda yang paling khas dari endometritis klinis (Holte *et al.*, 1989). Pengobatan endometritis klinis tergantung terutama pada infus antibiotik intrauterin (Singh *et al.*, 2014), tetapi penggunaan yang berlebihan dan tidak terkontrol dari

antibiotik sayangnya telah menyebabkan resistensi multidrug (Yah dan Simate, 2015; Gurunathan, 2015), sehingga pengembangan agen antibakteri baru merupakan kebutuhan mendesak untuk mengatasi resistensi bakteri terhadap antibiotik (Panác-Eket *et al.*, 2006). Nanopartikel perak (AgNPs) adalah salah satu nanopartikel yang paling banyak dikomersialkan di bidang perawatan kesehatan karena efek antibakterinya (Chen dan Schluesener, 2008). Efek antibakteri AgNPs mungkin bergantung pada pelepasan ion perak (Ag $+$) yang dapat menempel pada asam nukleat membentuk kompleks yang akan menghambat replikasi bakteri (Yakabeet *et al.*, 1980; Chouhan dan Guleria, 2020). Juga, AgNPs memiliki afinitas elektrostatik terhadap protein sulfer membran sel dan sitoplasma, setelah perlekatan, mereka dapat meningkatkan permeabilitas dinding sel dan mengganggu selubung sel (Khorramiet *et al.*, 2018). Dalam konsistensi ini, penelitian ini berhipotesis bahwa infus nanopartikel perak intrauterin akan membantu eliminasi infeksi bakteri yang efektif yang menyebabkan endometritis postpartum pada sapi perah karena aktivitas antibakteri spektrum luas yang terbukti terhadap rentang strain bakteri yang berbeda, pemulihan tersebut dapat diindikasikan pada tahap awal. melalui estimasi tingkat perifer dari beberapa sitokin dan protein inflamasi dan selanjutnya melalui deteksi pemulihan lengkap dan tingkat kehamilan. Jadi, penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi efektivitas nanopartikel perak

MAJALAH EDISI 10 TAHUN 2022, DESEMBER 2022

cles sebagai pengobatan untuk endometritis postpartum pada sapi perah Holstein.

BAHAN DAN METODE

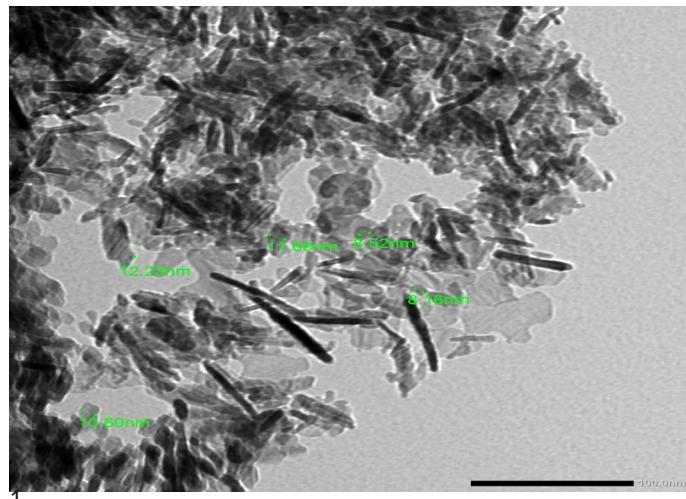
Hewan

Di sebuah peternakan sapi perah swasta yang luas di jalan gurun Alexandria-Kairo, dua puluh satu sapi Holstein, berat sekitar 450-500 Kg didiagnosis menderita endometritis pascapersalinan klinis pada 35-40 hari pascapersalinan, berdasarkan pemeriksaan klinis, karena hewan menderita. dari keputihan abnormal, peningkatan penebalan dinding rahim dan adanya cairan rahim setelah pemeriksaan ultrasonografi (Real time, B-mode, 7.5MHz, Sonoscope®, China).

Studi ini disetujui oleh komite Institusional Perawatan dan Penggunaan Hewan (IACUC), Universitas Alexandria, Mesir.

Protokol pengobatan

Protokol perawatan berupa pemberian 50 ml larutan nanopartikel perak (larutan nanopartikel perak nitrat, 50 ppm/ml) (Gbr.1) (Seif Nanotechnology®, Mesir) selama lima hari berturut-turut menggunakan kateter logam intrauterin secara intrauterin. , dan dosis tunggal (Estrumate®, 500 μ g cloprostenol) (I/M) untuk hewan dengan korpus lutetum pada ovarium. Sampel darah diambil sesaat sebelum dimulainya pengobatan dan pada tanggal 7thhari sejak penerapan protokol pengobatan, dan hewan diperiksa ulang secara klinis dan dengan ultrasonografi pada keduath dan 14th hari setelah titik awal pengobatan. Setelah pemeriksaan kedua, hewan yang pulih diinseminasi buatan dengan sedotan semen sumber tepercaya pada saat estrus mendatang.



gbr]. 1. Pencitraan mikroskop elektron partikel nano-perak.

Persiapan dan analisis serum

Alikuot darah diambil dari vena ekor dalam vacutainer polos, dibiarkan selama 30 menit untuk membeku, dan kemudian disentrifugasi selama 10 menit pada 3000 rpm untuk memisahkan serum, yang disimpan pada suhu -20 ° C untuk analisis selanjutnya. Kit ELISA digunakan untuk penentuan kadar serum TNF- α , IL-6 (Abcam, USA) dan SAA (Abbexa, UK). Tingkat CRP dideteksi menggunakan kit komersial tes slide lateks cepat (Spectrum, Mesir), konsentrasi serum haptoglobin dan ceruloplasmin dievaluasi dengan metode imuno-turbidimetri menggunakan kit yang tersedia secara komersial (Randox, UK; Spectrum, Mesir).

Analisis statistik

Perbedaan statistik rata-rata konsentrasi serum dari parameter yang diuji sebelum dan sesudah perlakuan dideteksi dengan menggunakan independent sample t-test dengan bantuan SPSS 16.0 for windows.

HASIL

Perubahan konsentrasi serum sitokin inflamasi dan protein

Pada tanggal 7th hari pasca perawatan, kadar serum TNF- α , IL-6, SAA dan CRP menurun ($P<0,01$) secara signifikan setelah pengobatan dengan nanopartikel perak. Juga, tingkat haptoglobin dan ceruloplasmin mencatat penurunan yang signifikan ($P<0,05$) setelah perawatan.

Tingkat pemulihan dan konsepsi

Sekresi vagina yang keruh berkurang atau menghilang, juga penurunan ketebalan endometrium dan cairan rahim yang dicatat pada pemeriksaan ultrasonografi pada tanggal 7th hari pasca perawatan. Setelah pemeriksaan ulang, 14 sapi dari 21 (66,6%) benar-benar sembuh dari Endometritis (sama sekali tidak ada sekresi vagina dan cairan rahim dengan ketebalan normal endometrium). Setelah diagnosis kehamilan melalui palpasi rektal, angka kehamilan adalah 71,4% pada 40th hari setelah inseminasi (10 dari 14 hewan ditemukan bunting).

DISKUSI

Endometritis postpartum adalah salah satu penyakit paling umum yang menyerang sapi perah, karena kejadian tahunannya di seluruh dunia dapat mencapai sekitar 10-50% (Lewis, 1997; Noakes *et al.*, 2001) dan kejadiannya dapat mencapai 40% pada beberapa peternakan sapi perah (Lewis, 1997). Karena efek antibakterinya yang kuat, partikel nano-perak menarik lebih banyak perhatian saat ini; selain itu, AgNPs telah terbukti sebagai agen anti-inflamasi yang akan membantu dalam proses penyembuhan (Chaloupka *et al.*, 2010). Beberapa penelitian telah membicarakannya

Tabel 1. Nilai rata-rata (mean \pm SD) dari berbagai parameter yang dievaluasi sebelum dan sesudah perlakuan.

	Sebelum perawatan	Setelah perawatan	nilai-t
TNF- α (pg/ml)	209,95 \pm 8,84A	158,57 \pm 7,91B	4,33**
IL-6 (pg/ml)	219,05 \pm 9,95A	168,67 \pm 7,47B	4,05**
SAA (μ g/ml)	37,90 \pm 2,64A	26,29 \pm 2,0B	3,47**
CRP (mg/L)	5,08 \pm 0,25A	3,42 \pm 0,16 B	5,56**
HP (mg/dl)	108,0 \pm 12,5A	101,57 \pm 12,2B	2,16 *
Seruloplasmin (mg/dl)	62,71 \pm 3,13A	58,19 \pm 2,98B	2,55 *

Berarti dalam baris yang sama dari tanda yang berbeda berbeda secara signifikan. * Signifikan pada ($P <0,05$); **: Signifikan pada ($P <0,01$)

tentang peningkatan tingkat sitokin inflamasi dan protein selama endometritis pada sapi (Liet *et al.*, 2010; Kimet *et al.*, 2014; Kayaet *et al.*, 2016a; Kayaet *et al.*, 2016b). Kehadiran bakteri lipopolisakarida (LPS) seperti dalam kasus endometritis menginduksi produksi sitokin inflamasi (sebagai TNF- α), untuk menarik sel-sel inflamasi dan meningkatkan masuknya mereka ke dalam lumen rahim untuk menghilangkan bakteri penyebab (Sheldon *et al.*, 2009). Juga, endometrium rahim dapat menghasilkan IL-6 sebagai respons terhadap keberadaan patogen (Turner *et al.*, 2012) untuk kemotaksis leukosit dan peningkatan fagositosis neutrofil dan makrofag (Singhet *et al.*, 2008). Dengan cara yang sama, protein fase akut memainkan peran kunci dalam respon inflamasi dan berfungsi sebagai penanda akurat berbagai penyakit ternak (Maden *et al.*, 2012; Tothova *et al.*, 2012). Setelah infeksi, SAA dihasilkan dari hati sebagai salah satu mekanisme pertahanan lini pertama sebagai respons terhadap stimulasi TNF- α dan/atau IL-1 (Petersen *et al.*, 2004; Tothova *et al.*, 2014). Dalam konsistensi yang sama, CRP adalah salah satu protein fase akut yang memainkan peran penting dalam sistem pertahanan bawaan terhadap patogen (Du Clos and Mold, 2001), dan levelnya terbukti meningkat sebagai respons terhadap endometritis (Liet *et al.*, 2010; Kayaet *et al.*, 2016b). Respons lini kedua meliputi Hp, yang disekresikan dari hati sebagai respons terhadap peningkatan kadar IL-6 jika terjadi proses inflamasi yang berkepanjangan (Petersen *et al.*, 2004; Tothova *et al.*, 2014). Selain itu, ceruloplasmin juga merupakan salah satu protein fase akut yang dapat meningkatkan fagositosis sel imun dan efek antimikroba (Ceronet *et al.*, 2000). Baik haptoglobin dan ceruloplasmin terbukti meningkat sesuai dengan tingkat keparahan endometritis (Kayaet *et al.*, 2016b). Mengenai dampak antimikroba nanopartikel perak, setelah serapan seluler ion nano-perak (Ag^+), sistem pernapasan sel akan diaktifkan dan menghasilkan spesies oksigen reaktif (ROS) dan menghambat pelepasan ATP, juga ROS akan mengganggu integritas membran sel dan merusak DNA, yang secara kolektif dapat mempengaruhi replikasi dan pembanyakan bakteri (Pareek *et al.*, 2018; Daset *et al.*, 2020). Selain itu, efek antibakteri dari ion perak mungkin bergantung pada kemampuannya menggagalkan sintesis protein seluler karena denaturasi komponen ribosom (Pareek *et al.*, 2018). Berdampingan, efek anti-inflamasi ion nano-perak terdeteksi sebelumnya (Chaloupka *et al.*, 2010; Morozova, 2021). Penjelasan sebelumnya dapat menggambarkan penyebab penurunan yang sangat signifikan dalam tingkat serum TNF- α , IL-6, SAA dan CRP dalam menanggapi pengobatan dengan partikel nano-perak karena penghapusan agen penyebab. Sebaliknya, penurunan minimal tingkat serum ceruloplasmin dan haptoglobin mungkin karena waktu paruh mereka yang lama (Hellman dan Gitlin, 2002; Eckersall dan Conner, 1988). Pemulihan hewan uji dari endometritis setelah pengobatan dengan partikel nanosilver lebih lanjut ditunjukkan dengan penurunan bertahap dalam keputihan dan ketebalan endometrium, sebagai sekresi vagina yang abnormal (Holt *et al.*, 1989) dan penebalan endometrium (Barlund *et al.*, 2008) adalah tanda yang paling umum untuk keberadaan endometritis postpartum.

KESIMPULAN

Sebagai kesimpulan, penelitian ini menunjukkan bahwa larutan nanopartikel perak tampaknya menjadi pengobatan yang efektif untuk endometritis postpartum klinis pada sapi perah. Sehingga dapat menggantikan pengobatan endometritis klinis dengan antibiotik untuk menghindari masalah resistensi antibiotik.

KONFLIK KEPENTINGAN

Para penulis menyatakan bahwa mereka tidak memiliki konflik kepentingan.

REFERENSI

- Barlund, CS, Carruthers, TD, Waldner, CL Palmer CWA, 2008. Sebuah komperimen teknologi untuk mendukung diagnosis peritonitis pada sapi perah. Teriogenol. 69, 714-723.
- Bonnett, BN, Martin, SW, Meek, AH, 1993. Asosiasi penemuan klinis pemeriksaan, hasil bakteriologis dan histologis jika biopsi endometrium dengan penampilan reproduksi sapi perah postpartum. Sebelumnya Dokter hewan. Kedokteran 15, 252-220.
- Cerone, SI, Sansinanea, AS, Streitenberger, SA, Garcia, MC, Auza, NJ, 2000. Aktivitas sitokrom c oksidase, Cu, Zn-superoksida dismutase, dan ceruloplasmin pada sapi yang kekurangan tembaga. Biol. Jejak. Elek. Res. 73, 269-278.
- Chaloupka, K., Malam, Y., Seifalian, AM, 2010. Nanosilver sebagai generasi baru erasi produk nano dalam aplikasi biomedis. Tren. dalam Bioteknol. 28, 580-588.
- Chen, X., Schluesener, HJ, 2008. Nanosilver: Produk nano dalam bidang medis aplikasi. Toksikol. Lett. 176, 1-12.
- Chouhan, S., Guleria, S., 2020. Sintesis hijau AgNP menggunakan Cannabis ekstrak daun sativa: karakterisasi, antibakteri, anti-ragi dan aktivitas penghambatan a-amilase. Mater. Sains. Teknologi Energi. 3, 536- 544.
- Das, SS, Alkahtani, S., Bharadwaj, P., Ansari, MT, ALKahtani, MD, Pang, Z., Hasnain, MS, Nayak, AK, Aminabhavi, T., 2020. Wawasan molekuler dan pendekatan baru untuk penargetan metastasis tumor. Int. J. Farmasi. 590, 119556.
- Du Clos, TW, Mould, C., 2001. Peran protein C-reaktif dalam pengenceran infeksi bakteri. Kur. Opin. Menulari. Dis. 14, 289-293.
- Eckersall, PD, Conner JG, 1988. Protein fase akut sapi dan anjing. Dokter hewan. Res. Kom. 12, 169-178.
- Gilbert, RO, Shin, ST, Guard, CL, Erb, HN, 1998. Insiden endometritis dan efek pada kinerja reproduksi sapi perah. Teriogenol. 1, 251.
- Gurunathan, S., 2015. Nanopartikel perak yang disintesis secara biologis melibatkan meningkatkan aktivitas antibiotik terhadap bakteri gram negatif. J.Ind.Eng. kimia 29, 217-226.
- Hellman, NE, Gitlin, JD, 2002. Metabolisme dan fungsi ceruloplasmin. Ann. Pdt.Nutri. 22, 439-458.
- Holt, LC, Whittier, WD, Gwazdauskas, FC, Vinson, WE, 1989. Awal profil reproduksi postpartum pada sapi Holstein dengan sisa plasenta dan pelepasan uterus. J. Ilmu Susu. 72, 533-539.
- Huszeniczka, G., Fodor, M., Gacs, M., Kulcsar, M., Dohmen, MJW, Vamos, M., Porkolab, L., Legl, T., Bartyk, J., Lohuis, JACM, Janosi, S., Szita, G., 1991. Bakteriologi rahim, dimulainya kembali aktivitas ovarium siklik, dan kesuburan pada sapi postpartum yang dipelihara peternakan sapi perah skala besar. Reproduksi Dom. Animasi. 34, 237-245.
- Kaya, S., Kacar, C., Ogun, M., Kuru, M., Ozen, H., Demir, MC, Şahin L., Zonturlu, AK, 2016b. Evaluasi Protein C-Reaktif Serum dan Antibodi Alami pada Sapi dengan Endometritis. Kafka. Univ. Dokter hewan. Fak. Derg. 22, 709-715.
- Kaya, S., Merhan, O., Kacar, C., Colak, A., Bozukluhan, K., 2016 a. Menentukan bangsa ceruloplasmin, beberapa protein fase akut lainnya, dan parameter biokimia pada sapi dengan Endometritis. Dokter hewan. Dunia. 9, 1056-1062.
- Khorrami, S., Zarrabi, A., Khaleghi, M., Danaei, M., Mozafari, M., 2018. Sitotoksitas selektif dari nanopartikel perak yang disintesis hijau terhadap garis sel tumor MCF-7 dan sifat antioksidan dan antimikroba yang ditingkatkan, Int. J. Nanomed. 13, 8013-8024.
- Kim, I., Kang, H., Jeong, J., Hur, T., Jung, Y., 2014 sitokin inflamasi konsentrasi dalam flush rahim dan sampel serum dari sapi perah dengan endometritis klinis dan subklinis. Teriogenol. 82, 427-432.
- Lewis, GS, 1997. Simposium: masalah kesehatan sapi nifas. Kesehatan dan gangguan rahim. J.susu. Sains. 80, 984-994.
- Li, DJ, Liu, YF, Pei, XY, Guo, DZ, 2010. Penelitian perubahan akut fase protein dan IL-6 pada sapi dengan endometritis. CJAV. 41, 1333-1336.
- Maden, M., Ozturk, AS, Bulbul, A., Avci, A., Yazar, E., 2012. Fase akut protein, stres oksidatif, dan aktivitas enzim serum darah dan cairan peritoneal pada sapi dengan perpindahan abomasal. J.Vet. Magang. Kedokteran 26, 1470-1475.
- Morozova, OV, 2021. Struktur Nano Perak: Sensitivitas Terbatas Detection, Toksisitas dan Efek Anti-Inflamasi. Int. J.Mol. Sains. 22, 9928-9939.
- Noakes, DE, Parkinson, TJ, Inggris, CW, 2001. Arthur's Veterinary Reproduksi dan kebidanan. Harcourt Publishers Limited, Inggris Raya.
- Panáček, A., Kvítek, L., Prucek, R., Kolar, M., Vecerová, R., Pizúrová, N., Sharma, VK, Nevečná, Tj, Zboril, R., 2006. Nanopartikel koloid perak: sintesis, karakterisasi, dan aktivitas antibakterinya. J.Fis. kimia 110, 16248-16253.
- Pareek, V., Gupta, R., Panwar, J., 2018. Lakukan sifat fisika-kimia dari nanopartikel perak memutuskan interaksinya dengan media biologis pada akhirnya? Ulasan. Mater. Sains. Eng. C 90, 739-749.
- Petersen, HH, Nielsen, Jr, Heegaard, PMH, 2004. Aplikasi akut pengukuran protein fase dalam kimia klinis veteriner. Dokter hewan. Res. 35, 163-187.

- Potter, TJ, Guitian, J., Fishwick, J., Gordon, PJ, Sheldon, IM, 2010. Risiko faktor untuk endometritis klinis pada sapi perah postpartum Theriogenol. 74, 127-134.
- Sheldon, IM, Lewis, GS, LeBlanc, S., Gilbert, RO, 2006. Mendefinisikan postpartum penyakit tum uteri pada sapi. Teriogenol. 65, 1516-1530.
- Sheldon, IM, Noakes, DE, Rycroft, AN, Pfeiffer, DU, Dobson, H., 2002. Pengaruh kontaminasi bakteri uterus setelah partus pada seleksi folikel dominan ovarium dan pertumbuhan dan fungsi folikel pada sapi. Reproduksi 123, 837-845.
- Sheldon, IM, Price, SB, Cronin, J., Gilbert, RO, Gadsby, JE, 2009. Mekanisme-mekanisme Infertilitas Terkait Endometritis Klinis dan Subklinis pada Sapi Perah Berproduksi Tinggi. Reproduksi Dom. Animasi. 44, 1-9.
- Singh, J., Murray, RD, Mshelia, G., Woldehiwet, Z., 2008. Kekebalan status uterus sapi selama periode peripartum. Dokter hewan. J.175, 301-309.
- Singh, KP, Singh, B., Singh, SV, Singh, JP, Singh, P., Singh, HN, 2014. Evaluasi Antimikroba dalam Pengobatan dan Peningkatan Tingkat Konsepsi pada Sapi Persilangan Endometritik. Intas. Polivet. 15, 79-83.
- Tothova, CS, Nagy, O., Seidel, H., Kovac, G., 2012. Protein fase akut dalam kaitannya dengan berbagai penyakit radang pada anak sapi. Komp. Klinik. Patol. 21, 1037-1042.
- Tothova, CS, Nagy, O., Seidel, H., Kovac, G., 2014. Protein fase akut dan penggunaannya dalam diagnosis penyakit pada ruminansia: Review Vet. Med-Ceko 59, 163-180.
- Turner, ML, Healey, GD, Sheldon, IM, 2012. Kekebalan dan Peradangan di dalam rahim. Reproduksi Dom. Animasi. 47, 402-409.
- Yah, CS, Simate, GS, 2015. Nanopartikel sebagai generasi baru yang potensial agen antimikroba spektrum luas. DARU J.Pharm. Sains. 23, 1-14.
- Yakabe, Y., Sano, T., Ushio, H., Yasunaga, T., 1980. Studi kinetik dari interaksi antara ion perak dan asam deoksiribonukleat, Chem. Lett. 4, 373-376.

Artikel Penelitian

Endometritis yang Diinduksi Secara Eksperimen Merusak Kapasitas Pengembangan Oosit Bovine[†]

Mackenzie J. Dickson¹, Rachel L. Piersanti¹,
Rosabel Ramirez-Hernandez¹, Eduardo Barros de Oliveira¹,
Jeanette V. Bishop², Thomas R. Hansen², Zhengxin Ma¹, Kwang
Cheol C. Jeong¹, Jose EP Santos¹, Martin I. Sheldon³, Blok Jeremy
4 dan John J. Bromfield^{1,*}

¹Departemen Ilmu Klinis Hewan Besar, Universitas Florida, Gainesville FL, AS, ²Laboratorium Reproduksi dan Bioteknologi Hewan, Departemen Ilmu Biomedis, Fakultas Kedokteran Hewan dan Ilmu Biomedis, Colorado State University, Fort Collins, CO, USA, ³Institut Ilmu Kehidupan, Sekolah Kedokteran Universitas Swansea, Universitas Swansea, Swansea, Inggris dan ⁴OvaTech, Gainesville, FL, AS

* Korespondensi: Departemen Ilmu Hewan, Universitas Florida, PO Box 110910, Gainesville, FL 32611-0910, AS.

Telp: +1 (352)294-6991; E-mail: jbromfield@ufl.edu

[†]Dukungan Hibah: Studi ini didukung oleh Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development dari National Institutes of Health dengan Nomor Penghargaan R01HD084316. Isinya semata-mata tanggung jawab penulis dan tidak mewakili pandangan resmi National Institutes of Health. Presentasi konferensi: Dipresentasikan sebagian di Konferensi Discover ke-35 American Dairy Science Association, 29 Oktober–1 November 2018, Itasca, Illinois, dan Pertemuan Tahunan ke-52 Masyarakat untuk Studi Reproduksi, 18–21 Juli 2019, San Diego, California.

Diterima 5 Desember 2019; Revisi 1 Maret 2020; Keputusan Redaksi 7 Mei 2020; Diterima 11 Mei 2020

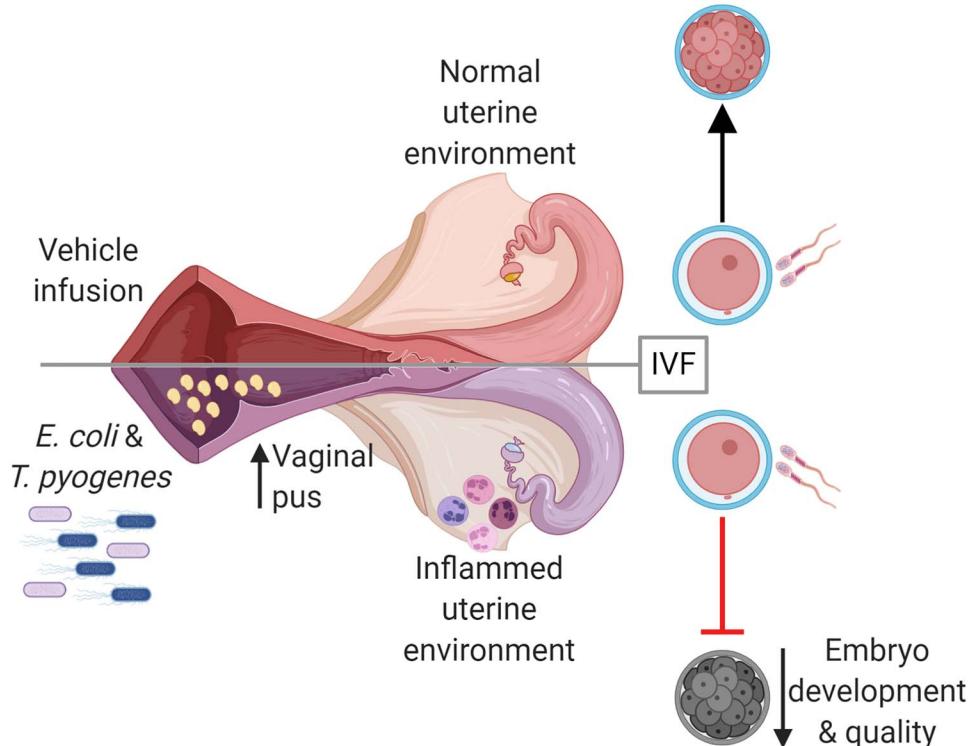
Abstrak

Infeksi rahim dikaitkan dengan infertilitas pada wanita dan sapi perah, bahkan setelah resolusi infeksi. Namun, mekanisme yang menyebabkan infertilitas persisten ini tidak jelas. Di sini, kami berhipotesis bahwa endometritis yang diinduksi pada sapi perah non-laktasi akan mengurangi kompetensi perkembangan oosit. Sapi Holstein yang tidak menyusui menerima infus bakteri patogen endometrium intrauterin (*Escherichia coli* dan *Trueperella pyogenes*; $n=12$) atau kontrol kendaraan ($n=11$) pada hari ke-2 siklus estrus. Infus bakteri meningkatkan ekspresi mediator inflamasi endometrium, dan sekret mukopurulen pada vagina memastikan terjadinya endometritis. Oosit dikumpulkan dengan pengambilan ovum yang dipandu ultrasound transvaginal pada hari ke 2, 24, 45, dan 66 setelah infus dan dilakukan fertilisasi in vitro dan kultur embrio. Infus bakteri menghasilkan lebih sedikit oosit yang dibelah yang berkembang menjadi morula dibandingkan dengan kontrol yang diinfus kendaraan (30,7 berbanding 45,0%), dengan efek terbesar yang diamati pada oosit yang dikumpulkan pada hari ke 24. Perkembangan menjadi morula berkorelasi terbalik dengan ekspresi endometrium/L6 pada hari ke 6. Ekspresi gen yang berhubungan dengan kualitas embrio tidak berbeda nyata antara morula sapi yang diinfus bakteri dan sapi kontrol. Inseminasi buatan 130 hari setelah infus intrauterin menghasilkan embrio normal berserabut yang menghasilkan interferon tau 16 hari setelah pembuahan pada kedua kelompok infus. Model infeksi uterus yang diinduksi secara eksperimental ini berhasil menghasilkan endometritis dan pengurangan proporsi oosit yang berkembang menjadi morula setelah fertilisasi in vitro. Kesimpulannya, endometritis mengurangi kapasitas oosit untuk berkembang menjadi morula.

Kalimat Ringkasan

Induksi infeksi rahim memiliki dampak jangka panjang pada oosit, mengurangi kapasitas oosit untuk berkembang menjadi embrio pada sapi perah.

Abstrak Grafis



Kata kunci: oosit, peradangan, infertilitas wanita, embrio, endometritis.

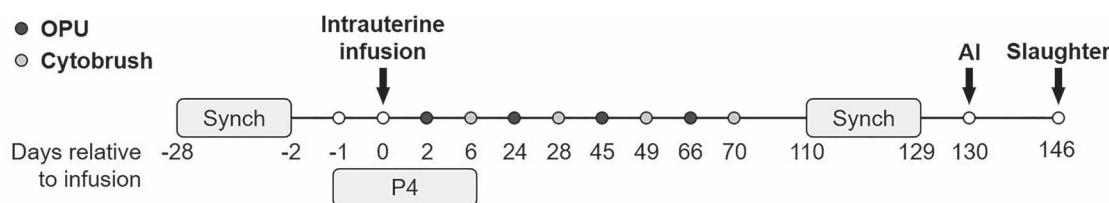
pengantar

Infeksi rahim pada wanita dan sapi perah berhubungan dengan penurunan kesuburan [1,2], namun mekanisme yang bertanggung jawab untuk infertilitas persisten tidak jelas. Diperkirakan 3,6 juta kasus infeksi gonore atau klamidia terjadi pada wanita setiap tahun di Amerika Serikat [3], dimana 10% menyebabkan penyakit radang panggul [4]. Infeksi bakteri pada saluran reproduksi dan penyakit radang panggul keduanya menyebabkan radang rahim [2,5]. Setiap kasus penyakit radang panggul menelan biaya sekitar \$3000 dan mengakibatkan tingginya angka rawat inap [6]. Demikian pula, infeksi bakteri pada uterus postpartum ada di mana-mana pada sapi perah, dengan hingga 40% sapi mengalami penyakit uterus klinis [1,7]. Sapi yang didiagnosis dengan penyakit rahim pasca persalinan lebih kecil kemungkinannya untuk bunting dan lebih mungkin untuk keguguran [8]. Penyakit rahim pada sapi menelan biaya sekitar \$900 juta per tahun di Amerika Serikat karena biaya pengobatan, kehilangan produksi susu, kemandulan, peningkatan pemusnahan, dan biaya penggantian sapi [1,9].

Meskipun infeksi terjadi di rahim, pensinyalan dan fungsi ovarium diubah pada sapi dengan infeksi rahim aktif. Sapi dengan penyakit rahim memiliki pertumbuhan folikel yang lebih lambat, gangguan ovulasi, dan siklus ovarium yang tertunda dan tidak teratur [10–12]. Menariknya, kemandulan pada sapi terbukti bahkan setelah resolusi penyakit, karena banyak sapi tetap tidak dapat hamil [13–15].

Bakteri gram negatif, *Escherichia coli*, dan bakteri gram positif, *Trueperella pyogenes*, adalah patogen umum yang menyebabkan endometritis klinis pada sapi perah [16]. Komponen membran luar dari bakteri Gram-negatif, termasuk lipopolisakarida (LPS), dapat dideteksi dalam cairan folikuler, dan konsentrasi LPS cairan folikuler berkorelasi dengan tingkat keparahan inflamasi uterus [17, 18]. Sel granulosa menghasilkan respon inflamasi terhadap LPS dan komponen bakteri lainnya secara in vitro, dan infeksi rahim mengubah transkriptom sel granulosa lama setelah pembersihan infeksi [17, 19]. Oosit yang dikultur dengan adanya komponen bakteri memiliki frekuensi kegagalan meiosis yang meningkat [13] dan penurunan kapasitas untuk berkembang menjadi blastokista [14]. Oosit adalah sumber daya yang terbatas di ovarium dan membutuhkan lebih dari 100 hari untuk berkembang dari folikel primordial hingga ovulasi [20, 21]; ini memungkinkan kemungkinan yang menarik bahwa oosit dapat terpengaruh selama infeksi rahim dan mengalami gangguan berkepanjangan yang dapat membahayakan kualitasnya dan memengaruhi kesuburan lama setelah resolusi infeksi.

Laktasi, keseimbangan energi negatif (ketika energi metabolismik yang dibutuhkan untuk pemeliharaan dan laktasi melebihi energi yang tersedia dari pakan), lingkungan uterus, dan penyakit postpartum umum dapat mempengaruhi fertilitas sapi perah postpartum. Untuk menguraikan efek infeksi rahim pada kualitas oosit dari



Gambar 1. Garis waktu peristiwa eksperimental besar. Siklus estrus disinkronkan dengan hormon pelepas gonadotropin dan prostaglandin F₂ sebelum infus intrauterin baik media pembawa kaldu LB (kendaraan; n=11) atau patogen *E.coli* dan *T.pyogenes* dalam kaldu LB (bakteri; n=12) pada hari percobaan 0. Peristiwa besar meliputi pengambilan oosit (OPU,-), sikat gigi endometrium () pengambilan sampel, inseminasi buatan (AI), pemberian progesteron (P4), dan penyembelihan. Timeline tidak ditarik ke skala.

faktor postpartum lainnya, kami secara eksperimental menginduksi endometritis pada sapi perah non-laktasi dan mengumpulkan oosit untuk menilai kapasitasnya untuk berkembang menjadi morula setelah fertilisasi in vitro dan kultur embrio. Kami berhipotesis bahwa induksi endometritis pada sapi perah nonlaktasi akan mengurangi kompetensi oosit untuk berkembang menjadi embrio setelah fertilisasi in vitro dan kultur embrio. Kami bertujuan untuk menetapkan infeksi pada sapi non-laktasi menggunakan bakteri patogen, menentukan dampak infeksi uterus pada kualitas oosit dan perkembangan embrio selanjutnya, dan menilai kemampuan sapi untuk hamil setelah inseminasi buatan.

Bahan dan metode

Komite Perawatan dan Penggunaan Hewan Institusi Universitas Florida menyetujui semua prosedur hewan (nomor protokol 201508884). Percobaan dilakukan dari Februari hingga Agustus 2018 di University of Florida Dairy Research Unit.

Protokol eksperimental dan pembentukan infeksi rahim

Pembentukan endometritis mengikuti protokol dari Piersanti et al. [22], dengan sedikit modifikasi (Gambar 1). Dua puluh tiga sapi Holstein laktasi pertama berumur 2 tahun terdaftar dalam penelitian ini. Sapi bebas dari penyakit klinis setelah persalinan (termasuk penyakit rahim) sebelum pendaftaran. Setidaknya 38 hari sebelum dimulainya penelitian, sapi divaksinasi terhadap diare virus bovine, rinotrakeitis sapi menular, parainfluenza, virus sinkronisasi pernapasan sapi, dan beberapa serovar Leptospira (Bovi-Shield Gold FP 5 VL5 HB; Zoetis, Parsippany, NJ) dan obat cacing menggunakan moxidectin (Cydectin; Bayer HealthCare, LLC, Animal Health Division, Shawnee Mission, KS). Laktasi diakhiri dalam 67 hari setelah melahirkan dan setidaknya 45 hari sebelum dimulainya penelitian dengan pemerahan terakhir dan perawatan intramammary dengan ceftiofur hidroklorida (Spectramast, Zoetis), diikuti dengan sealant puting (Orbeseal, Zoetis). Tidak ada sapi yang mengalami mastitis selama periode penelitian. Sapi dipelihara di padang rumput dan diberi makan ransum campuran total setiap hari dengan akses gratis ke air. Sapi diblokir pada hari-hari postpartum dan dibagi menjadi dua kohort yang terdiri dari dua kelompok infus (infus kendaraan atau bakteri intrauterin, lihat di bawah). Penugasan acak untuk salah satu kelompok perlakuan dilakukan untuk setiap blok dengan pembuatan nomor acak di Microsoft Excel.

Siklus estrus sapi disinkronkan (Gambar 1) menggunakan 100 µg GnRH (gonadorelin diacetate tetrahydrate; OvaCyst, Bayer) im, diikuti dengan 25 mg prostaglandin (PG) F₂α (dinoprost trometamin; Prostamate, Bayer) im 7 hari kemudian, diikuti oleh GnRH setelah 3 hari dan 10 hari, PGF₂α 7 hari kemudian, dan satu lagi, injeksi GnRH terakhir 56 jam setelah PGF₂α untuk merangsang ovulasi [23]. Progesteron (200 mg) dalam minyak jagung (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) diberikan kepada sapi setiap hari mulai dari hari terakhir GnRH

administrasi dan dilanjutkan selama 7 hari. Pada hari infus intrauterin (hari percobaan 0), sapi menerima anestesi epidural 60 mg lidokain hidroklorida 2% (Aspen Veterinary Resources, Greeley, CO) yang disuntikkan ke ruang intervertebral intercoccygeal. Alat kelamin luar dibersihkan dengan larutan Virkon 1% (DuPont, Wilmington, DE), diikuti dengan larutan chlorhexidine 1% (Aspen Veterinary Resources) dan etanol 70%. Kateter Neilson berselubung (450 mm; Supplies for Farmers, Lincolnshire, UK) dimasukkan secara transvaginal ke dalam saluran reproduksi dan dipandu ke dalam tubuh rahim melalui palpasi rektal. Begitu berada di tubuh rahim, selubung ditarik untuk mengekspos port kateter, yang diputar tiga kali terhadap lapisan endometrium untuk membersihkan endometrium sebelum infus intrauterin. Sapi yang mengandung bakteri (n=12) menerima 10 mL kaldu Luria-Bertani (LB) yang mengandung 5,05×10⁷CFU/mL *E.coli* MS499 dan 10 mL LB mengandung 3,65×10⁷CFU/mL dari *T.pyogenes* MS249, diikuti dengan 10 mL LB untuk membilas kateter. Sapi yang diinfus kendaraan (n=11) menerima infus intrauterin 30 mL kaldu LB.

Perbanyakan patogen *E.coli* dan *T.pyogenes* untuk infus intrauterin

Kultur bakteri disiapkan seperti yang dijelaskan sebelumnya oleh Piersanti et al. [22]. Secara singkat, *E.coli*/MS499 dikultur dari stok glicerol beku pada agar LB [24]. Sehari sebelum infus intrauterin, satu koloni bakteri diambil dari piring dan diinokulasi ke dalam kaldu LB yang mengandung 1% tripton, 0,5% ekstrak ragi, dan 1% natrium klorida. Kultur diinkubasi semalam pada suhu 37°C sambil dikocok dengan kecepatan 200 rpm. Sejarah, *T.pyogenes* MS249 ditumbuhkan dari stok glicerol beku pada agar darah kedelai trypticase pada suhu 37°C selama 48 jam [25]. Sehari sebelum infus intrauterin, satu koloni bakteri dipilih dan diinokulasi ke dalam kaldu Bacto Brain Heart Infusion (BHI; Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) ditambah dengan 5% serum janin sapi (Fisher Scientific) dan dibiakkan semalam pada suhu 37°C sambil dikocok dengan kecepatan 200 rpm. Pertumbuhan bakteri dipantau dengan mengukur kepadatan optik pada 600 nm. Persiapan akhir 5,05×10⁷CFU/mL

E.coli atau 3,65×10⁷CFU/mL dari *T.pyogenes* MS249 diencerkan dalam kaldu LB steril dan dimasukkan ke dalam jarum suntik 10 mL untuk infus. Untuk mengukur konsentrasi akhir dari sel bakteri yang diinfuskan, biakan bakteri yang diencerkan sepuluh kali lipat disepuh pada agar dan ditumbuhkan pada suhu 37°C untuk menghitung CFU. Kaldu LB steril untuk pembilasan kateter dan infus kendaraan dimasukkan ke dalam jarum suntik 10 mL. Infus diangkat ke peternakan di atas es.

Evaluasi infeksi rahim

Suhu rektal diukur (termometer AG-102, AG-Medix, Mukwonago, WI) antara pukul 07.00 dan 09.00 pada hari ke-2, 1, 3, 5, dan 10. Sampel lendir vagina dikumpulkan dan diperiksa dengan menggunakan sarung tangan yang bersih. tangan pada hari -2, 3, 5, 10, 14, 20, 28, 49, dan 70. Secara singkat, vulva dibersihkan dengan alkohol 70% dan dikeringkan dengan

kertas tisu. Lendir dikumpulkan dengan memasukkan tangan yang bersih dan bersarung tangan ke dalam vagina dan mengambil semua isi dari dinding vagina lateral, dorsal, dan ventral. Lendir dinilai pada skala 0-4 menurut Sheldon et al. [1], di mana grade 0 tidak ada mukus atau mukus bening/transparan; grade 1 adalah lendir yang mengandung bintik-bintik putih atau putih pucat; grade 2 mengandung mukus≤50% bahan mukopurulen putih atau putih pudar; grade 3 mengandung mukus >50% bahan purulen; dan grade 4 mengandung mukus>Bahan purulen 50% dan darah coklat tua.

Sampel cytobrush endometrium dikumpulkan pada hari ke 6, 28, 49 atau 50, dan 69 atau 70 (**Gambar 1**). Secara singkat, alat kelamin luar dibersihkan dengan larutan chlorhexidine 1% diikuti dengan etanol 70%. Dipandu oleh palpasi rektal, alat sikat gigi (Medscand Medical, Cooper Surgical, Trumbull, CT) yang terkandung dalam selubung logam dan ditutup dengan kamisol plastik dimasukkan ke dalam vagina dan melewati serviks. Kamisol plastik ditarik di atas alat yang memperlihatkan sikat ke endometrium. Kuas diputar tiga kali untuk mengumpulkan sel-sel endometrium sebelum ditarik ke dalam selubung logam dan dikeluarkan dari sapi. Cytobrush dioleskan pada slide kaca yang bersih untuk sitologi, dan kemudian kuas dibekukan dalam nitrogen cair dan disimpan pada suhu -80°C hingga digunakan untuk RT-PCR realtime. Untuk sitologi, slide dikeringkan dengan udara dan diwarnai dengan Rapid-Chrome Kwik-Diff (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) untuk menilai proporsi sel polimorfonuklear yang ada. Sebanyak 200 sel dihitung pada keduanya 10× dan 40× perbesaran pada mikroskop Nikon Optiphot (Nikon Instruments, Melville, NY), dan proporsi sel polimorfonuklear ditentukan.

Darah dikumpulkan melalui coccygeal venipuncture pada hari ke-2, 5, dan 145 ke dalam tabung yang dievakuasi yang mengandung lithium heparin (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) untuk pengumpulan plasma atau aktivator bekuan serum Z (Greiner Bio-One, Monroe, NC) untuk serum koleksi dan disentrifugasi selama 10 menit pada 2400×g pada suhu kamar, di-aliquot dan disimpan pada suhu -20°C. Plasma haptoglobin (Life Diagnostics, Inc., West Chester, PA) dan serum progesteron (DRG International, Springfield Township, NJ) dikuantifikasi menggunakan ELISA yang tersedia secara komersial sesuai dengan instruksi pabriknya. Koefisien variasi intra-assay haptoglobin dan progesteron adalah 4,2 dan 2,9%, dan batas deteksi masing-masing adalah 3,91 dan 0,3 ng/mL. Hormon anti-Müllerian serum (AMH) dikuantifikasi oleh laboratorium komersial (Ansh Labs, Webster, TX). Koefisien variasi intra-assay adalah 1,5% untuk konsentrasi tinggi (1721 pg/mL), 2,8% untuk konsentrasi sedang (687 pg/mL), dan 0,4% untuk konsentrasi rendah (336 pg/mL) serum sapi AMH kontrol. Koefisien variasi antar pengujian masing-masing adalah 9,3, 7,4, dan 5,7% untuk kontrol konsentrasi tinggi, sedang, dan rendah.

Aspirasi folikel untuk pengambilan oosit dan aborsi folikel

Untuk menilai dampak endometritis pada oosit dari waktu ke waktu, pengambilan oosit yang dipandu USG transvaginal dilakukan pada hari percobaan 2, 24, 45, dan 66 (**Gambar 1**). Di antara setiap prosedur pengambilan oosit, aborsi folikel dominan dilakukan 4 hari sebelum pengambilan oosit untuk memaksimalkan jumlah oosit yang dikumpulkan dan memfasilitasi sinkronisasi estrus. Singkatnya, sapi ditahan dan menerima anestesi epidural di ruang intervertebral intercoccygeal menggunakan xylazine 3 mg (AnaSed; Akorn, Lake Forest, IL) dan 60 mg lidokain hidroklorida 2%. Genitalia eksterna dibersihkan dengan larutan chlorhexidine 1%, diikuti dengan etanol 70%. Vagina dibilas tiga kali dengan lavage, pertama menggunakan 100 mL 0,5%

larutan klorheksidin dan kemudian dua kali dengan 100 mL saline 0,9% steril. Instrumen pengambilan oosit, termasuk probe ultrasonografi cembung 7,5 MHz (Pilihan Medis, Pasadena Selatan, FL) yang dilapisi dengan kamisol sekali pakai, dimasukkan ke dalam vagina menggunakan pelumas steril. Ovarium divisualisasikan dengan USG (Aloka SSD-500, Hitachi Healthcare Americas, Twinsburg, OH), dan jarum 18-gauge dan vakum digunakan untuk folikel dominan (>8 mm) aborsi atau folikel (<8 mm) aspirasi untuk pengambilan oosit. Aspirasi folikel dari folikel dominan (>8 mm) aborsi dibuang. Aspirasi folikel (<8 mm) dikumpulkan ke dalam media penjemputan ovum (IVF Bioscience, Falmouth, UK) dan kemudian disaring dan dibilas menggunakan filter pembilas embrio (Watanabe Tecnologia Aplicada, Brazil). Oosit diisolasi dan dicuci dalam tiga tetes 39-C HEPES-buffered oocyte maturation medium (IVF Bioscience) dan dimatangkan dalam botol kaca yang mengandung medium matursasi HEPES-buffered pada 38,5°C untuk 24±3 jam. Semua prosedur pematangan oosit, fertilisasi, dan kultur embrio dilakukan dengan menjaga oosit dan embrio berikutnya dari setiap sapi pada setiap waktu sebagai kelompok individu.

Fertilisasi in vitro dan kultur embrio

Setelah pematangan oosit, kelompok 1 hingga 12 oosit dipindahkan ke 100 µL tetes media BO-IVF yang dilapisi dengan minyak mineral ringan (IVF Bioscience). Oosit dibuahi dengan sperma dari Sire Monumen 014HO04784 (Pejantan Pilih, Kota Polos, OH) untuk menghasilkan konsentrasi akhir 2×10⁶ sperma/mL dan ditempatkan dalam inkubator yang dilembabkan pada 38,8°C dengan 6% O₂, 6% CO₂, dan seimbang N₂. Setelah 22±2 jam pembuahan, oosit dibilas dalam media pencuci oosit (IVF Bioscience), dan sel kumulus dihilangkan dengan pemipetan mekanis (CooperSurgical, Trumbull, CT). Selanjutnya, oosit dipindahkan ke 100 µL tetes media kultur embrio BO-IVC (IVF Bioscience) yang dilapisi dengan minyak mineral ringan. Embrio dikultur dalam kelompok 1 sampai 12 pada 38,8°C dalam lingkungan yang dilembabkan 6% O₂ dan 6% CO₂ dan N seimbang. Embrio dinilai pembelahannya 3,5 hari setelah pembuahan dan perkembangan menjadi morula 6 hari setelah pembuahan. Enam hari setelah pembuahan, morula dari masing-masing sapi dicuci tiga kali dalam DPBS yang mengandung polivinilpirolidon 0,2%, zona pelusida dihilangkan dalam larutan asam Tyrode (Sigma-Aldrich) dan dicuci tiga kali dalam DPBS sebelum dibekukan dalam nitrogen cair dan disimpan di

- 80°C. Perkembangan embrio dihentikan pada tahap morula, sebelum berdiferensiasi menjadi massa sel bagian dalam dan trofektoderm, untuk menganalisis populasi sel yang homogen.

Inseminasi buatan waktu tetap

Dimulai pada hari percobaan 110, siklus estrus sapi disinkronkan untuk inseminasi buatan waktu tetap (**Gambar 1**). Protokol sinkronisasi dimulai menggunakan PGF_{2α}, diikuti dengan injeksi GnRH 48 jam kemudian dan injeksi GnRH lainnya 6 hari kemudian, dua PGF berikutnya diinjeksi selang 24 jam, 1 minggu setelah injeksi GnRH sebelumnya, dan injeksi GnRH akhir 12 jam sebelum inseminasi. Pada percobaan hari ke 130, semua sapi diinseminasi dengan 500 µL semen dari pejantan Passat 7HO12659 (Pejantan Terpilih). Enam belas hari setelah inseminasi, sapi di-eutanasia pada hari percobaan 146 (detail di bawah) untuk memulihkan embrio dan mengumpulkan jaringan reproduksi.

Pengumpulan jaringan postmortem

Sapi di-eutanasia dengan captive bolt dan exsanguination 146 hari setelah infus intrauterin (16 hari setelah inseminasi;

Gambar 1. Saluran reproduksi dikumpulkan, ditempatkan di atas es, dan diproses dalam waktu 1 jam setelah penyembelihan. Kelebihan jaringan dipotong dan saluran reproduksi (serviks, rahim, saluran telur, dan ovarium) ditimbang. Tanduk uterus ipsilateral ke sisi ovulasi diidentifikasi oleh korpus luteum di ovarium. Ovarium dan saluran telur dikeluarkan untuk diproses lebih lanjut. Rahim dijepit dengan hemostat di dekat sambungan uterotubal dan di percabangan rahim. Tanduk ipsilateral dibilas dengan 20 mL saline 0,9% untuk mengumpulkan cairan uterus dan calon embrio. Tiga pembilasan uterus tambahan dilakukan untuk memaksimalkan potensi pemulihan embrio. Siram uterus pertama diperiksa untuk keberadaan embrio sebelum sentrifugasi selama 10 menit pada 1000×guntuk menghilangkan kotoran, dibekukan dalam nitrogen cair, dan disimpan pada suhu -80°C. Morfologi embrio dicatat sebelum pengambilan sampel bagian distal trofektoderm menggunakan jarum ukuran 20 yang bersih. Sampel trofektoderm dicuci dua kali dalam PBS, dibekukan dalam nitrogen cair, dan disimpan pada suhu -80°C.

Kuantifikasi interferon tau dalam cairan rahim

Kandungan interferon tau (IFNT) cairan rahim dihitung oleh ELISA (Bishop JV dan Hansen TR, tidak dipublikasikan bekerja sama dengan Perusahaan Biofarma). Secara singkat, IFNT sapi rekombinan glikosilasi dimurnikan dari kultur sel HEK manusia yang ditransformasikan dengan cDNA IFNT sapi (bTP509) dan digunakan untuk menghasilkan antibodi poliklonal pada kambing (#51; 3,5 µg/mL) dan pada kelinci (#5670; 9,6 µg /mL). Antibodi ini masing-masing digunakan sebagai antibodi penangkap dan pendekripsi biotinilasi, dalam sandwich ELISA. ELISA memiliki rentang deteksi 7,8–500 pg/mL dan batas deteksi 61 pg/mL. Koefisien variasi intra-assay adalah 0–1,4% untuk konsentrasi tinggi (500 pg/mL), 0–3,9% untuk konsentrasi sedang (100 pg/mL), dan 0,9–2,2% untuk konsentrasi rendah (20 pg/mL).) kontrol IFNT sapi rekombinan. Koefisien variasi antar pengujian adalah 1,1, 1,6, dan 1,8% masing-masing untuk kontrol konsentrasi tinggi, sedang, dan rendah. ELISA secara khusus mendeteksi IFNT dan tidak bereaksi silang dengan IFN α , IFN α/β , atau IFN γ . Sampel diuji tanpa diencerkan atau diencerkan dalam serum kemudi 1:10, 1:100, 1:1000, 1:5000, atau 1:10 000 untuk mendeteksi IFNT dalam rentang linier pengujian. Operator buta terhadap perlakuan sampel yang sedang diuji. Sampel di bawah batas deteksi diberi konsentrasi 61 pg/mL untuk analisis statistik.

Ekstraksi RNA dan RT-PCR waktu nyata

Total RNA diekstraksi dari sampel cytobrush dan trophectoderm menggunakan metode Trizol (Life Technologies, Carlsbad, CA). Total RNA diekstraksi dari morula yang dikumpulkan dari satu sapi pada setiap titik waktu menggunakan RNeasy Micro Kit sesuai dengan instruksi pabrik (Qiagen, Hilden, Jerman). Transkripsi terbalik dilakukan menggunakan kit sintesis Verso cDNA (Thermo Fisher Scientific). Morula cDNA menjalani pra-amplifikasi selektif tambahan menggunakan SsoAdvanced PreAmp Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA) sebelum RT-PCR real-time.

Primer dirancang menggunakan database NCBI (**Tabel 1**). Efisiensi amplifikasi untuk setiap pasangan primer dievaluasi dan memenuhi pedoman MIQE \geq 0,98 dan efisiensi 90–110% [26]. RT-PCR waktu nyata dilakukan dalam rangkap dua menggunakan protokol PCR dua langkah untuk sampel sitobrush dan protokol tiga langkah untuk morula dan trofektoderm. Setiap reaksi 20 µL terdiri dari 500 nM dari masing-masing primer maju dan mundur dan iTaq Universal SYBR Green Master Mix (Bio-Rad) dan cDNA. Sebuah Bio-Rad CFX Connect light cycler (Bio-Rad) digunakan dengan tahap denaturasi awal pada 95°C selama 30 detik

diikuti oleh 40 siklus pada 95°C selama 5 detik, suhu anil spesifik (**Tabel 1**) selama 10 detik, dan ekstensi akhir pada 60°C selama 30 detik. Kontrol negatif tanpa templat digunakan sebagai pengganti cDNA untuk menentukan amplifikasi nonspesifik untuk setiap pasangan primer. Ekspresi relatif untuk gen yang diinginkan dihitung menggunakan 2 $^{-\Delta\Delta C_t}$ metode relatif terhadap gen rumah tangga yang dipilih (*GAPDH*untuk data cytobrush endometrium; rata-rata geometris dari *GAPDH*, *RPL19*, dan *SDHA*untuk data morula; dan rata-rata geometris dari *ACTB*dan *GAPDH*untuk data trofektoderm). Ekspresi gen referensi stabil di seluruh perawatan eksperimental ($P>0,05$).

Analisis statistik

Suhu rektal, haptoglobin, jumlah sel polimorfonuklear, progesteron, AMH, ekspresi gen, dan IFNT dianalisis menggunakan SPSS v25 (IBM Corporation, Armonk, NY). Data dianalisis dengan model campuran linier umum dengan tindakan berulang (jika ada) dan struktur kovarians autoregresif. Efek tetap dari perlakuan, hari, dan interaksi dianalisis menggunakan perbandingan berpasangan. Analisis pengobatan menggabungkan semua hari dan hanya mempelajari efek infus bakteri, sedangkan analisis perawatan gabungan hari dan hanya menilai efek setiap hari terlepas dari pengobatan. Suhu rektal dan haptoglobin masing-masing memiliki titik data pra-infus (hari -2) yang digunakan sebagai kovariat. Ekspresi gen dan data haptoglobin ditransformasi log untuk normalitas. Tingkat lendir vagina, pembelahan oosit, dan data perkembangan morula dianalisis masing-masing menggunakan regresi logistik dengan distribusi Poisson dan binomial, dengan prosedur GLIMMIX di SAS (SAS Institute, Cary, NC). Sapi dalam perlakuan dianggap sebagai efek acak, dan efek tetap dari perlakuan, hari, dan interaksi dianalisis. Bobot karkas, bobot uterus, diameter korpus luteum, dan jumlah embrio yang dikumpulkan saat penyembelihan dianalisis menggunakan fungsi uji-t dua arah dalam GraphPad Prism 7.04 (GraphPad Software, La Jolla, CA). Signifikansi statistik ditetapkan pada diameter korpus luteum, dan jumlah embrio yang dikumpulkan saat penyembelihan dianalisis menggunakan fungsi uji-t dua arah dalam GraphPad Prism 7.04 (GraphPad Software, La Jolla, CA). Signifikansi statistik ditetapkan pada $P\leq 0,05$.

Hasil

Pembentukan infeksi rahim

Infus intrauterin endometritis klinis yang diinduksi oleh bakteri, seperti yang ditentukan oleh peningkatan kadar lendir vagina dibandingkan dengan infus kendaraan ($P\leq 0,05$; **Gambar 2A**). Meskipun proporsi sapi dengan sel polimorfonuklear yang ada dalam sampel sitologi uterus pada hari ke 6 tidak berbeda antara perlakuan, sel polimorfonuklear terdeteksi pada 5 dari 12 sapi yang diinfus bakteri dan hanya 1 dari 11 sapi yang diinfus kendaraan. $P>0,05$; **Gambar 2B**). Sapi yang diinfus bakteri tidak mengalami peningkatan suhu rektal dibandingkan dengan sapi yang diinfus kendaraan, dan tidak ada sapi yang menunjukkan demam. $>39.5^{\circ}\text{C}$, $P>0,05$; **Gambar 2C**). Konsentrasi haptoglobin yang bersirkulasi pada hari ke 5 tidak meningkat secara signifikan dengan infus bakteri dibandingkan dengan infus kendaraan ($P>0,05$; **Gambar 2D**), tetapi empat konsentrasi tertinggi semuanya ada pada kelompok infus bakteri. Bersama-sama data ini menunjukkan bahwa endometritis klinis diinduksi oleh infus bakteri tanpa menyebabkan penyakit sistemik.

Peradangan endometrium dievaluasi menggunakan sampel yang dikumpulkan pada hari ke 6, 28, 49, dan 70 (**Gambar 3**). Ekspresi endometrium *CXCL8*, *IL1B*, *IL6*, *PTGS2*, dan *TNF*meningkat ($P\leq 0,05$; **Gambar 3B – D, F, dan G**) pada hari ke 6 pada sapi yang diinfus bakteri dibandingkan dengan kontrol yang diinfus kendaraan. Ekspresi endometrium *IL1B* dan *PTGS2*tetap meningkat pada hari ke 28 pada sapi yang diinfus bakteri dibandingkan dengan kontrol yang diinfus kendaraan ($P\leq 0,05$; **Gambar 3C dan F**).

Tabel 1. Urutan primer dan kondisi anil digunakan untuk RT-PCR waktu nyata.

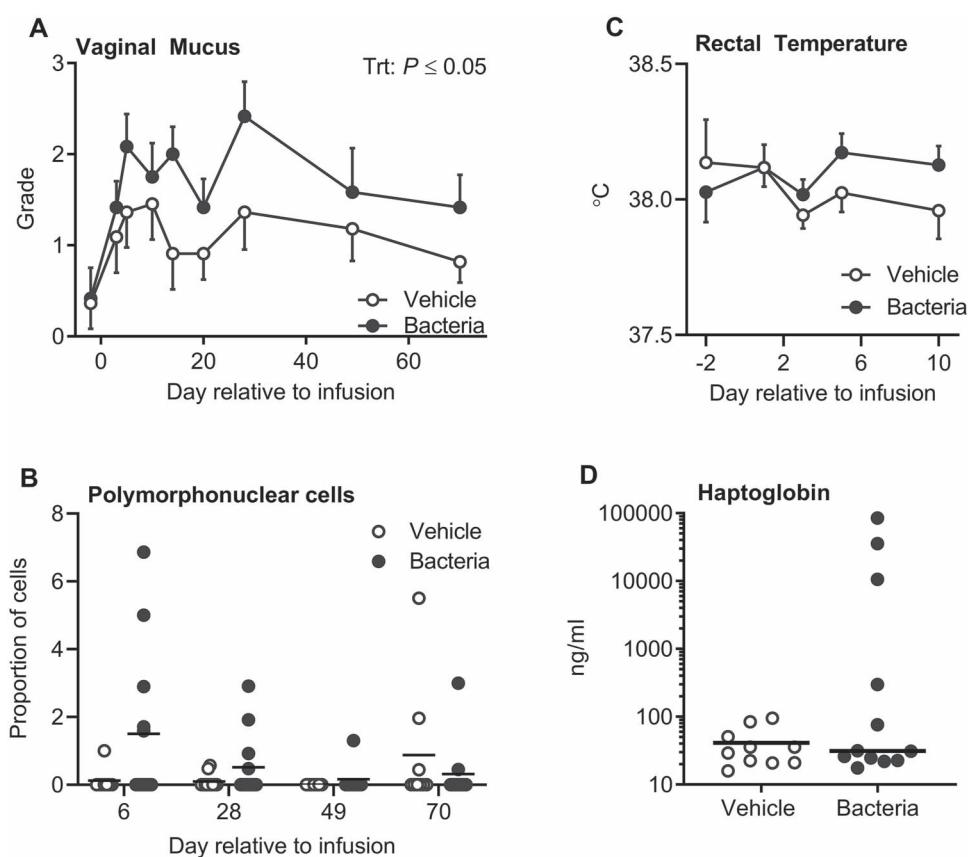
Simbol Gen	Urutan primer	Suhu anil (-C)	Nomor aksesi
<i>ACTB</i>	5'-TTGCCCTTAGGGTTCAGG 3'- CAGAAGCACTCGTACGTGGG 5'-	60	NM_173979.3
<i>AKR1C4</i>	TGCAACCAGGTGGAATGTCA 3'- ACCCATTCTTTAGTCGTTGGGA 5'-	60	NM_181027.2
<i>BAX</i>	CAGGGTGGTTGGGACGG 3'- CTTCCAGATGGTGAGCGAGG 5'-	60	NM_173894.1
<i>BCL2</i>	GAGTCGGAGGGTCATGTG 3'- ACAAAGGCCTCCCAGCG 5'-	60	NM_001166486.1
<i>CDKN1C</i>	GCCTCTCATCTCGACTTCT 3'- CCCAGGAACCTCGTTCGAC 5'-	60	NM_001077903.2
<i>CXCL8</i>	GCAGGTATTGTGAAGAGAGCTG 3'- CACAGAACATGAGGCACTGAA 5'-	60	NM_173925.2
<i>DNMT3A</i>	CCATGTACCGCAAGGCTATCTA 3'- CCTGTCATGGCACATTGGAA 5'-	60	XM_024998.68.1
<i>GAPDH</i>	AGGTGGAGTGAACGGATTG 3'- ATGGCGACGATGTCCACTT 5'-	60	NM_001034034.2
<i>HSPA1A</i>	GACAAGTGCCAGGAGGTGATT 3'- CAGTCTGCTGATGATGGGGTTA 5'-	60	NM_203322.3
<i>IFNT2</i>	TCCATGAGATGCTCAGCAGT 3'- TGTTGGAGCCCAGTGCAGA 5'-	60	NM_001015511.4
<i>IGF2R</i>	CAGGCTTGCAACTGGTGTATGA 3'- TTGTCCAGGGAGATCAGCATG 5'-	60	NM_174352.2
<i>IL1B</i>	CTTCATTGCCAGGTTTCTG 3'- CAGGTGTTGGATGCAGCTCT 5'-	60	NM_174093.1
<i>IL6</i>	ATGACTCTGCTTCCCTACCC 3'- GCTGCTTCACACTCATCATTC 5'-	60	NM_173923.2
<i>PPARG</i>	ATTATTCTCAGTGGAGACGCC 3'- CAAGGCTTGAGCAGATTGT 5'-	60	NM_181024.2
<i>PTGES</i>	GCTCGGAAGAAGGCTTTG 3'- AAAGCCCAGGAACAGGAAGG 5'-	60	NM_174443.2
<i>PTGS2</i>	CGTAAAGGCTGTCCCTTA 3'- ATCTAGTCCAGAGTGGGAAGAG 5'-	62	NM_001105323.1
<i>PTPRC</i>	CTCGATGTTAACGAGAGGAAT 3'- TCTTCATCTTCCACGCAGTCTA 5'-	56	NM_001206523.1
<i>RPL19</i>	ATGCCAACTCCGCCAGCAGAT 3'- TGTTTTCCGGCATCGAGCCCG 5'-	60	NM_001040516.2
<i>SDHA</i>	GGAACACTGACCTGGTGAG 3'- GGAACACTGACCTGGTGAG 5'-	60	NM_174178.2
<i>SLC2A1</i>	AGCGTCATCTCATCCCAGC 3'- AGCTTCTCAGCACGCTCT 5'-	60	NM_174602.2
<i>TNF</i>	CACATACCTGCCACAAGGC 3'- CTGGGACTGCTTCCCTCT	62	NM_173966.3

Ekspresi endometrium *TNF* meningkat pada sapi yang diinfus bakteri dibandingkan dengan kontrol kendaraan secara keseluruhan ($P \leq 0,05$; **Gambar 3H**), ketika *AKR1C4*, *CXCL8*, *IL1B*, *IL6*, *PTGES*, *PTGS2*, *PTPRC*, dan *TNF* ekspresi dipengaruhi oleh hari relatif terhadap infus ($P \leq 0,05$; **Gambar 3A – H**), dan *CXCL8*, *IL6*, dan *PTGS2* ekspresi dipengaruhi oleh interaksi antara pengobatan dan hari relatif terhadap infus ($P \leq 0,05$; **Gambar 3B, D, dan F**). Ekspresi dari *CXCL8*, *IL1B*, *IL6*, *PTGES*, dan *TNF* berbeda pada hari ke 6 dibandingkan dengan hari ke 28, 49, dan 70, sedangkan *PTGES*, *PTGS2*, *PTPRC*, dan *TNF* ekspresi berbeda pada hari ke 28 dibandingkan dengan hari ke 49 dan 70. Ekspresi *PTGS2* berbeda pada hari ke 6 dibandingkan dengan hari ke 28, sedangkan ekspresi *AKR1C4* berbeda pada hari ke 6 dan 28 dibandingkan dengan hari ke 70. Terakhir, ekspresi dari *PTPRC* berbeda pada hari ke 6 dibandingkan dengan hari ke 49 dan 70, sedangkan ekspresi *IL1B* pada hari ke 70 berbeda dengan hari ke 28 dan 49. Temuan ini

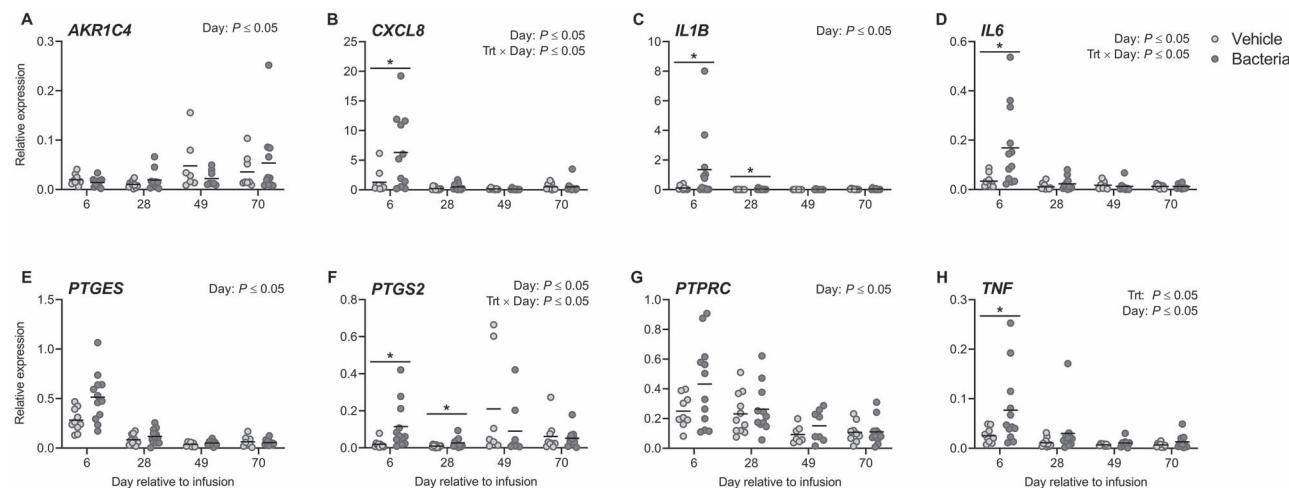
memberikan bukti lebih lanjut endometritis pada sapi yang diinfus bakteri.

Kompetensi perkembangan oosit setelah fertilisasi *in vitro*

Oosit dikumpulkan dari sapi dengan aspirasi folikel (<8 mm) pada hari ke-2, 24, 45, dan 66. Tidak ada dampak infus intrauterin pada jumlah total oosit yang dikumpulkan (kendaraan: $n=438$, vs. bakteri: $n=493$; $P > 0,05$). Ada variabilitas dalam jumlah oosit (kisaran 1 hingga 26) yang dikumpulkan dari setiap sapi pada titik tertentu, dengan rata-rata $10,7 \pm 1,0$ oosit dikumpulkan dari sapi yang diinfus kendaraan dan $10,7 \pm 0,9$ oosit dikumpulkan dari sapi yang diinfus bakteri pada setiap titik waktu (**Tambahan Gambar 1**). Setelah IVF, tingkat pembelahan keseluruhan oosit pada hari ke 3,5 pascafertilisasi adalah



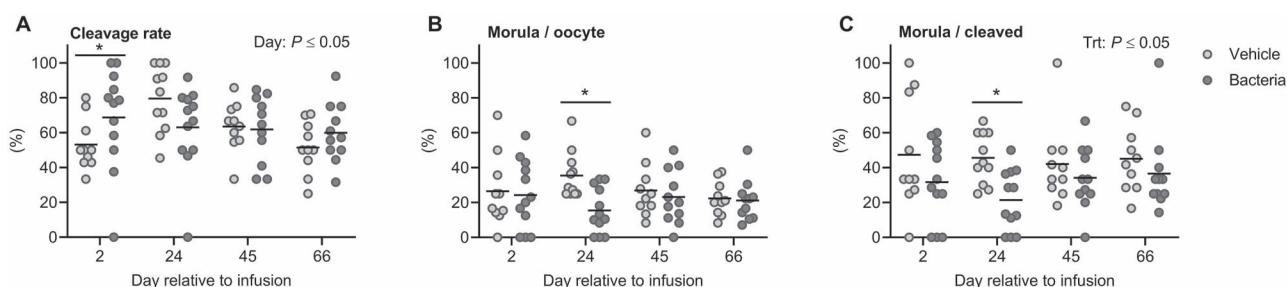
Gambar 2.Pembentukan dan kuantifikasi penyakit rahim. Lendir vagina (A) dikumpulkan dan dinilai pada skala 0 sampai 4 berdasarkan adanya sekret mukopurulen. Data adalah nilai rata-rata \pm SEM. Proporsi sel polimorfonuklear dalam sampel sitologi (B) dinilai dengan total 200 sel per sapi. Setiap titik mewakili seekor sapi dan garis padat mewakili rata-rata. Suhu rektal (C) ditampilkan sebagai rata-rata \pm SEM. Haptoglobin plasma (D) dievaluasi pada hari ke 5 relatif terhadap infus, dan setiap titik mewakili seekor sapi individu dan garis padat mewakili rata-rata.



Gambar 3.Ekspresi endometrium dari mediator inflamasi setelah infus intrauterin. Ekspresi dari *AKR1C4*(SEBUAH), *CXCL8*(B), *IL1B*(C), *IL6*(D), *PTGES*(E), *PTGS2*(F), *PTPRC*(G), dan *TNF*(H) dalam sampel cytobrush dievaluasi dengan RT-PCR real-time. Data disajikan sebagai ekspresi relatif terhadap *GAPDH*. Setiap titik mewakili satu sapi dan garis padat menunjukkan rata-rata. Perbandingan antar perlakuan pada hari tertentu ditunjukkan dengan*Kapan $P\leq 0,05$.

62,9 \pm 2,2% (Gambar 4A), dan tidak ada perbedaan angka pembelahan oosit antar kelompok perlakuan (bakteri: 63,5 \pm 3,3%, kendaraan: 62,3 \pm 3,0%, masing-masing; $P>0,05$). Namun, hari pengumpulan oosit terpengaruh ($P\leq 0,05$) tingkat pembelahan oosit,

menghasilkan peningkatan kecepatan pembelahan oosit pada kelompok yang diinfus bakteri dibandingkan dengan infus kendaraan pada hari ke-2 (68,7 \pm 8,4 dan 53,1 \pm 4,6%, masing-masing; $P\leq 0,05$). Proporsi keseluruhan oosit untuk berkembang menjadi morula adalah 24,3 \pm 1,7% (Gambar 4B),



Gambar 4.Efek infus intrauterin pada kapasitas perkembangan oosit setelah fertilisasi in vitro dan kultur embrio. Oosit dikumpulkan melalui pengambilan oosit transvaginal yang dipandu ultrasound pada hari ke 2, 24, 45, dan 66 relatif terhadap infus media kendaraan kaldu LB (kendaraan; $n=11$) atau patogen *E.coli* dan *T.pyogenes* dalam kaldu LB (bakteri; $n=12$) dan mengalami fertilisasi in vitro dan kultur embrio. Kumpulan oosit dari masing-masing sapi dipertahankan sebagai replikasi individu selama inseminasi dan kultur. Setiap titik mewakili sapi individual, dan garis tebal mewakili rata-rata perlakuan. Proporsi oosit yang membela 3,5 hari pasca inseminasi (A), proporsi oosit yang berkembang menjadi morula 6 hari pasca inseminasi (B), dan proporsi oosit yang membela berkembang menjadi morula 6 hari pasca inseminasi (C) ditampilkan. Perbandingan antar perlakuan pada hari tertentu ditunjukkan dengan *Kapan $P \leq 0,05$.

sedangkan proporsi keseluruhan oosit yang dibela untuk berkembang menjadi morula adalah $37,5 \pm 2,4\%$ (Gambar 4C). Proporsi oosit yang berkembang menjadi morula tidak dipengaruhi oleh infus bakteri, hari pengambilan oosit, atau interaksi antara keduanya. Namun, oosit yang dikumpulkan dari sapi yang diinfus bakteri pada hari ke 24 memiliki kapasitas yang lebih rendah untuk berkembang menjadi morula dibandingkan dengan yang dikumpulkan dari sapi yang diinfus kendaraan ($15,5 \pm 3,8$ dan $35,4 \pm 4,0\%$, masing-masing; $P \leq 0,05$). Infus bakteri mengurangi proporsi keseluruhan oosit yang dibela untuk berkembang menjadi morula dibandingkan dengan infus kendaraan ($30,7 \pm 3,0$ dan $45,0 \pm 1,1\%$, masing-masing; $P \leq 0,05$; Gambar 4C). Secara khusus, infus bakteri mengurangi proporsi oosit yang dibela untuk berkembang menjadi morula hari ke 24 dibandingkan dengan infus kendaraan ($21,4 \pm 5,0$ dan $45,6 \pm 4,4\%$, masing-masing; $P \leq 0,05$).

Penanda kualitas embrio dinilai dengan RT-PCR real-time menggunakan kumpulan morula yang berasal dari satu ekor sapi pada satu titik waktu (Gambar 5). Gen yang terkait dengan respons stres (*HSPA1A*), pensinyalan faktor pertumbuhan dan metabolisme (*IGF2R*, *SLC2A1*), apoptosis (*BAX*, *BCL2*), dan metilasi DNA (*DNMT3A*) dianalisis. Infus bakteri tidak secara signifikan mengubah ekspresi gen apa pun yang terkait dengan kualitas embrio ($P > 0,05$; Gambar 5A–F). Ekspresi dari *HSPA1A* meningkat 112% pada morula yang dikembangkan dari sapi yang diinfus bakteri dibandingkan dengan sapi yang diinfus kendaraan ($P = 0,08$; Gambar 5D). Hari pengumpulan oosit mempengaruhi ekspresi *BAX* dan *DNMT3A* ($P \leq 0,05$; Gambar 5A dan C). Ekspresi dari *BAX* pada hari ke 2 dan 24 berbeda dengan hari ke 45 dan 66. *DNMT3A* ekspresi berbeda pada hari 45 dibandingkan dengan hari 24 dan 66.

Hubungan antara perkembangan morula embrio yang terbelah dan ekspresi mediator inflamasi endometrium pada hari ke-6 dievaluasi untuk semua sapi (Gambar 6). Ada hubungan negatif antara ekspresi endometrium/*IL6* dan kapasitas oosit yang dibela untuk berkembang menjadi morula ($P \leq 0,05$, $r_s = -0,05$; Gambar 6C). Tidak ada hubungan antara ekspresi endometrium *CXCL8*, *IL1B*, *PTGES*, *PTGS2*, atau *TNF* dan kapasitas oosit yang dibela untuk berkembang menjadi morula ($P > 0,05$; Gambar 6A, B, dan D–F).

Pengaruh infus intrauterin pada perkembangan embrio in vivo

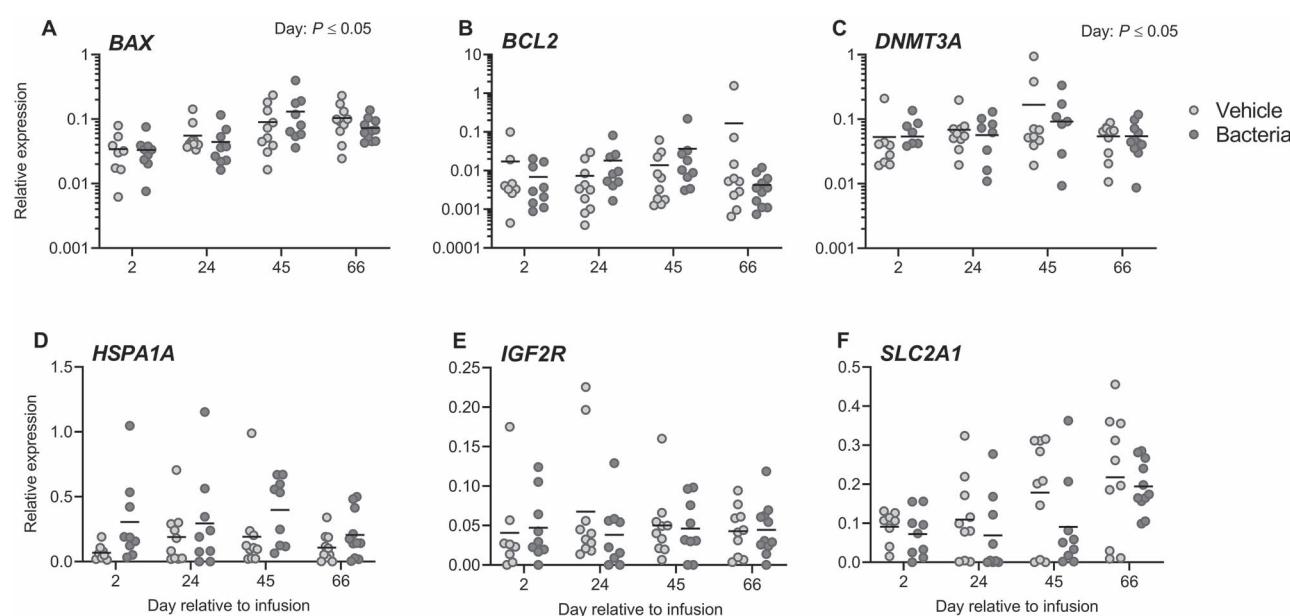
Sapi diinseminasi pada hari ke 130, mengikuti sinkronisasi estrus (Gambar 1). Enam belas hari pasca-inseminasi, sapi-sapi di-eutanasia, dan isi rahim dikumpulkan dengan pembilasan rahim. Bobot karkas gantung panas untuk kendaraan dan sapi yang diinfus bakteri

tidak berbeda ($363,9 \pm 6,6$ versus $368,9 \pm 8,0$ kg; $P > 0,05$), dan bobot total saluran reproduksi tidak berbeda antar perlakuan (vehicle: 466 ± 16 g, vs. bakteri: 449 ± 17 g; $P > 0,05$). Sebuah corpus luteum hadir di semua sapi di euthanasia menunjukkan respon positif terhadap sinkronisasi (diameter corpus luteum adalah $22,6 \pm 0,8$ dan $22,5 \pm 0,5$ mm pada kendaraan dan sapi yang diinfus bakteri, masing-masing, $P > 0,05$). Sebanyak 12 embrio filamen (kendaraan = 6 dari 11, bakteri = 6 dari 12) ditemukan 16 hari setelah inseminasi (Gambar 7A). Tidak mungkin mengukur panjang setiap konsepsi karena fragmentasi. Interferon tau diukur pada semua sampel cairan rahim dan terdeteksi pada 17 dari 23 sampel (kendaraan = 8 dari 11, bakteri = 9 dari 12). Konsentrasi IFNT cairan uterus berkisar antara 0,086 hingga 6858 ng/mL dan tidak berbeda antara sapi yang diinfus bakteri dan sapi yang diinfus kendaraan ($P > 0,05$, Gambar 7B). Tidak ada pengaruh infus terhadap serum progesteron pada hari ke 15 pasca inseminasi ($P > 0,05$; Gambar 7C), 1 hari sebelum eutanasia. Tidak ada pengaruh yang signifikan dari infus pada konsentrasi serum AMH dari –2 hingga 145 hari ($P > 0,05$; Gambar 7D). Tidak ada efek infus pada ekspresi trofektoderm *CDKN1C*, *IFNT2*, atau *PPARG* pada hari ke-16 embrio ($P > 0,05$; Angka 8).

Diskusi

Infertilitas berlanjut setelah resolusi infeksi rahim [1,2,15]. Wanita dan sapi yang sebelumnya didiagnosis dengan infeksi rahim memiliki tingkat konsepsi yang lebih rendah dibandingkan rekan yang sehat.^{2,13} Namun, penyebab di balik infertilitas terkait infeksi rahim tetap sulit dipahami. Infeksi rahim mengubah lingkungan rahim dan fungsi ovarium [11,27]. Untuk menentukan dampak infeksi rahim pada oosit, penelitian ini menguji hipotesis bahwa endometritis mengurangi kapasitas oosit untuk berkembang menjadi embrio yang terlepas dari lingkungan rahim yang terganggu. Eksperimen kami berhasil menginduksi endometritis pada sapi non-laktasi, dan kami menemukan penurunan kapasitas oosit untuk berkembang ke tahap morula selama fertilisasi dan kultur in vitro. Temuan ini menunjukkan bahwa infeksi rahim meninggalkan dampak jangka panjang pada oosit, bahkan setelah infeksi dibersihkan.

Oosit telah terbukti memiliki pengaruh yang lebih besar pada perkembangan blastokista di masa depan jika dibandingkan dengan kondisi kultur atau kontribusi sperma.²⁸ Kami berhasil mengumpulkan oosit



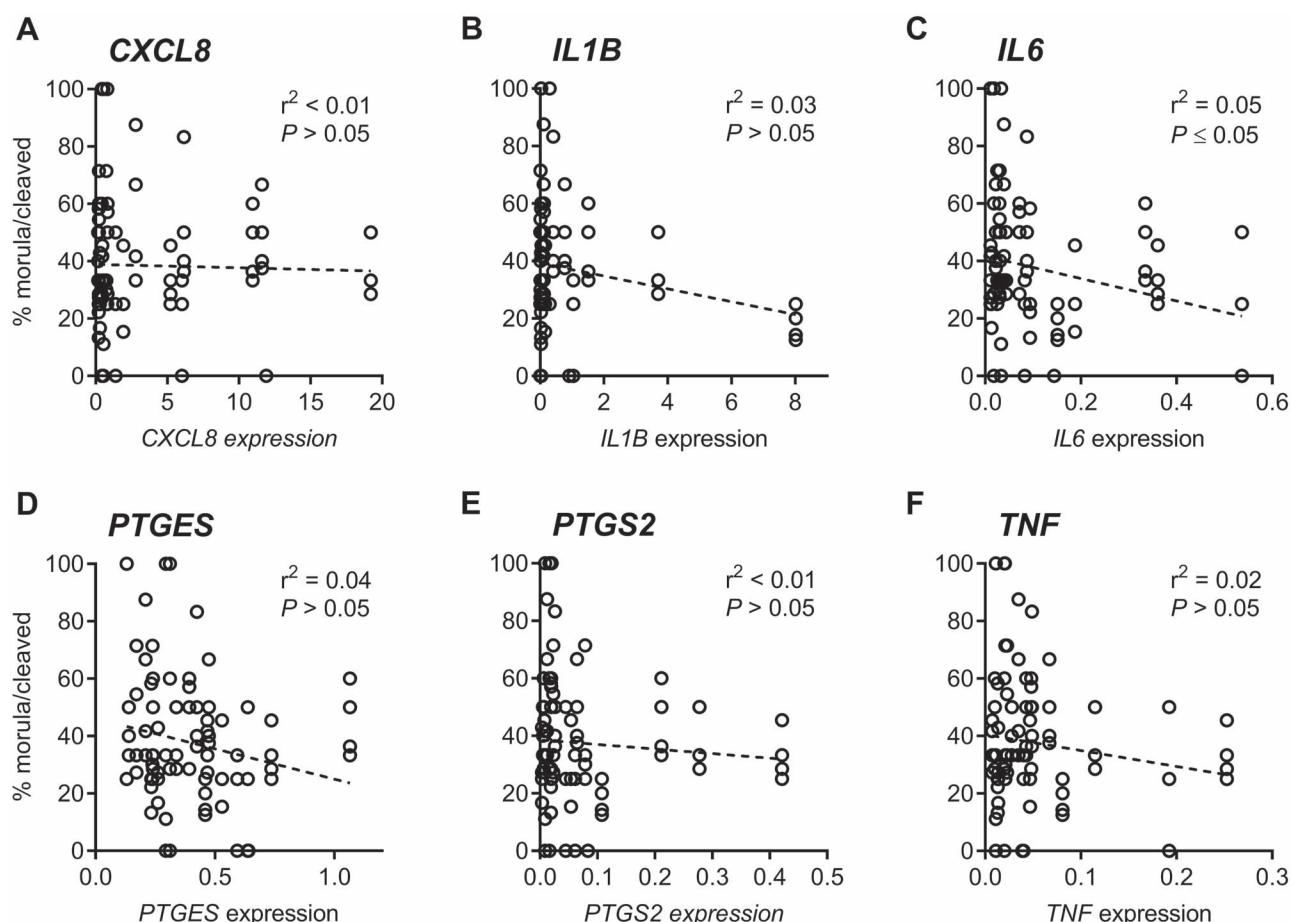
Gambar 5.Efek infus intrauterin pada ekspresi gen embrio tahap morula turunan IVF. Embrio tahap morula diperoleh dengan pengambilan oosit, fertilisasi in vitro, dan kultur embrio dari sapi yang menerima infus intrauterin baik media pembawa kaldu LB (kendaraan; n=11) atau patogen *E.coli* dan *T.pyogenes* dalam kaldu LB (bakteri; n=12) diperiksa untuk ekspresi gen *BAX*(SEBUAH), *BCL2*(B), *DNMT3A*(C), *HSPA1A*(D), *IGF2R*(E) dan *SLC2A1*(F) dengan RT-PCR waktu-nyata. Data disajikan sebagai ekspresi relatif terhadap rata-rata geometris gen rumah tangga *GAPDH*, *SDHA*, dan *RLP19*. Setiap titik mewakili ekspresi rata-rata untuk masing-masing sapi, dan garis padat mewakili rata-rata perlakuan.

dari semua sapi, dan tidak ada dampak infeksi rahim pada jumlah oosit yang pulih atau tingkat pembuahan; namun, ada variabilitas dalam jumlah oosit yang dikumpulkan dari setiap sapi, tetapi hal ini dikoreksi saat menilai kompetensi perkembangan menggunakan pendekatan statistik kami. Secara keseluruhan, lebih sedikit zigot putatif yang dibelah berkembang menjadi morula ketika oosit dikumpulkan dari sapi yang diinfus bakteri. Jadi, meskipun tingkat pembelahan meningkat pada oosit yang dikumpulkan dari sapi 2 hari setelah infus bakteri, kemampuan relatif untuk melanjutkan perkembangan menjadi morula berkurang dibandingkan dengan sapi yang diinfus kendaraan. Pengurangan terbesar dalam kompetensi perkembangan diamati ketika oosit dikumpulkan 24 hari setelah infus bakteri, setelah peradangan endometrium teratas [29]. Semua oosit yang dikumpulkan untuk fertilisasi in vitro dan kultur embrio dikumpulkan pada tahap folikel antral kecil (<8 mm), 4 hari setelah ablasi folikel dominan, dan kira-kira 20 hari sebelum potensi ovulasi. Dengan demikian, garis waktu perkembangan folikel menunjukkan bahwa folikel antral kecil yang diaspirasi dari hari ke 24 dan seterusnya kemungkinan berada pada tahap sekunder perkembangan folikel pada saat infus intrauterin. Oosit yang terkumpul pada hari ke-24 kemungkinan besar sedang dalam proses pembentukan antrum pada saat infus uterus. Oosit yang dikumpulkan pada hari ke 45 atau 66 akan menjadi folikel tahap sekunder awal pada saat infus rahim. Sementara perkembangan embrio berkurang secara numerik pada hari ke 45 dan 66, peningkatan penurunan kompetensi perkembangan pada hari ke 24 menunjukkan bahwa tahap spesifik folikel lebih rentan terhadap kerusakan akibat infeksi rahim. Pemulihan dari infertilitas setelah endometritis mungkin memerlukan waktu yang lama untuk membersihkan oosit/folikel yang terkena dampak negatif. Namun, metritis spontan menyebabkan perubahan transkripsi pada sel granulosa folikel dominan 63 hari postpartum [17] dan dengan demikian

mungkin memerlukan waktu yang lebih lama untuk memulihkan kesehatan oosit. Induksi infeksi uterus bakteri dalam isolasi dari komplikasi postpartum lainnya yang digunakan di sini berpotensi meremehkan dampak merugikan dari infeksi uterus spontan pada oosit.

Secara paralel, penelitian ini menetapkan endometritis pada sapi sehat yang tidak menyusui. Tidak jelas apakah kemandulan pada sapi dimediasi semata-mata oleh infeksi rahim atau jika kebutuhan perancu laktasi dan penyakit postpartum lainnya juga berdampak pada kualitas oosit. Kami sebelumnya telah menetapkan model penyakit eksperimental yang sebanding dengan endometritis klinis pada sapi perawan Holstein dengan infus patogenik intrauterin *E.coli* dan *T.pyogenes* diisolasi dari sapi dengan metritis aktif [22,24,25]. Dalam model ini, sapi tidak menunjukkan respon sistemik terhadap infeksi rahim, kurang pireksia, tetapi menampilkan keputihan purulen [22]. Dalam percobaan ini, peningkatan peradangan endometrium, ditandai dengan peningkatan ekspresi gen pro-inflamasi, terjadi dalam 1 minggu infus bakteri dan diselesaikan dalam waktu 4 minggu. Selain itu, sapi yang diinfus bakteri memiliki kadar lendir vagina yang lebih tinggi dibandingkan dengan sapi yang diinfus kendaraan. Studi sebelumnya telah menunjukkan bahwa penyakit nonreproduksi lainnya merusak kesuburan sapi perah. Mastitis mengubah fungsi endokrin dan siklisitas ovarium, selain meningkatkan waktu konsepsi [30,31]. Oosit yang dikumpulkan dari sapi perah dengan mastitis lebih kecil kemungkinannya untuk berkembang menjadi blastokista dibandingkan dengan oosit yang diisolasi dari sapi sehat [32], sedangkan sapi lumpuh mengalami peningkatan kejadian kista ovarium dan penurunan kemampuan untuk hamil dibandingkan dengan sapi tidak lumpuh [33]. Secara umum, sapi yang didiagnosis dengan satu penyakit pada periode pascapersalinan, terlepas dari apakah itu diklasifikasikan sebagai uterus atau non-uterus, memiliki kemungkinan yang lebih kecil untuk hamil dan kejadian aborsi yang meningkat [8,15].

Mekanisme dimana infeksi uterus mengurangi kompetensi perkembangan oosit masih belum jelas. Pemindahan embrio yang sehat ke dalam sapi dengan infeksi rahim sebelumnya tidak menyelesaikan masalah tersebut



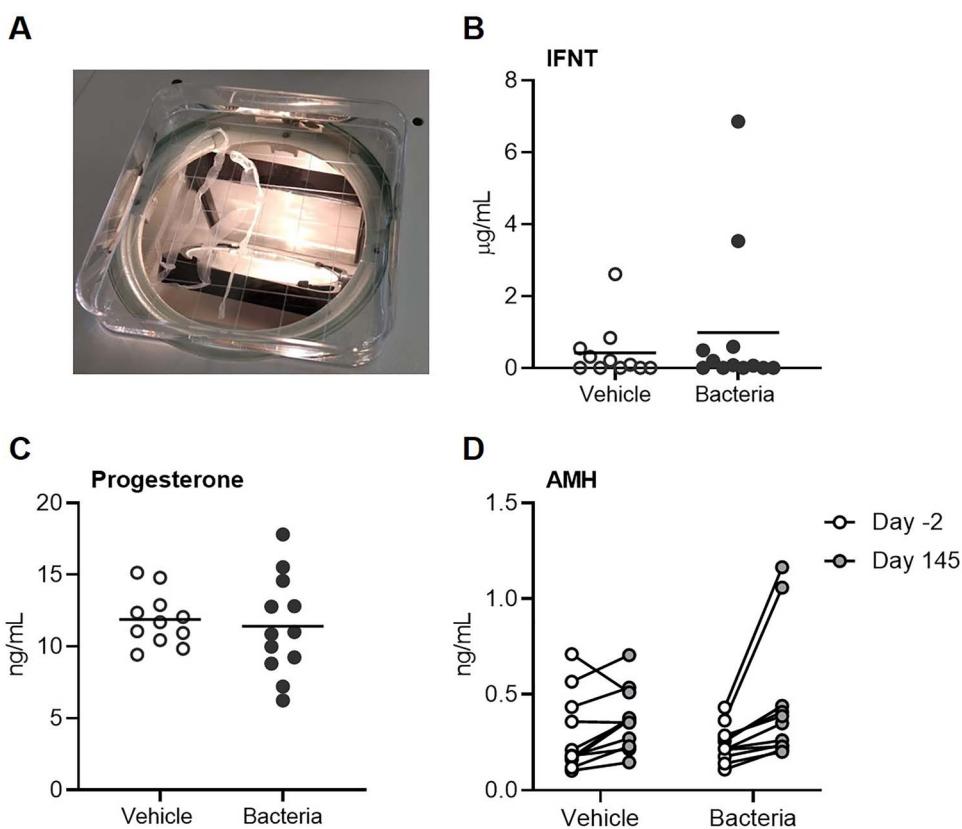
Gambar 6.Hubungan antara perkembangan morula dan peradangan endometrium. Ekspresi endometrium dari *CXCL8*(SEBUAH), *IL1B*(B), *IL6*(C), *PTGES*(D), *PTGS2*(E), dan *TNF*(F) ditentukan oleh RT-PCR real-time pada hari ke 6 relatif terhadap infus. Korelasi linier dilakukan dengan menggunakan proporsi total oosit yang dibelah untuk berkembang menjadi morula dari semua sapi.

dampak negatif penyakit pada kesuburan [8], menunjukkan bahwa rahim ikut bertanggung jawab atas infertilitas terkait infeksi. Di sini, hubungan terbalik antara derajat peradangan endometrium pada hari ke-6 infeksi dengan perkembangan embrio yang berkurang dapat dikaitkan dengan sinyal peradangan dari rahim yang mengubah kompetensi perkembangan oosit baik secara langsung atau dengan mengubah pensinyalan endokrin ke ovarium.^[34] In vitro, bakteri LPS merangsang ekspresi mediator inflamasi oleh sel granulosa melalui jalur toll-like receptor 4.^[19], sedangkan bakteri LPS terakumulasi dalam cairan folikel sapi dengan infeksi rahim dan mengubah lingkungan folikel hingga 63 hari postpartum.^[17] Demikian pula, paparan oosit ke LPS selama pematangan in vitro mengurangi kompetensi meiosis, meningkatkan oksigen reaktif dan apoptosis, dan mengubah pola metilasi DNA oosit.^[19,35] Tidak jelas apakah komponen dinding sel bakteri Gram-positif hadir dalam cairan folikel sapi dengan penyakit rahim atau apakah komponen ini mempengaruhi kompetensi oosit. Secara paralel, infeksi rahim dalam percobaan ini juga dapat mengganggu pensinyalan sumbu hipotalamus-hipofisis, mengurangi sekresi GnRH dan LH yang dapat berdampak negatif pada pertumbuhan dan perkembangan folikel kecil.^[36]; namun pensinyalan hormonal tidak dievaluasi dalam penelitian ini.

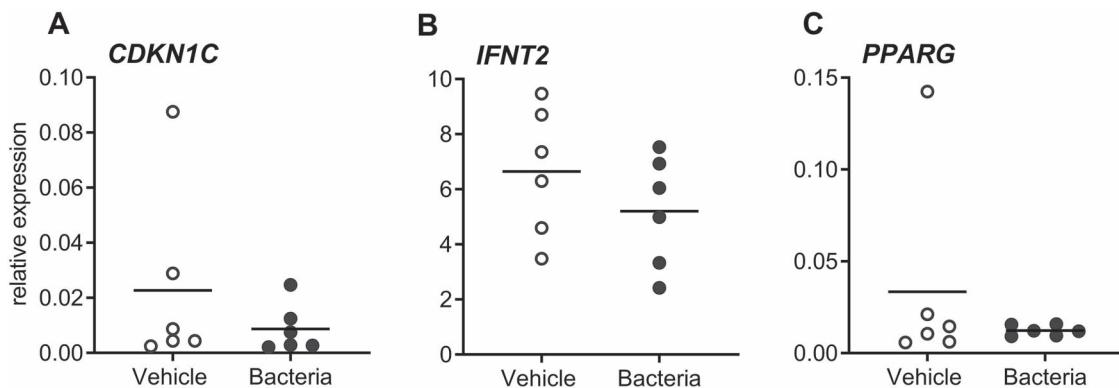
Kualitas embrio pada oosit yang dapat berkembang menjadi morula, serta kemampuan sapi untuk hamil setelah inseminasi, diperiksa. Kami memilih subset gen tertentu untuk dianalisis yang dikenal sebagai indikator kualitas embrio.^[37] Embrio

pengembangan dihentikan pada tahap morula untuk mengambil sampel populasi sel yang homogen alih-alih embrio blastokista di mana pengobatan dapat memengaruhi alokasi trofektoderm dan sel massa sel bagian dalam, yang mungkin mengacaukan ekspresi gen. Gen dipilih berdasarkan fungsinya, termasuk metabolisme, diukur dengan transporter glukosa (*GLUT7*); stres, diukur dengan heat shock protein 70 (*HSP47A*); apoptosis, diukur dengan *BAX* dan *BCL2*; Metilasi DNA, diukur dengan *DNMT3A*; dan pensinyalan faktor pertumbuhan, diukur dengan reseptor faktor pertumbuhan 2 seperti insulin (*IGF2R*). Pada morula yang berasal dari sapi yang diinfus bakteri, *HSPA1A* ekspresi ditinggikan. Stresor lingkungan, seperti stres panas, dapat meningkatkan *HSPA1A* ekspresi gen dalam embrio sapi, bahkan sebelum aktivasi genom embrio yang menyiratkan perubahan ekspresi didorong oleh mRNA ibu yang ada di oosit.^[38] Selain itu, hilangnya fungsi diwariskan secara maternal *IGF2R* gen menghasilkan kelainan perkembangan, termasuk sindrom keturunan besar.^[39,40] Sebaliknya, peningkatan pensinyalan IGF-2 meningkatkan perkembangan embrio in vitro.^[41,42] Penting untuk dicatat bahwa kualitas embrio dinilai menggunakan pendekatan bertarget dengan embrio yang diproduksi secara in vitro; dengan demikian, kami tidak dapat mengecualikan kemungkinan bahwa faktor-faktor lain yang penting dalam perkembangan embrio diubah sebagai akibat dari infeksi rahim atau bahwa lingkungan rahim dapat membantu pemulihan embrio yang terganggu.

Terakhir, pengaruh infeksi rahim sebelumnya terhadap kesehatan embrio yang dikandung melalui inseminasi dinilai. Semua embrio yang pulih pada hari ke 16 kehamilan berserabut. Ukuran sampel kami



Gambar 7.Efek infus intrauterin pada pemulihan embrio, konsentrasi tau interferon, progesteron serum, dan hormon anti-Müllerian. Sapi disinkronkan dan diinseminasi pada hari ke 130 pasca infus media pembawa kaldu LB (kendaraan; $n=11$) atau patogen *E.coli* dan *T.pyogenes* dalam kaldu LB (bakteri; $n=12$). Konten uterus dikumpulkan secara ex vivo, 16 hari pasca inseminasi. Semua embrio yang pulih berbentuk filamen dalam morfologi (A). Konsentrasi interferon tau (IFNT) (B) dikuantifikasi dalam cairan uterus dengan ELISA. Serum progesteron (C) dihitung 15 hari setelah inseminasi. Setiap titik mewakili seekor sapi dan garis padat adalah rata-ratanya. Hormon anti-Müllerian (D) dihitung pada hari ke-2 sebelum infus intrauterin dan hari ke 145 setelah infus. Setiap titik mewakili seekor sapi.



Angka 8.Efek infus intrauterin pada ekspresi gen trofektoderm dari embrio turunan in vivo. Sapi disinkronkan dan diinseminasi pada hari ke 130 pasca infus baik media pembawa kaldu LB (kendaraan; $n=11$) atau patogen *E.coli* dan *T.pyogenes* dalam kaldu LB (bakteri; $n=12$). Total RNA diisolasi dari trofektoderm hari ke-16 embrio yang diturunkan secara in vivo, dan ekspresi dari *CDKN1C*(SEBUAH), *IFNT2*(Pita *PPARG*(C) dievaluasi dengan RT-PCR real-time. Data yang ditampilkan adalah ekspresi relatif terhadap rata-rata geometris gen rumah tangga *ACTB* dan *GAPDH*. Setiap titik mewakili embrio dan garis padat menggambarkan rata-rata.

di sini kecil dalam hal jumlah inseminasi, dan oleh karena itu, kekuatan statistik tidak cukup untuk membuat kesimpulan mengenai dampak infeksi rahim eksperimental pada tingkat konsepsi. Embrio pulih, kami tidak mengamati efek infus pada ekspresi trofektoderm regulasi siklus sel (*CDKN1C*), gamma reseptor yang diaktifkan prolifator peroksisom (*PPARG*), atau interferon tau (*IFNT2*). Kurangnya perbedaan dalam ekspresi gen pada embrio yang dipulihkan tidak mengherankan karena gen ini sangat penting untuk embriogenesis [43–45]; namun, hasil kami mungkin bias karena kami hanya dapat menguji embrio yang pulih saat pembilasan yang mungkin mengecualikan embrio yang gagal berkembang lebih awal. Pengakuan kebuntingan induk pada sapi didorong oleh sekresi trofektoderm IFNT yang dimulai sejak blastokista [45,46]. Di sini, jumlah sampel siram uterus dengan IFNT yang dapat dideteksi lebih besar daripada jumlah sapi tempat embrio dikumpulkan, menunjukkan bahwa beberapa embrio tidak ditemukan karena kesalahan teknis atau perkembangan embrio gagal sebelum pengumpulan pada hari ke-16. Terlepas dari perbedaan, tingkat di mana pemulihan embrio dan deteksi IFNT berbeda antara perlakuan berdasarkan jumlah sapi yang digunakan di sini. Studi sebelumnya telah menunjukkan bahwa penyakit rahim mengurangi konsentrasi IFNT dalam cairan rahim [8], sedangkan kami tidak menemukan efek yang dapat diamati dari infus bakteri pada konsentrasi IFNT dalam cairan rahim pada hari ke 16 kehamilan. Namun penting untuk dicatat bahwa metode kuantifikasi IFNT dan variasi nilai yang dilaporkan tidak konsisten antara percobaan dalam literatur. Studi sebelumnya telah menggunakan tes antivirus [8], pengurutan RNA [47], atau ELISA yang sama yang digunakan di sini [48]. Juga tidak jelas mengenai konsentrasi minimum IFNT yang diperlukan untuk pengenalan kebuntingan induk pada sapi [49] atau hari atau hari terbaik untuk menguji status kehamilan berdasarkan IFNT. Namun, diyakini bahwa kurangnya sekresi IFNT mencerminkan kualitas embrio yang lebih buruk dan mengurangi keberhasilan kehamilan.

Kesimpulannya, infus bakteri patogen intrauterin untuk menginduksi endometritis pada sapi perah mengurangi kapasitas oosit untuk berkembang menjadi morula. Temuan baru ini menunjukkan bahwa infeksi rahim memiliki dampak yang merugikan pada minggu-minggu oosit setelah terjadinya infeksi. Data ini membantu pemahaman kita tentang mekanisme infertilitas terkait infeksi rahim pada sapi perah dan kemungkinan wanita dengan infeksi saluran reproduksi atau penyakit radang panggul. Penelitian selanjutnya diperlukan untuk menentukan mekanisme spesifik dimana penyakit rahim mengurangi kualitas oosit.

Materi tambahan

Materi tambahan tersedia di *BIOLEARN* online.

Terima kasih

Para penulis ingin berterima kasih kepada Tod Pritchard, Miguel Torrado Vazquez, dan staf Unit Riset Susu Universitas Florida.

Konflik kepentingan

Para penulis telah menyatakan bahwa tidak ada konflik kepentingan.

Referensi

- Sheldon IM, Cronin J, Goetze L, Donofrio G, Schuberth HJ. Mendefinisikan penyakit uterus postpartum dan mekanisme infeksi dan kekebalan pada saluran reproduksi betina pada sapi. *Bio Reprod* 2009; **81**:1025–1032.
- Tsevat DG, Wiesenfeld HC, Taman C, Peipert JF. Penyakit menular seksual dan kemandulan. *Am J Obstet Gynecol* 2017; **216**: 1–9.
3. Pusat Pengendalian dan Pencegahan Penyakit. *Surveilans Penyakit Menular Seksual 2017*. Atlanta: Departemen Kesehatan dan Layanan Kemanusiaan AS; 2018. doi:10.15620/cdc.59237.
4. Kreisel K, Torrone E, Bernstein K, Hong J, Gorwitz R. Prevalensi penyakit radang panggul pada wanita usia reproduksi yang berpengalaman secara seksual — Amerika Serikat, 2013–2014. *Morb Mortal Wkly Rep* 2017; **66**: 80–83.
5. Deb K, Chaturvedi MM, Jaiswal YK. Memahami peran LPS dalam vaginosis bakteri gram negatif: Melirik penyebab keinginan anak yang tidak terpenuhi. *Kebidanan Arch Gynecol* 2004; **270**:133–146.
6. Owusu-Edusei K, Chesson HW, Gift TL, Tao G, Mahajan R, Ocfemia MCB, Kent CK. Perkiraan biaya medis langsung infeksi menular seksual yang dipilih di Amerika Serikat, 2008. *Sex Transm Dis* 2013; **40**:197–201.
7. Dohmen MJW, Joop K, Sturk A, Bols PEJ, Lohuis JACM. Hubungan antara kontaminasi bakteri intra uterin, kadar endotoksin dan perkembangan endometritis pada sapi postpartum dengan distosia atau retensi plasenta. *Teriogenolog* 2000; **54**:1019–1032.
8. Ribeiro ES, Gomes G, Greco LF, Cerri RLA, Vieira-Neto A, Monteiro PLJ, Lima FS, Bisinotto RS, Thatcher WW, Santos JEP. Efek carryover dari penyakit radang postpartum pada biologi perkembangan dan kesuburan pada sapi perah laktasi. *Ilmu Susu* 2016; **99**:2201–2220.
9. Lima FS, Snodgrass JA, De Vries A, Santos JEP. Perbandingan ekonomi terapi antimikroba sistemik untuk metritis pada sapi perah. *Ilmu Susu* 2019; **102**:7345–7358.
10. Opsomer G, Gröhn YT, Hertl J, Coryn M, Deluyker H, De Kroij A. Faktor risiko disfungsi ovarium post partum pada sapi perah berproduksi tinggi di Belgia: Studi lapangan. *Teriogenolog* 2000; **53**:841–857.
11. Sheldon IM, Noakes DE, Rycroft AN, Pfeiffer DU, Dobson H. Pengaruh kontaminasi bakteri rahim setelah melahirkan pada pemilihan folikel dominan ovarium dan pertumbuhan serta fungsi folikel pada sapi. *Reproduksi* 2002; **123**:837–845.
12. Ribeiro ES, Lima FS, Greco LF, Bisinotto RS, Monteiro APA, Favoreto M, Ayres H, Marsola RS. Prevalensi penyakit periparturien dan efek pada fertilitas sapi perah penggembalaan beranak musiman yang dilengkapi dengan konsentrasi. *Ilmu Susu* 2013; **96**:5682–5697.
13. Penyakit Borsberry S, Dobson H. Peripartureint dan pengaruhnya terhadap performa reproduksi pada lima ternak sapi perah. *Dokter Hewan Rek* 1989; **124**: 217–219.
14. LeBlanc SJ, Duffield TF, Leslie KE, Bateman KG, Keefe GP, Walton JS, Johnson WH. Mendefinisikan dan mendiagnosis endometritis klinis postpartum dan dampaknya terhadap kinerja reproduksi pada sapi perah. *Ilmu Susu* 2002; **85**:2223–2236.
15. Santos JEP, Bisinotto RS, Ribeiro ES, Lima FS, Greco LF, Staples CR, Thatcher WW. Menerapkan nutrisi dan fisiologi untuk meningkatkan reproduksi pada sapi perah. *Soc Reprod Suppl Fertil* 2010; **67**:387–403.
16. Sheldon IM, Cronin JG, Bromfield JJ. Toleransi dan imunitas bawaan membentuk perkembangan penyakit uterus postpartum dan dampak endometritis pada sapi perah. *Annu Rev Anim Biosci* 2019; **7**:361–384.
17. Piersanti RL, Horlock AD, Blok J, Santos JEP, Sheldon IM, Bromfield JJ. Efek persisten pada transkriptom sel granulosa sapi setelah resolusi penyakit rahim. *Reproduksi* 2019; **158**:35–46.
18. Herath S, Williams Ej, Lilly ST, Gilbert RO, Dobson H, Bryant CE, Sheldon IM. Sel folikel ovarium memiliki kemampuan kekebalan bawaan yang memodulasi fungsi endokrininya. *Reproduksi* 2007; **134**:683–693.
19. Bromfield JJ, Sheldon IM. Lipopolisakarida memulai peradangan pada sel granulosa sapi melalui jalur TLR4 dan mengganggu perkembangan meiosis oosit in vitro. *Endokrinolog* 2011; **152**:5029–5040.
20. Britt JH, Cushman RA, Dechow CD, Dobson H, Humblot P, Hutjens MF, Jones GA, Ruegg PS, Sheldon IM, Stevenson JS. Tinjauan yang diundang: Belajar dari masa depan—Visi untuk peternakan sapi perah dan sapi pada tahun 2067. *Ilmu Susu* 2018; **101**:3722–3741.
21. Zuckerman S. Jumlah oosit pada ovarium dewasa. *Prog Horm Res Terbaru* 1951; **6**:63–109.

22. Piersanti RL, Zimpel R, Molinari PCC, Dickson MJ, Ma Z, Jeong KC, Santos JEP, Sheldon IM, Bromfield JJ. Model endometritis klinis pada sapi dari Holstein menggunakan Escherichia coli patogen dan Trueperella pyogenes. *Ilmu Susu* 2019; **102**:2686–2697.
23. Souza AH, Ayres H, Ferreira RM, Wiltbank MC. Sebuah sistem presynchronization baru (double-Ovsynch) meningkatkan kesuburan pada waktu postpartum pertama AI pada sapi perah laktasi. *Teriogenologi* 2008; **70**: 208–215.
24. Goldstone RJ, Amos M, Talbot R, Schubert HJ, Sandra O, Sheldon IM, Smith DGE. Rancangan urutan genom Escherichia coli MS499, diisolasi dari rahim sapi postpartum yang terinfeksi dengan metritis. *Pengumuman Genom* 2014; **2**:e00217–e00214.
25. Goldstone RJ, Amos M, Talbot R, Schubert HJ, Sandra O, Sheldon IM, Smith DGE. Rancangan genom urutan Trueperella pyogenes, diisolasi dari rahim yang terinfeksi dari sapi postpartum dengan metritis. *Pengumuman Genom* 2014; **2**:e00194–e00114.
26. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT. Pedoman MIQE: Informasi minimum untuk publikasi percobaan PCR waktu-nyata kuantitatif. *Klinik Kimia* 2009; **55**:611–622.
27. Herath S, Lilly ST, Fischer DP, Williams EJ, Dobson H, Bryant CE, Sheldon IM. Lipopolisakarida bakteri menginduksi saklar endokrin dari prostaglandin F2 α menjadi prostaglandin E2 di endometrium sapi. *Endokrinologi* 2009; **150**:1912–1920.
28. Rizos D, Ward F, Duffy P, Boland MP, Lonergan P. Konsekuensi pematangan oosit sapi, pembuahan atau perkembangan embrio awal in vitro versus in vivo: Implikasi untuk hasil blastokista dan kualitas blastokista. *Mol Reprod Dev* 2002; **61**: 234–248.
29. Lussier JG, Matton P, Dufour JJ. Tingkat pertumbuhan folikel di ovarium sapi. *J Reprod Subr* 1987; **81**:301–307.
30. Moore DA, Cullor JS, Bondurant RH, Sisco WM. Bukti lapangan awal untuk hubungan mastitis klinis dengan perubahan interval interestrus pada sapi perah. *Teriogenologi* 1991; **36**: 257–265.
31. Santos JEP, Cerri RL, Ballou MA, Higginbotham GE, Kirk JH. Pengaruh waktu kejadian mastitis klinis pertama pada kinerja laktasi dan reproduksi sapi perah Holstein. *Anim Reprod Sci* 2004; **80**:31–45.
32. Roth Z, Dvir A, Kalo D, Lavon Y, Krifucks O, Wolfenson D, Leitner G. Mastitis yang terjadi secara alami mengganggu kompetensi perkembangan oosit sapi. *Ilmu Susu* 2013; **96**:6499–6505.
33. Melendez P, Bartolome J, Archbald LF, Donovan A. Hubungan antara ketimpangan, kista ovarium dan kesuburan pada sapi perah laktasi. *Teriogenologi* 2003; **59**:927–937.
34. Herath S, Fischer DP, Werling D, Williams EJ, Lilly ST, Dobson H, Bryant CE, Sheldon IM. Ekspresi dan fungsi toll-like receptor 4 dalam sel endometrium rahim. *Endokrinologi* 2006; **147**:562–570.
35. Zhao SJ, Pang YW, Zhao XM, Du WH, Hao HS, Zhu HB. Efek lipopolisakarida pada pematangan oosit sapi in vitro dan kemungkinan mekanismenya. *Oncotarget* 2017; **8**:4656–4667.
36. Haziak K, Herman AP, Tomaszecka-Zaremba D. Efek injeksi sentral antibodi anti-LPS dan blokade TLR4 pada sekresi GnRH/LH selama stres imunologi pada domba anestrous. *Mediator Peradangan* 2014; **2014**: 1–10.
37. Sagirkaya H, Misirlioglu M, Kaya A, First NL, Parrish JJ, Memili E. Korelasi perkembangan dan molekuler embrio preimplantasi sapi. *Reproduksi* 2006; **131**:895–904.
38. Edwards JL, Ealy AD, Monterroso VH, Hansen PJ. Ontogeni sintesis heat shock protein 70 yang diatur suhu pada embrio sapi praimplantasi. *Mol Reprod Dev* 1997; **48**:25–33.
39. Barlow DP, Stoger R, Herrmann BG, Saitot K, Schweifer N. Reseptor tipe-2 faktor pertumbuhan seperti insulin tikus dicetak dan terkait erat dengan lokus Tme. *Alam* 1991; **349**:84–87.
40. LE muda, Fernandes K, McEvoy TG, Butterwith SC, Gutierrez CG, Carolan C, Broadbent PJ, Robinson JJ, Wilmut I, Sinclair KD. Perubahan epigenetik pada IGF2R dikaitkan dengan pertumbuhan berlebih janin setelah kultur embrio domba. *Nat Gen* 2001; **27**:153–154.
41. Gicquel C, Le Bouc Y. Regulasi hormonal pertumbuhan janin. *Horm Res* 2006; **65**:28–33.
42. DeChiara TM, Efstratiadis A, Robertsen EJ. Fenotipe defisiensi pertumbuhan pada tikus heterozigot yang membawa gen faktor pertumbuhan II seperti insulin terganggu oleh penargetan. *Alam* 1990; **345**:78–80.
43. Zhang P, Liégeois NJ, Wong C, Finegold M, Hou H, Thompson JC, Silverman A, Harper JW, DePinho RA, Elledge SJ. Diferensiasi dan proliferasi sel yang berubah pada tikus yang kekurangan p57 (KIP2) menunjukkan peran dalam sindrom Beckwith-Wiedemann. *Alam* 1997; **387**: 151–158.
44. Ribeiro ES, Greco LF, Bisinotto RS, Lima FS, Thatcher WW, Santos JE. Biologi konsepsi preimplantasi pada awal pemanjangan pada sapi perah. *Bio Reprod* 2016; **94**: 1–18.
45. Thatcher WW, Hansen PJ, Gross TS, Helmer SD, Plante C, Bazer FW. Efek antiluteolitik protein trofoblas sapi-1. *J Reprod Subr Suppl* 1989; **37**:91–99.
46. Hernandez-Ledezma JJ, Sikes JD, Murphy CN, Watson AJ, Schultz GA, Roberts RM. Ekspresi interferon trofoblas sapi dalam konseptus yang diturunkan dengan teknik in vitro. *Bio Reprod* 1992; **47**: 374–380.
47. Mamo S, Mehta JP, Forde N, McGettigan P, Lonergan P. Conceptus-endometrium crosstalk selama pengenalan kehamilan pada sapi. *Bio Reprod* 2012; **87**: 1–9.
48. Tribulo P, Rabaglino MB, Bo MB, Carvalheira L d R, Uskup JV, Hansen TR, Hansen PJ. Protein 1 terkait Dickkopf adalah progestomedin yang bekerja pada embrio sapi selama transisi morula-keblastokista untuk memprogram pemanjangan trofoblas. *Rep Sains* 2019; **9**: 11816.
49. Hansen TR, Sinedino LDP, Spencer TE. Tindakan parakrin dan endokrin dari interferon tau (IFNT). *Reproduksi* 2017; **154**:F45–F59.

Efek virus sindrom pernapasan dan reproduksi babi 2 pada angiogenesis dan proliferasi sel pada antarmuka ibu-janin

Patologi Veteriner
2022, jil. 59(6) 940-949
© Penulis 2022



Pedoman penggunaan kembali artikel:
sagepub.com/journals-permissions DOI:
10.1177/03009858221105053
journals.sagepub.com/home/vet



Javier A. Barrera-Zarate¹, Susan E. Detmer¹, Alex Pasternak²,
Glenn Hamonic¹, Daniel J. MacPhee¹, dan John CS Harding¹

Abstrak

Angiogenesis dan proliferasi sel dalam jaringan reproduksi merupakan peristiwa penting untuk pemeliharaan kehamilan, dan perubahan dapat menyebabkan perkembangan dan kelangsungan hidup janin terganggu. Virus sindrom reproduksi dan pernapasan babi 2 (PRRSV-2) menginduksi penyakit reproduksi dengan dampak finansial dan produksi negatif pada industri babi. Infeksi PRRSV-2 mengubah fisiologi plasenta melalui jalur inflamasi dan apoptosis, namun kerentanan janin bervariasi. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi angiogenesis dan proliferasi sel pada antarmuka ibu-janin babi (MFI) dan menentukan apakah proses fisiologis ini diubah oleh infeksi PRRSV-2. Tiga puluh satu gigit hamil diinokulasi dengan PRRSV-2 pada usia kehamilan 86 hari \pm 0,4 (rata-rata \pm SD). Tujuh gigit kontrol diinokulasi palsu. Semua gigit di-eutanasia pada 12 hari pasca-inokulasi. Angiogenesis dan proliferasi sel ditentukan melalui deteksi masing-masing faktor pertumbuhan endotel vaskular (VEGF) dan Ki-67, menggunakan imunofluoresensi MFI dari 4 kelompok ketahanan janin: tidak terinfeksi (UNIF), viral load tinggi-layak (HVL-VIA), dan HVL-meconium-stained (MEC) dari gigit yang terinfeksi PRRSV, serta dari gigit yang diinokulasi palsu (CON). Pemberian imunolabel VEGF pada submukosa uterus secara signifikan lebih rendah pada MEC dibandingkan dengan kelompok UNIF dan HVL-VIA. Imunolabeling Ki67 yang jauh lebih besar terdeteksi pada trofoblas janin CON dibandingkan semua kelompok lain, dan pada epitel uterus janin CON dan UNIF dibandingkan HVL-VIA dan MEC.

Kata kunci

angiogenesis, PRRSV, antarmuka ibu-janin, persimpangan fetomaternal, babi, janin, ketahanan penyakit, pembatasan pertumbuhan intrauterin

Virus sindrom reproduksi dan pernapasan babi 2 (PRRSV-2) (*Betaarterivirus suis 2*) menyebabkan penyakit yang ditandai dengan kegagalan reproduksi dan pneumonia interstitial pada babi yang sedang tumbuh dan dianggap sebagai salah satu patogen virus paling signifikan dalam produksi babi karena kerugian ekonomi dan produksi dalam peternakan dan pakan ternak.^{17,29,44} Kehilangan reproduksi terutama disebabkan oleh aborsi jangka panjang dan kematian janin, tetapi juga termasuk kelahiran anak babi yang lahir mati dan lemah yang terinfeksi secara kongenital, serta kemandulan.^{22,27,43} Kehilangan babi yang tumbuh terutama terkait dengan peran yang dimainkan PRRSV-2 dalam kompleks penyakit pernapasan babi yang mengarah pada peningkatan mortalitas dan morbiditas pembibitan.²⁹ Selain itu, PRRSV-2 adalah virus yang sangat imunosupresif, mengerahkan efek pada respons bawaan dan adaptif.²⁴

Meskipun penyakit reproduksi parah yang disebabkan oleh banyak strain PRRSV-2, mekanisme seluler yang digunakan oleh virus untuk mengganggu kelangsungan hidup janin selama sepertiga terakhir masa kehamilan belum ditentukan. Dalam beberapa hari setelah infeksi ibu, virus dapat melintasi antarmuka ibu-janin (MFI; yaitu, chorioallantois-allantochorion uterus dan janin yang melekat) ke

menginfeksi janin melalui sirkulasi umbilikal,^{26,42} tetapi waktu infeksi bervariasi di antara janin dalam satu tandu, dan beberapa janin lolos dari infeksi. Kategori janin fenotipik yang berbeda terkait dengan status preservasi dan viral load telah ditetapkan untuk menyelidiki faktor yang terkait dengan ketahanan janin. Preservasi janin didasarkan pada viabilitas dan lesi kotor janin pada saat nekropsi dan diklasifikasikan sebagai layak, bernoda mekonium (MEC), membusuk (kematian baru-baru ini), dan autolis (kematian dini).^{22,26} Konsentrasi RNA PRRSV dalam timus janin, serum, dan plasenta bervariasi antara keadaan pelestarian janin.²² Janin dapat diklasifikasikan sebagai viral load tinggi

¹Universitas Saskatchewan, Saskatoon, SK, Kanada

²Universitas Purdue, Lafayette Barat, IN

Materi tambahan untuk artikel ini tersedia online.

Penulis yang sesuai:

Susan E. Detmer, Departemen Patologi Hewan, Sekolah Tinggi Kedokteran Hewan Barat, Universitas Saskatchewan, Drive Kampus 52, Saskatoon, SK S7N 5B4, Kanada.
Email: susan.detmer@usask.ca

(HVL), viral load rendah (LVL), atau tidak terinfeksi (UNIF). UNIF adalah janin dari bendungan yang terinfeksi di mana RNA virus tidak terdeteksi dalam serum atau timus janin, yang karenanya dianggap relatif resisten dibandingkan dengan kohort HVL mereka.

Kompromi janin kemungkinan terkait dengan peristiwa terkait PRRSV yang terjadi di MFI, di dalam janin atau kombinasi keduanya. Sementara perubahan fisiologis kritis pada janin termasuk hipotiroidisme,³⁴ekspresi sitokin,^{33,47}hipoksia dan apoptosis,²⁵dan gangguan endokrin terkait dengan kompromi janin, lesi pada endometrium dan plasenta yang terkait dengan infeksi PRRSV-2 dapat mengubah proses nutrisi dan fisiologis transplasenta normal yang penting untuk pertumbuhan dan kelangsungan hidup janin. Lesi mikroskopis yang paling konsisten pada jaringan reproduksi yang terkait dengan infeksi PRRSV-2 adalah inflamasi dan vaskulitis pada endometrium^{30,32}serta apoptosis pada sel endotel plasenta, sel epitel uterus (UEC), dan trofoblas^{19,30,31}yang secara historis telah dianggap sebagai faktor ibu yang penting yang berkontribusi terhadap kegagalan reproduksi.

Persimpangan fetomaternal babi (FMJ; termasuk epitel trofoblas interdigitasi dan epitel uterus) terus berubah selama kehamilan melalui proses apoptosis, proliferasi sel, dan angiogenesis untuk mempertahankan dan mendukung perkembangan dan kelangsungan hidup janin.^{39,41,46}Mengingat lesi yang luas di MFI setelah infeksi PRRSV dan variasi yang luas dalam hasil janin, ada kemungkinan bahwa perubahan angiogenesis dan proliferasi sel di MFI juga berkontribusi pada hasil janin. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi angiogenesis dan proliferasi sel pada FMJ babi setelah infeksi PRRSV-2 ibu dan untuk menentukan apakah perubahan dalam proses ini terkait dengan variasi ketahanan janin.

Bahan dan metode

Pengumpulan Eksperimen dan Sampel Hewan

Tiga puluh satu anjing Landrace murni hamil diinokulasi secara intramuskular dan intranasal dengan PRRSV-2 (NVSL 97-7895 disebarluaskan pada sel MARC-145; 1×10^5 TCID₅₀dosis total) pada hari kehamilan ke-86±0,4 (rata-rata±SD). Pada tahap kehamilan yang sama, 7 gilt kontrol hamil (CON) sama-sama diinokulasi palsu dengan media esensial minimum steril. Semua gilt di-eutanasia dengan overdosis barbiturat intravena (Euthanyl Forte, 19.200 mg/gilt) dan captive bolt kranial pada 12 hari pasca infeksi. Protokol penelitian telah dijelaskan secara rinci,^{25,34}mematuhi pedoman yang ditetapkan oleh Dewan Perawatan Hewan Kanada, dan telah ditinjau dan disetujui oleh Dewan Etika Penelitian Hewan Universitas Saskatchewan (izin #20160023).

Pada nekropsi, uterus gravid diangkat dan janin dihitung secara berurutan berdasarkan posisinya di masing-masing tanduk (dimulai dengan L1/R1 di ujung tanduk kiri dan kanan). Status preservasi janin eksternal dinilai layak (VIA; hidup dengan warna kulit normal), MEC (hidup dan MEC di kepala dan/atau badan), atau membusuk (DEC; mati dengan kulit pucat±edema) seperti yang dijelaskan sebelumnya.^{22,30}Janin dulu

kemudian ditimbang, diberi jenis kelamin, dan dibedah. Bobot organ utama termasuk otak dan hati dicatat dan digunakan untuk menilai pertumbuhan proporsional otak dibandingkan dengan hati sebagai ukuran proksi untuk pembatasan pertumbuhan intrauterin (IUGR; otak tinggi: rasio berat hati).^{2,22}

Pengambilan sampel MFI dilakukan dengan memotong dinding rahim (ketebalan penuh) menjadi sampel persegi panjang (kurang lebih 3 x20 cm²). Dari LKM yang terkait dengan setiap janin ($n=516$), 3 sampel dikumpulkan: berpusat pada tunggul umbilikus (sampel 1), jarak 10 sampai 15 cm dari punggung umbilikal menuju ovarium (sampel 2), dan jarak 0 sampai 15 cm dari punggung umbilikal sepanjang anti-mesometrial. perbatasan (sampel 3).²⁵Semua sampel difiksasi dalam formalin buffer 10%, dipangkas menjadi 1 cm persegi dan diproses secara rutin untuk pewarnaan hematoxylin dan eosin. Analisis histologis bagian ini yang mengevaluasi tingkat keparahan peradangan pada endometrium, plasenta, dan pembuluh darah dilakukan seperti yang telah dijelaskan sebelumnya.³²Secara singkat, skor inflamasi pada endometrium dan plasenta dikategorikan sebagai skor 0 untuk tidak ada infiltrasi sel inflamasi pada jaringan; skor 1 untuk kurang dari 10% bagian jaringan dengan infiltrasi sel inflamasi; skor 2 untuk 10% sampai 25% bagian jaringan; skor 3 untuk 25% sampai 50% bagian jaringan; dan skor 4 untuk lebih dari 50% bagian jaringan dengan infiltrasi sel inflamasi. Skor untuk peradangan di dalam dinding pembuluh darah (vaskulitis) di endometrium dan plasenta diklasifikasikan sebagai skor 0 tanpa vaskulitis; skor 1 untuk vaskulitis pada kurang dari 30% pembuluh darah; skor 2 untuk 30% hingga 70%; dan skor 3 untuk lebih dari 70% pembuluh darah yang meradang di bagian jaringan.

Penilaian Viral Load Janin

Viral load janin dievaluasi dengan RT-qPCR seperti yang dijelaskan sebelumnya secara rinci.^{22,25}Secara singkat, RNA diekstraksi dari 140 µL serum janin menggunakan kit mini QIAamp Viral RNA dan dari 10 hingga 20 mg jaringan (allantokorion dan timus janin) menggunakan kit ekstraksi RNeasy (Qiagen). Protokol berbasis probe khusus regangan yang menargetkan open reading frame 7 (ORF7) dengan kurva standar 5 titik (10₇, 10₆, 10₅, 10₄, 10₃) dijalankan dalam rangkap tiga pada setiap pelat digunakan untuk kuantifikasi. Sampel dijalankan dalam rangkap dalam pelat 96-sumur menggunakan kontrol positif yang sesuai. Konsentrasi virus dilaporkan sebagai log₁₀ salinan target per mg/µL jaringan/serum. Batas kuantifikasi ditentukan oleh standar paling sedikit dan paling terkonsentrasi, batas bawahnya adalah 2,2 log₁₀ per µL serum atau mg jaringan.

Klasifikasi Janin

Perwakilan sistem klasifikasi dari perkembangan penyakit³⁴ digunakan untuk memilih subset janin untuk analisis lebih lanjut. Pertama, janin kontrol dipilih secara acak dari 7 ekor CON. Dari gilt yang terinfeksi PRRSV-2, kelompok dipilih sebagai berikut (Tabel 1): UNIF (janin hidup dengan PRRSV RT-qPCR yang tidak terdeteksi/negatif [reaksi berantai polimerase kuantitatif transkriptase terbalik] di plasenta janin, sera, dan timus], viral tinggi beban-layak (HVL-VIA: janin hidup dengan >4,4 log₁₀ salinan genom per mg/µL dalam plasenta, sera, dan timus), dan

Tabel 1.Ringkasan skor keparahan lesi histologis median dan viral load PRRS berdasarkan kelompok janin.

Kelompok	Skor lesi histologis PRRS (minimum/maksimum)				konsentrasi RNA PRRSV		
	Endometritis	Vaskulitis endometrium	Plasentitis	Vaskulitis plasenta	Plasenta	Serum	Timus
MENIPU (n=12)	0 (0/0)	0 (0/0,3)	0 (0/0)	0 (0/0)	NA	NA	NA
UNIF (n=10)	3.0b (1,6/3,6)	2.6b (1/3)	0b (0/1,3)	0 (0/0)	0,0 (0/0)	0,0 (0/0)	0,0 (0/1,3)
HVL-VIA (n=10)	2.6b (2/4)	1.8b (1/3)	0,1b (0/0,6)	0 (0/0)	6.8b (4,4/9,1)	7.4b (5,8/8,3)	5.6b (4,8/6,6)
MEC (n=13)	2.6b (2/4)	2.1b (0,3/3)	0,1b (0/1,3)	0 (0/0)	7.1b (6,0/8,5)	8.0b (6,4/9,6)	5.8b (3,6/6,2)
P nilai*	<.001	<.001	.04		<.001	<.001	<.001

Singkatan: PRRSV, virus sindrom pernapasan dan reproduksi babi; CON, kontrol; UNIF, janin yang tidak terinfeksi dari bendungan yang diinokulasi; HVL-VIA, janin dengan viral load tinggi; MEC, janin dengan viral load-mekonium yang tinggi. Janin yang digunakan untuk pelabelan VEGF dan Ki67 serupa tetapi tidak identik. NA—viral load janin CON tidak dinilai. Konsentrasi RNA PRRSV dalam salinan per UL serum atau mg jaringan.

*Dalam setiap kolom, superskrip yang berbeda menunjukkan perbedaan kelompok statistik ($P < .05$) di antara kelompok janin (Kruskal-Wallis dengan uji post hoc Dunn).

MEC (janin hidup dengan $>3,6 \log_{10}$ salinan genom per mg / μL dalam pewarnaan plasenta, sera, dan timus dan mekonium pada kulit). Semua janin dipilih secara spasial sambil mempertimbangkan posisinya di tanduk rahim untuk mendapatkan distribusi yang sama di antara dan di dalam serasah (Gambar Tambahan S1-S2).

Imunofluoresensi

Penilaian angiogenesis pada jaringan MFI ditentukan melalui deteksi faktor pertumbuhan endotel vaskular (VEGF) menggunakan antibodi poliklonal kelinci anti-VEGFA (ab39250; pengenceran 1:50; Abcam) dan imunofluoresensi. Antibodi dinaikkan melawan asam amino 1 hingga 100 VEGFA manusia. Jadi, untuk memvalidasi penggunaan antisera terhadap VEGFA, dilakukan BLAST protein *homo sapiens* (P15692.2) dan *Sus scrofa* (P49151.1) Urutan asam amino VEGFA. Mereka ditemukan 95% identik dalam 100 asam amino pertama. Blok jaringan parafin yang dipotong secara serial dari CON (n=9), UNIF (n=9), HVL-VIA (n=10), dan MEC (n=8) janin (Gambar Tambahan S1) diberi label. Walaupun tujuannya adalah untuk memasukkan 10 janin per kelompok, distribusinya tidak sama karena pelabelan imunoleksinya berkualitas buruk di beberapa dari 3 sampel LKM dalam setiap blok parafin. Untuk menggambarkan batas sel dan memfasilitasi identifikasi setiap jenis sel, bagian diberi label dengan antibodi protein-1 persimpangan ketat (TJP-1; juga dikenal sebagai zonula occludens-1; antibodi monoklonal tikus anti-ZO-1 IgG_{2a}; klon R40.76, sc-33725; pengenceran 1:100; Santa Cruz Biotechnology), yang mengidentifikasi persimpangan ketat untuk membedakan epitel trofoblas dari epitel uterus FMJ.1. Antibodi ini sebelumnya telah digunakan pada babi untuk mendeteksi TJP-1.^{14,16,28} Kontrol negatif juga diberi label untuk setiap janin dengan mengganti antibodi VEGF dengan serum kelinci normal (ab7487; pengenceran 1:10).

Setelah deparafinasi dan rehidrasi, potongan jaringan setebal 5 μm pada slide kaca dilakukan pengambilan antigen menggunakan Tris-EDTA (pH 9) selama 30 menit pada suhu 95°C. Antibodi primer adalah

diinkubasi pada slide semalam pada suhu 4°C. Antibodi sekunder masing-masing, keledai anti-kelinci-IgG (Cy₅5, Penelitian Immuno Jackson; 711545152; pengenceran 1:200), dan donkey anti-rat-IgG (Fluorescein [FITC], Jackson Immuno Research; 712095153; pengenceran 1:200) diinkubasi selama 4 jam pada suhu kamar. Counterstaining dengan 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) digunakan untuk memvisualisasikan inti sel. Slide diproses dalam 2 batch dan IgG kelinci nonspesifik digunakan pada konsentrasi yang sama dengan antibodi primer sebagai kontrol negatif.

Bagian serial jaringan parafin dari janin yang sama, dengan 5 substitusi, yang digunakan untuk pelabelan VEGF (Gambar Tambahan S2), diberi imunolabel untuk Ki-67 (monoklonal tikus Ki-67 anti-manusia; klon MIB-1 [Dako Omnis]; pengenceran 1:100; Agilent Technologies), penanda proliferasi yang diekspresikan dalam inti sel yang berproliferasi.⁴⁰ Antibodi ini sebelumnya telah digunakan untuk mengevaluasi proliferasi sel punca babi di kripta jejunum dari sampel usus.⁸ Serum tikus normal (ab7486; pengenceran 1:10) menggantikan Ki-67 untuk menunjukkan kurangnya pengikatan nonspesifik untuk tujuan kontrol kualitas pada slide kontrol negatif. Seperti dijelaskan di atas, slide juga diberi label untuk TJP-1 dan DAPI. Antibodi sekunder yang digunakan untuk mendeteksi Ki-67 adalah antimouse-IgG keledai (Rhodamine Red; Jackson Immuno Research; 711545152; pengenceran 1:200).⁴ Kelompok janin yang sama dinilai (n=10 janin/kelompok). Slide diproses dalam 2 batch dan IgG tikus nonspesifik digunakan dengan konsentrasi yang sama dengan antibodi primer sebagai kontrol negatif. Rincian imunolabel diuraikan dalam Tabel Tambahan S1 dan S2.

Analisis Gambar

Semua bagian dan gambar diperoleh dan dianalisis menggunakan sistem mikroskop Olympus IX83 yang dilengkapi dengan kamera Andor Zyla 4.2 sCMOS (2048×Array 2048 piksel; Andor USA, Concord, MA) dan perangkat lunak pencitraan CellSens. Dalam semua

analisis, areola plasenta dan area detasemen di MFI dikeluarkan. Evaluasi dan kuantifikasi angiogenesis plasenta dan proliferasi sel dilakukan dengan ImageJ menggunakan serangkaian makro semiotomatis. Untuk angiogenesis (deteksi antibodi VEGF), makro ImageJ mengevaluasi intensitas pelabelan rata-rata di setiap wilayah (FMJ, submukosa, dan miometrium). Untuk analisis ini, setiap wilayah dianalisis secara keseluruhan, dan nilai intensitas rata-rata untuk masing-masing dari 3 sampel (bila cocok untuk analisis) dirata-ratakan untuk menghitung skor komposit untuk setiap wilayah dari setiap janin.

Untuk proliferasi sel (deteksi antibodi Ki-67), makro ImageJ lainnya dikembangkan untuk semiotomatis penghitungan manual inti sel positif per mm² jaringan secara independen di epitel uterus dan trofoblas. Untuk analisis ini, perwakilan bagian MFI dipilih dengan menempatkan 3 persegi panjang identik (307.265 um²) sepanjang total panjang LKM dari masing-masing 3 sampel dari setiap janin. Semua protokol pengukuran dan pencitraan dikembangkan khusus untuk penelitian ini.

Analisis statistik

Semua analisis statistik dilakukan dengan menggunakan Stata 15.1 (Stata-Corp LP, TX, USA). Perbedaan kelompok dalam skor histologis dan konsentrasi PRRSV dinilai menggunakan Kruskal-Wallis dengan uji post hoc Dunn dan penyesuaian Benjamin-Hochberg. Data Ki67 dan VEGF ditransformasi log alami untuk mendapatkan distribusi normal. Perbedaan intensitas piksel VEGF median (per mm²) dan jumlah nuklei berlabel Ki67-positif (per mm) di antara kelompok klasifikasi janin dinilai menggunakan regresi linier, diikuti dengan perbandingan berpasangan dengan penyesuaian perbandingan berganda Tukey. Model regresi penuh dibangun yang mencakup variabel prediktor lain yang relevan secara biologis (jenis kelamin, dalam serasahZ-score otak: rasio hati [proksi untuk IUGR], dan pelabelan batch) berpotensi terkait dengan keparahan PRRS janin, angiogenesis, dan proliferasi sel. Penghapusan bertahap mundur dilakukan dengan menghapus variabel yang tidak signifikan sampai model akhir yang pelit tercapai. Untuk angiogenesis, model terpisah dibuat untuk setiap wilayah yang diselidiki (FMJ, submukosa, dan miometrium). Untuk proliferasi sel, model terpisah dibuat untuk menilai pelabelan pada epitel uterus dan trofoblas. Untuk semua analisis, $P < 0,05$ dianggap signifikan secara statistik. Semua model dinilai untuk linearitas dan homoskedastisitas residi menggunakan QQ yang sesuai dan plot pencar.

Hasil

Histopatologi dan Viral Load

Pada daerah endometrium MFI yang berhubungan dengan janin yang terinfeksi, terdapat akumulasi sel radang (endometritis) yang ditandai dengan limfosit, makrofag, dan beberapa sel plasma. Reaksi inflamasi juga

diamati di daerah plasenta (plasentitis) terkait dengan janin yang terinfeksi, dengan tingkat keparahan yang lebih rendah daripada endometrium, dan ditandai terutama oleh akumulasi makrofag. Pada endometrium yang berhubungan dengan janin yang terinfeksi, terdapat akumulasi limfosit dan kadang-kadang makrofag di dalam dinding pembuluh darah (vaskulitis). Vaskulitis tidak diamati di daerah plasenta. Pada janin CON, beberapa sel inflamasi yang terdistribusi secara acak diamati, tanpa vaskulitis.

Di antara sampel dari gilt yang diinokulasi PRRSV, tingkat keparahan endometritis, placentitis, dan vaskulitis endometrium tidak berbeda di antara kelompok UNIF, HVL-VIA, dan MEC. Namun, semua kelompok yang diinokulasi PRRSV memiliki skor lesi yang lebih besar ($P < .04$ untuk semua) daripada kelompok CON, yang tidak mengalami peradangan di salah satu dari 3 area yang dievaluasi (Tabel 1).

Mengenai konsentrasi RNA PRRSV di plasenta, sera, dan timus, dengan desain eksperimental, tidak ada perbedaan statistik antara kelompok janin HVL-VIA dan MEC, tetapi kedua kelompok memiliki viral load yang lebih besar daripada janin CON dan UNIF ($P < .001$).

Lokalisasi VEGF di LKM

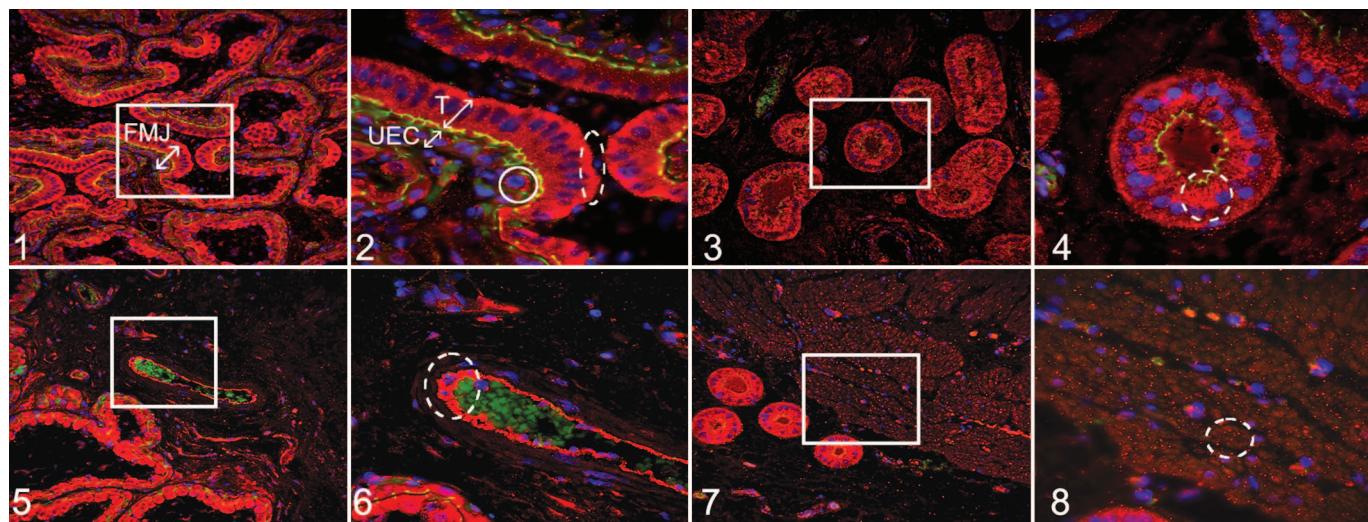
Imunolokalisasi VEGF dalam FMJ (Gbr. 1) lebih intens di sitoplasma sel epitel trofoblas dibandingkan dengan sitoplasma UEC (Gbr. 2). Pada trofoblas, ekspresi VEGF tampak vesikular dan dengan kecenderungan akumulasi pada permukaan basolateral sel (Gbr. 2). Ada intensitas ekspresi VEGF yang lebih rendah di UEC dibandingkan dengan trofoblas, tetapi dimungkinkan untuk mengamati ekspresi VEGF dalam bentuk vesikel yang sebagian besar terletak di sekitar nukleus UEC (Gbr. 2).

Dalam submukosa endometrium, imunolabeling VEGF-positif ditunjukkan dalam sitoplasma kelenjar rahim (Gbr. 3) dengan bias spasial terhadap bagian apikal sel kelenjar (Gbr. 4; menunjukkan potensi pelepasan VEGF yang menyebar ke kelenjar lumen). Juga pada submukosa endometrium, pelabelan positif untuk VEGF terdeteksi melalui seluruh sitoplasma sel endotel (Gambar 5, 6).

Sementara deteksi VEGF diamati terutama dalam bentuk vesikular dalam sitoplasma sel MFI yang disebutkan di atas, keberadaan struktur seperti vesikel yang diberi imunolabel positif juga terdeteksi di ruang ekstraseluler di seluruh wilayah berbeda yang dievaluasi. VEGF juga terdeteksi pada sel miometrium (Gbr. 7) dalam struktur seperti vesikel dengan distribusi acak di sitoplasma (Gbr. 8). Area-area ini yang sebelumnya digambarkan positif untuk pelabelan VEGF diidentifikasi pada semua janin yang dievaluasi tanpa perbedaan visual yang jelas di antara kedua kelompok.

Evaluasi Intensitas Pelabelan VEGF oleh Fetal Group

Mengingat pola pelabelan yang kompleks dan menyebar yang dijelaskan di atas, analisis yang membandingkan perbedaan intensitas pelabelan VEGF oleh kelompok janin dilakukan berdasarkan seluruh wilayah (FMJ, submukosa uterus, dan miometrium) daripada



Gambar 1-8.Virus sindrom reproduksi dan pernapasan babi 2 (PRRSV-2) pada 12 hari setelah infeksi ibu, rahim dan plasenta, babi. Imunofluoresensi untuk faktor pertumbuhan endotel vaskular (VEGF; merah); 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; biru; nuklir counterstaining); tight junction protein-1 (TJP-1; hijau; untuk mengidentifikasi batas sel).**Gambar 1.**Persimpangan fetomaternal (FMJ) dengan imunolabel positif difus untuk VEGF di semua sel trofoblas dan dengan intensitas yang lebih tinggi dibandingkan dengan sel epitel uterus (UEC).**Gambar 2.**Pembesaran kotak putih yang lebih tinggi pada Gambar 1. Trofoblas (T) dengan ekspresi VEGF difus di sitoplasma dan kecenderungan akumulasi di bagian basolateral sel (oval dengan garis putus-putus). UEC memiliki ekspresi VEGF yang lebih rendah yang sebagian besar diamati di sekitar nukleus (lingkaran). **Gambar 3.**Kelenjar rahim memiliki pelabelan sitoplasma difus untuk VEGF.**Gambar 4.**Pembesaran kotak putih yang lebih tinggi pada Gambar 3. Terdapat imunolabel VEGF difus dengan kecenderungan ke arah bagian apikal sel (oval dengan garis putus-putus).**Gambar 5.**Sel endotel memiliki imunolabel sitoplasma difus untuk VEGF.**Gambar 6.**Pembesaran kotak putih yang lebih tinggi pada Gambar 5. Terdapat imunolabel yang menyebar melalui sitoplasma (oval dengan garis putus-putus). Autofluoresensi eritrosit (hijau).**Angka 7,8.**Sel miometrium menunjukkan fokus acak imunolabel sitoplasma untuk VEGF. Gambar 8 merupakan perbesaran yang lebih tinggi dari kotak putih pada Gambar 7.

dibandingkan dengan jenis jaringan atau elemen dalam wilayah. Analisis yang dihasilkan (Gbr. 9-11) menunjukkan bahwa perbedaan kelompok hanya signifikan ($P=.05$) di submukosa, dengan ekspresi VEGF yang lebih besar diamati pada endometrium yang terkait dengan janin UNIF dan HVL-VIA dibandingkan dengan MEC, dengan CON sebagai perantara (Gbr. 10). Mengenai efek potensial dari jenis kelamin dan IUGR pada intensitas pelabelan VEGF, hubungan yang signifikan hanya ditunjukkan pada submukosa di mana intensitasnya lebih besar untuk wanita dibandingkan pria ($P=.027$) janin, dan berbanding terbalik dengan otak: rasio berat hati (intensitas lebih rendah pada janin IUGR vs non-IUGR; $P=.013$; Gambar 12). Batch pelabelan juga secara signifikan terkait dengan intensitas di submukosa ($P=.003$) dan miometrium ($P=.02$) daerah, tetapi tidak di FMJ.

Lokalisasi Ki-67 di LKM

Imunolokalisasi Ki-67 terdeteksi secara acak di seluruh MFI di epitel trofoblas dan UEC (Gbr. 13) dan seperti yang diharapkan secara eksklusif ditemukan di nukleus (Gbr. 14). Protein Ki-67 berbentuk granular hingga memadat dan teramat tersebar di seluruh inti.

Evaluasi Pelabelan Ki-67 Positif oleh Fetal Group

Pada epitel ibu, jumlah sel berlabel Ki-67 berbeda antar kelompok klasifikasi janin ($P<.001$) dengan kelompok CON dan UNIF memiliki jumlah Ki-67 yang lebih besar (menunjukkan

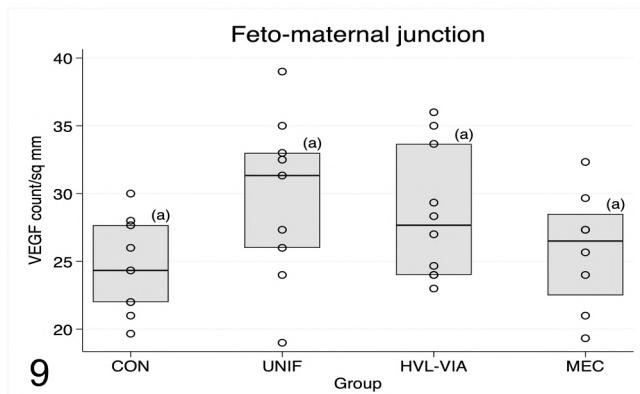
proliferasi yang lebih besar) di UEC dibandingkan dengan kelompok VIA dan MEC (Gbr. 15). Perbedaan kelompok yang signifikan juga diamati di antara kelompok perkembangan penyakit janin sehubungan dengan jumlah sel epitel trofoblas positif Ki-67 ($P=.001$). Proliferasi sel trofoblas yang lebih besar terbukti pada kelompok CON dibandingkan dengan semua kelompok yang terinfeksi (Gbr. 16).

Baik jenis kelamin maupun otak: rasio hati dikaitkan dengan pelabelan Ki67 pada epitel ibu dan janin. Namun, batch pelabelan signifikan ($P<.001$) untuk kedua jenis sel, dengan intensitas pelabelan yang lebih besar pada batch kedua dibandingkan batch pertama.

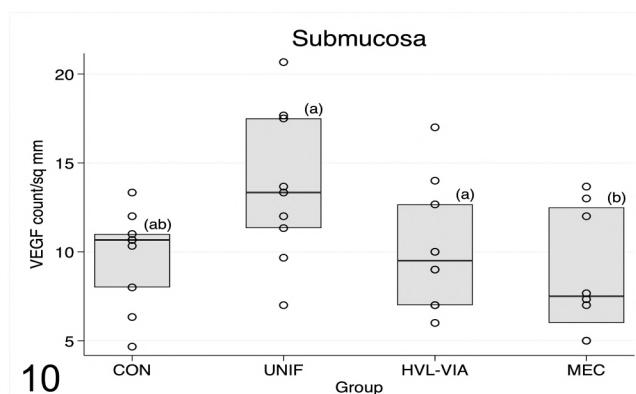
Diskusi

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengevaluasi angiogenesis dan proliferasi sel pada LKM babi untuk menentukan apakah proses ini diubah oleh infeksi PRRSV-2. Memeriksa intensitas pelabelan imunofluoresensi VEGF dan jumlah nuklei imunopositif untuk Ki67 dalam jaringan MFI di seluruh kelompok fenotipik janin yang mewakili rentang perkembangan penyakit dari tidak terinfeksi ke viral load-MEC yang tinggi, memberikan wawasan tentang kemungkinan mekanisme kompromi janin.

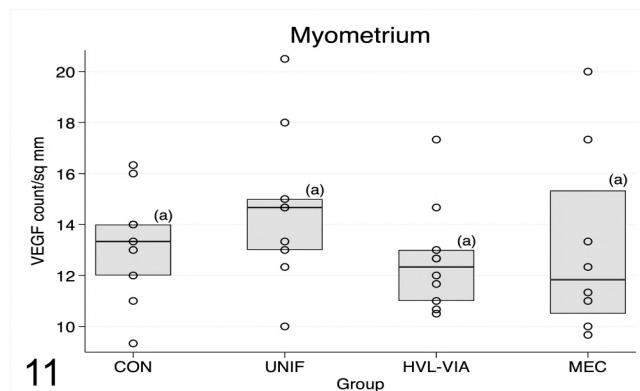
Sehubungan dengan PRRS reproduksi, telah ditunjukkan bahwa infeksi jaringan rahim dan transmisi PRRSV-2 transplasenta ke janin terjadi dengan cepat. Setelah inokulasi virus intramuskular/intranasal di gilt, replikasi virus di rahim



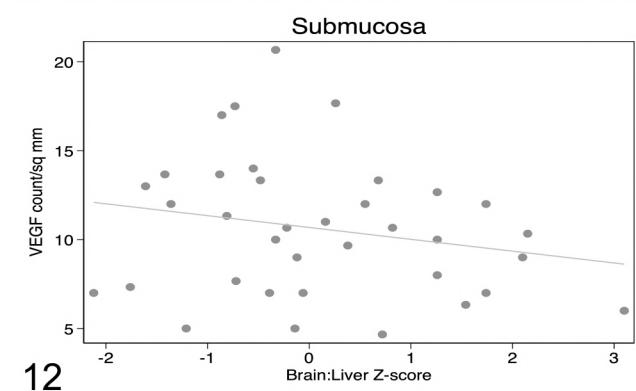
9



10



11



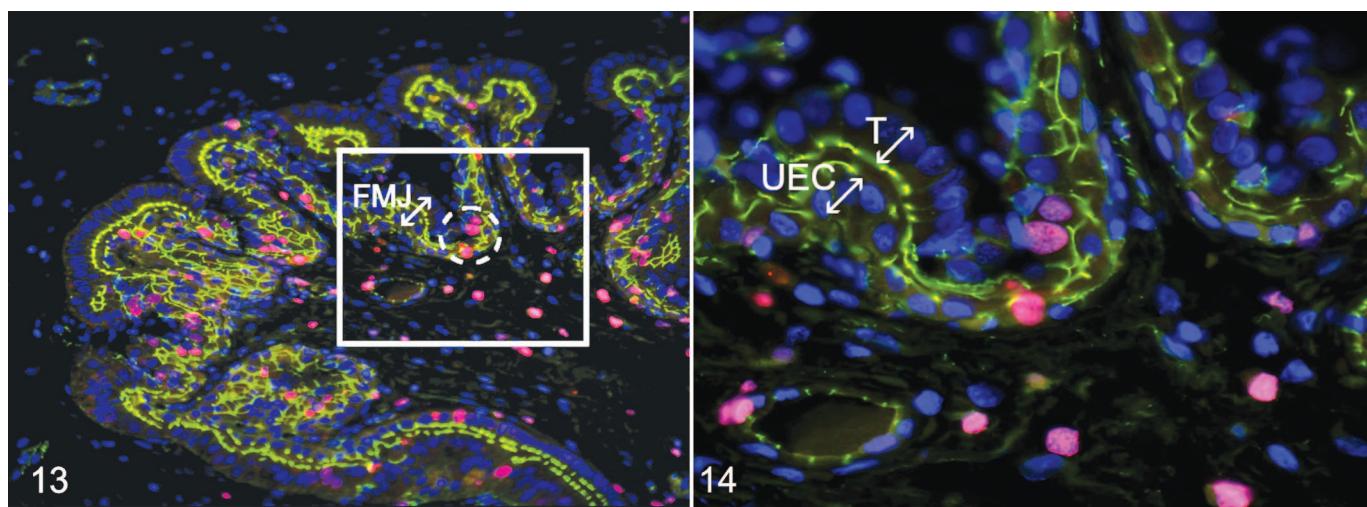
12

Gambar 9-12. Plot kotak yang membandingkan jumlah imunolabel faktor pertumbuhan endotel vaskular (VEGF) per mm² di antara kelompok ketahanan virus sindrom reproduksi dan pernafasan babi janin 2 (PRRSV-2): kontrol (CON), tidak terinfeksi (UNIF), viral load-viable tinggi (HVL-VIA), dan bernoda mekonium (MEC). Setiap titik data mewakili rata-rata 3 wilayah berbeda dari antarmuka ibu-janin (MFI), untuk setiap janin. Superskrip yang berbeda menunjukkan perbedaan kelompok yang signifikan berdasarkan perbandingan berpasangan post hoc yang disesuaikan dengan Tukey dari pemodelan regresi linier dari data yang diubah-In. **Gambar 9.** Persimpangan fetomaternal. Tidak ada perbedaan signifikan yang diamati ($P= .08$). **Gambar 10.** Submukosa. Intensitas imunolabel VEGF secara signifikan lebih rendah pada kelompok MEC versus UNIF dan HVL-VIA ($P= .0001$). **Gambar 11.** Miometrium. Tidak ada perbedaan yang signifikan antara kelompok yang diamati ($P= .09$). **Gambar 12.** Submukosa, menunjukkan hubungan antara pelabelan VEGF dan otak: rasio berat hati, ukuran proksi untuk pembatasan pertumbuhan intrauterin. Janin dengan hambatan pertumbuhan intrauterin (IUGR; rasio otak: hati lebih besar) memiliki pelabelan VEGF yang lebih rendah ($P= .013$).

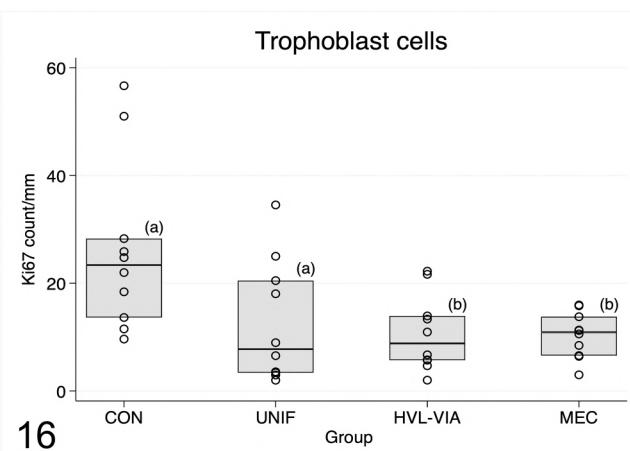
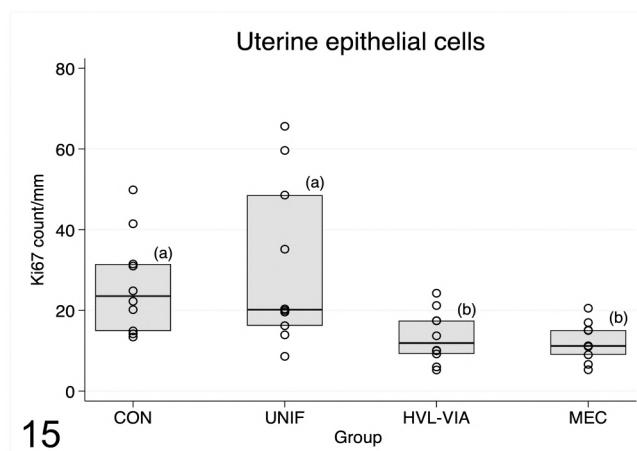
jaringan terjadi dalam 2 hari dan penularan virus transplasenta ke janin terbukti dalam 5 hari.²⁶ Virus telah dibuktikan di berbagai organ janin termasuk timus, amandel, kelenjar getah bening, paru-paru, hati, limpa, jantung, dan ginjal setelah infeksi.^{26,27,38} Klasifikasi janin sepanjang spektrum ketahanan janin relatif berdasarkan pelestarian janin dan viral load sangat diinginkan untuk mempelajari patogenesis PRRSV-2. Janin UNIF diklasifikasikan lebih tahan terhadap virus daripada kelompok HVL karena replikasi virus ditekan atau dicegah dalam jaringan janin. Janin UNIF sengaja dipilih untuk penelitian ini berdasarkan tidak adanya virus dalam plasenta, serum, dan timus janin. Sebaliknya, janin HVL-VIA dan MEC memiliki tingkat virus yang tinggi di ketiga jaringan yang diuji. Penelitian sebelumnya telah mengusulkan bahwa janin yang layak dengan HVL lebih toleran daripada kohort MEC mereka yang menunjukkan tanda-tanda awal hingga lanjut dari kompromi janin sebelum kematian.^{22,26,33,47} Hubungan antara infeksi virus dan kematian janin sulit dipahami sebagian karena lesi mikroskopis terbatas pada janin baik dalam penelitian maupun penelitian.

spesimen diagnostik.^{9,23,32,37} Di sisi lain, organ fundamental lain selama kehamilan babi yang telah dievaluasi secara luas selama infeksi PRRSV adalah plasenta. Lesi inflamasi yang sering terkait dengan infeksi PRRSV diamati pada endometrium, plasenta, miometrium, dan pembuluh darah, bersama dengan area hemoragik, kematian sel apoptosis pada sel MFI, dan area pemisahan antara trofoblas dan UEC.^{18,19,30,31} Lesi terkait PRRSV di MFI ini secara historis dianggap penting dalam hal kemungkinan mekanisme kematian janin.

Angiogenesis adalah proses yang melibatkan pembentukan dan perkembangan pembuluh darah baru dari pembuluh darah yang ada dan merupakan komponen fisiologis penting dari perkembangan plasenta selama kehamilan untuk meningkatkan pertukaran gas dan nutrisi antara bendungan dan serasah.⁵ Sambil berkontribusi pada perkembangan plasenta,³ Pentingnya angiogenesis dalam jaringan plasenta selama kehamilan disorot paling baik oleh perubahan angiogenesis yang dapat membahayakan kehamilan pada hewan.



Angka 13, 14.Virus sindrom reproduksi dan pernapasan babi 2 (PRRSV-2) pada 12 hari setelah infeksi ibu, persimpangan fetomaternal (FMJ), babi. Imunofluoresensi untuk Ki67 (merah muda); 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; biru; nuklir counterstaining); tight junction protein-1 (TJP-1; hijau; untuk mengidentifikasi batas sel).**Gambar 13.**Trofoblas dan sel epitel uterus (UECs) menunjukkan label positif untuk Ki67 yang diekspresikan secara acak di seluruh FMJ (oval dengan garis putus-putus).**Gambar 14.**Pembesaran kotak putih yang lebih tinggi pada Gambar 13. Ada label positif untuk Ki67 dalam inti sel trofoblas (T) dan inti UEC.



Angka 15, 16.Plot kotak yang membandingkan jumlah imunolabel Ki67 per mm di antara kelompok ketahanan virus reproduksi babi dan pernapasan janin babi 2 (PRRSV-2): kontrol (CON), tidak terinfeksi (UNIF), viral load tinggi-layak (HVL-VIA), dan beroda mekonium (MEC). Setiap titik data mewakili nilai untuk lapisan epitel persimpangan fetomaternal yang terkait dengan masing-masing janin. Superskrip yang berbeda menunjukkan perbedaan kelompok yang signifikan berdasarkan perbandingan berpasangan post hoc yang disesuaikan dengan Tukey dari pemodelan regresi linier dari data yang diubah-In.

Gambar 15.Sel epitel rahim. Ada penurunan imunolabeling Ki-67 (proliferasi sel yang lebih rendah) secara signifikan pada kelompok HVL-VIA dan MEC ($P < .001$).**Gambar 16.**sel trofoblas. Ada penurunan imunolabel Ki-67 secara signifikan pada semua kelompok janin dari gilit yang terinfeksi dibandingkan dengan gilit kontrol yang tidak diinokulasi ($P = .001$).

dan wanita.^{10,20,35,36}VEGF adalah salah satu dari beberapa faktor angiogenik yang berperan dalam pembentukan dan perkembangan pembuluh darah baru di plasenta^{4,11}melalui keterlibatannya dalam merangsang mitosis dan proliferasi sel endotel. Sementara intuitif bahwa imunolabel VEGF harus dilokalisasi di sekitar sel endotel, dalam penelitian ini, imunolabel VEGF juga terlokalisasi di epitel uterus dan trofoblas, sel kelenjar uterus, dan sel miometrium. Hasil ini konsisten dengan penyelidikan sebelumnya di mana VEGF terdeteksi pada berbagai jenis sel plasenta babi.^{6,15,48,49}Telah

mengusulkan bahwa lokalisasi ekstra-endotel VEGF dalam sel, seperti epitel uterus atau trofoblas, mungkin terkait dengan fungsi diferensiasi dan pematangan sel yang dihasilkan VEGF dalam sel-sel ini.^{49,50}Demikian pula, ekspresi VEGF dalam epitel kelenjar uterus mungkin terkait dengan fungsi diferensiasi, perkembangan, dan sekresi yang dipromosikan VEGF dalam sel kelenjar.⁴⁹

Terlepas dari kesamaan di bidang MFI di antara kelompok janin dalam penelitian kami, janin MEC menunjukkan ekspresi VEGF yang lebih rendah di submukosa endometrium di mana banyak

kelenjar rahim dan pembuluh darah berada. Mempertimbangkan banyak fungsi yang dimiliki VEGF pada struktur seluler ini, ekspresi VEGF yang rendah dalam submukosa yang terkait dengan janin MEC dapat berdampak negatif pada kapasitas transportasi seluler dalam sel plasenta, mitosis, perkembangan, dan diferensiasi kelenjar rahim dan sel endotel yang membahayakan perkembangan janin normal dan kelangsungan hidup janin ini, sehingga mengakibatkan gangguan janin dan pewarnaan mekonium setelah infeksi PRRSV. Alasan lain yang mungkin untuk penurunan ekspresi VEGF pada janin MEC mungkin terkait dengan proses patologis lain yang diinduksi oleh PRRSV.

Pemberian imunolabel VEGF dalam sitoplasma sel MFI dan di area ekstraseluler menunjukkan bahwa penyimpanan seluler dan pelepasan glikoprotein ini ke media ekstraseluler dapat dilakukan melalui vesikel. Bentuk vesikular ini dapat menyebabkan pensinyalan antar sel dan efek angiogenik VEGF yang dihasilkan antara sel tetangga atau jauh.^{13,45}

Dalam penelitian ini, janin perempuan menunjukkan tingkat imunolabel VEGF yang jauh lebih tinggi di submukosa yang terkait dengan janin laki-laki dan cenderung serupa di MFI. Menemukan perbedaan jenis kelamin tidak sepenuhnya terduga karena ini dilaporkan untuk pensinyalan angiogenik dalam jaringan MFI babi.⁴¹ Meskipun perbedaan sebelumnya terdeteksi secara *in vitro*, ini menunjukkan bahwa janin laki-laki dan perempuan berkomunikasi secara berbeda selama periode kehamilan yang berbeda (praimplantasi, migrasi di sekitar rahim, dan implantasi). Berdasarkan hasil ini, juga masuk akal bahwa janin laki-laki dan perempuan mungkin memiliki respon angiogenik yang berbeda ketika terinfeksi oleh PRRSV.

Respons angiogenik pada janin IUGR dalam penelitian ini sebagian konsisten dengan penyelidikan lain yang menunjukkan bahwa VEGF mungkin merupakan faktor pertumbuhan penting yang terkait dengan perkembangan janin, dan perubahan dalam angiogenesis plasenta dapat mempengaruhi transportasi nutrisi yang terganggu karena perubahan dalam perkembangan plasenta baru. pembuluh darah^{15,36} Sementara pengurangan imunolabel VEGF pada janin IUGR dalam penelitian ini hanya dicatat di submukosa dan efeknya bervariasi, janin IUGR yang memiliki viral load lebih rendah memiliki kemungkinan lebih besar untuk menjadi UNIF dibandingkan dengan teman serasah non-IUGR.²¹ Ada kemungkinan bahwa vaskularisasi yang lebih rendah pada janin IUGR dapat mengurangi kemungkinan infeksi transplasenta karena lebih sedikit pembuluh darah atau meningkatkan jarak yang memisahkan sirkulasi ibu dan janin di FMJ.

Ki-67 digunakan untuk mengevaluasi proliferasi sel karena protein diekspresikan dalam inti sel dalam keadaan proliferasi, dan imunoreaktivitasnya terdeteksi pada semua tahap siklus sel kecuali G₀ atau fase istirahat.⁴⁰ Dalam penelitian ini, Ki-67 terdeteksi pada sel endometrium dan epitel trofoblas yang menunjukkan proliferasi jenis sel ini selama kehamilan. Pelabelan membedakan sel dalam keadaan proliferasi (label merah muda—Ki-67) dan sel diam (pelabelan biru—DAPI) di sepanjang FMJ.

Dalam UEC, imunoreaktivitas Ki-67 secara statistik berbeda di antara kelompok klasifikasi janin, dengan janin CON dan UNIF memiliki proliferasi sel yang lebih besar daripada kelompok HVL-VIA dan MEC yang terinfeksi. Hal ini menunjukkan bahwa proliferasi rahim

epitel berkurang setelah infeksi PRRSV, tetapi hanya setelah janin terinfeksi. Hal ini penting karena tingkat keparahan endometritis dan vaskulitis pada janin UNIF mirip dengan kelompok yang terinfeksi lainnya (Tabel 1) menunjukkan penyakit endometrium tidak mendasari proliferasi UEC. Sebaliknya, imunoreaktivitas Ki-67 dalam sel epitel trofoblas menurun pada semua kelompok janin dari gilt yang diinokulasi (UNIF, VIA, dan MEC) dibandingkan dengan janin CON. Hal ini menunjukkan remodeling terus menerus dari sel-sel trofoblas yang biasanya terjadi selama kehamilan babi terpengaruh segera setelah endometrium terinfeksi PRRSV, terlepas dari infeksi janin. Ini mungkin karena kematian sel apoptosis pada sel plasenta MFI.^{19,31} Siklus sel yang terhenti dikonfirmasi selama infeksi PRRSV-2 sel trofoblas babi yang dikultur pada fase G2/M.⁴²

Hasil ini juga mendukung konsep cross-talk antara janin dan MFI dimana beberapa respon inang di MFI hanya diinduksi setelah infeksi janin terjadi. Misalnya, satu set inti gen yang diinduksi interferon diregulasi dalam plasenta janin dan timus janin LVL dan HVL, tetapi hanya setelah timus janin terinfeksi.⁴⁷ Gen-gen ini tidak diregulasi pada janin UNIF, atau pada janin dengan plasenta yang terinfeksi tetapi timus UNIF.⁴⁷ Hasil kami menunjukkan bahwa siklus sel diregulasi ke bawah pada trofoblas sebelum infeksi janin dan pada epitel uterus yang berlawanan setelah infeksi janin.

Sebelumnya ditunjukkan bahwa penurunan faktor proliferasi sel dalam jaringan plasenta dikaitkan dengan janin paling ringan dan IUGR selama periode kehamilan yang berbeda, berpotensi mempengaruhi proliferasi atau remodeling sel dan pertukaran nutrisi antara bendungan dan janin selama perkembangan.^{7,41} Sementara hasil kami menunjukkan bahwa pelabelan VEGF menurun pada submukosa yang terkait dengan janin IUGR, tidak ada hubungan yang ditemukan terkait dengan jumlah imunoreaktivitas Ki67.

Kesimpulan

Angiogenesis dan proliferasi sel ibu dan plasenta merupakan proses fisiologis yang sangat diperlukan selama kehamilan yang memastikan perkembangan dan pemeliharaan jaringan LKM yang memadai sekaligus memastikan perkembangan dan kelangsungan hidup janin yang tepat. PRRSV memiliki efek langsung dan tidak langsung pada berbagai jenis jaringan reproduksi melalui proses inflamasi, apoptosis, dan penangkapan siklus sel. Janin yang diklasifikasikan sebagai resisten terhadap infeksi PRRSV karena kurangnya virus yang terdeteksi di jaringan janin (UNIF) menunjukkan tingkat angiogenesis di submukosa dan proliferasi sel di UEC mirip dengan janin CON. Dengan demikian, homeostasis angiogenesis dalam endometrium janin UNIF dapat digambarkan sebagai karakteristik resistensi terhadap infeksi PRRSV. Sebaliknya, penurunan angiogenesis diamati pada submukosa janin yang paling rentan (MEC) dan mungkin mendasari mekanisme penting yang terkait dengan kematian janin. Selanjutnya, penurunan angiogenesis pada submukosa janin IUGR dapat membantu mencegah infeksi PRRSV, menjelaskan ketahanan relatif dari fenotipe ini. Sementara proliferasi sel trofoblas menurun pada semua janin pasca infeksi, perubahan serupa pada UEC tampaknya bergantung pada

infeksi pada janin. Namun, tidak satu pun dari perubahan ini yang terkait dengan tingkat keparahan endometritis, placentitis, atau vaskulitis endometrium. Selain efek patologis yang diproduksi PRRSV dalam jaringan endometrium dan plasenta yang dilaporkan dalam penyelidikan lain, kami mengonfirmasi bahwa infeksi PRRSV pada jaringan reproduksi juga menurunkan intensitas pelabelan imuno VEGF yang secara masuk akal mengubah angiogenesis dalam submukosa dan proliferasi sel dalam sel MFI dan dengan demikian berdampak buruk pada janin. kelangsungan hidup.

Terima kasih

Para penulis mengakui Prairie Diagnostic Services Inc. dan banyak teknisi serta mahasiswa yang membantu percobaan hewan. Terima kasih khusus kepada Larhonda Sobchishin dan Eiko Kawamura atas bantuan mereka dalam pekerjaan mikroskop dan kepada anggota tim PGM yang memberikan saran positif.

Kontribusi Penulis

Semua penulis berpartisipasi dalam desain percobaan dan pengumpulan sampel. Pewarnaan dan mikroskop dilakukan oleh JAB-Z dengan bantuan teknis dari DJM, JAP, dan GH. Analisis statistik diselesaikan oleh JAB-Z dan JCSH. Pengawasan patologis disediakan oleh SED. JAB-Z, SED, dan JCSH menyusun naskahnya. Semua penulis berkontribusi dan menyetujui versi final.

Deklarasi Benturan Kepentingan

Penulis menyatakan tidak ada potensi konflik kepentingan sehubungan dengan penelitian, kepenulisan, dan/atau publikasi artikel ini.

Pendanaan

Penulis mengungkapkan penerimaan dukungan keuangan berikut untuk penelitian, kepengarangan, dan/atau publikasi artikel ini: Pendanaan diberikan dengan murah hati oleh Genome Canada (Proyek 2014LSARP_8202) dan Genome Prairie (Kementerian Pertanian Saskatchewan, Proyek #346143) dengan dukungan administratif yang diberikan oleh Genome Alberta.

ID ORCID

Susan E. Detmer  <https://orcid.org/0000-0002-4064-3460>

Referensi

1. Anderson JM, Stevenson BR, Jesaitis LA, dkk. Karakterisasi ZO-1, komponen protein dari persimpangan ketat dari hati tikus dan sel ginjal anjing Madin-Darby. *Se/J Biol.* 1988;106:1141–1149.
2. Bauer R, Walter B, Hoppe A, dkk. Distribusi berat badan dan ukuran organ pada babi yang baru lahir (*sus scrofa domestica*)— sebuah studi yang menggambarkan model hewan untuk retardasi pertumbuhan intrauterin asimetris. *Exp Toxicol Pathol.* 1998;50:59–65.
3. Burton G, Charnock-Jones D, Jauniaux E. Regulasi pertumbuhan dan fungsi vaskular pada plasenta manusia. *Reproduksi.* 2009;138:895–902.
4. Carmeliet P. Mekanisme angiogenesis dan arteriogenesis. *Nat Med.* 2000;6:389–395.
5. Carter AM. Evolusi fungsi plasenta pada mamalia: dasar molekuler transfer gas dan nutrisi, sekresi hormon, dan respons imun. *Physiol Rev.* 2012;92:1543–1576.
6. Charnock-Jones DS, Clark DE, Lisensi D, dkk. Distribusi faktor pertumbuhan endotel vaskular (VEGF) dan situs pengikatannya pada antarmuka ibu-janin selama kehamilan pada babi. *Reproduksi.* 2001;122:753–760.
7. Chen F, Wang T, Feng C, dkk. Perbedaan protein dalam plasenta dan endometrium antara pertumbuhan normal dan intrauterin membatasi pertumbuhan janin babi. *PLoS SATU.* 2015;10: e0142396.
8. Chen YM, Helm ET, Groeltz-Thrush JM, dkk. Transisi epitel-mesenkim dari enterosit serap dan penipisan sel patch M Peyer setelah infeksi PEDV. *Ilmu pengetahuan virus.* 2021;55:43–51.
9. Cheon DS, Chae C. Distribusi virus sindrom pernapasan dan reproduksi babi pada anak babi yang lahir mati dan lahir hidup dari induk babi yang terinfeksi secara eksperimental. *Comp Pathol.* 2001;124: 231–237.
10. Conroy A, Sergides L, Finney C, dkk. C5a meningkatkan respons inflamasi dan angiogenik yang tidak teratur terhadap malaria *in vitro*: implikasi potensial untuk malaria plasenta. *PLoS SATU.* 2009;4: e4953.
11. Ferrara N. Peran faktor pertumbuhan endotel vaskular dalam regulasi angiogenesis fisiologis. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2001;280:C1358–C1366.
12. Orang Rakyat J. *Angiogenesis.* *Se/Biol Endo.* 1984;27:412–428.
13. Gai C, Carpanetto A, Deregibus MC, Camussi G. Modulasi angiogenesis yang dimediasi vesikel ekstraseluler. *Histol Histop.* 2016;31:379–391.
14. Guidoni PB, Pasternak JA, Hamonic G, dkk. Penurunan intensitas protein persimpangan ketat dalam plasenta reproduksi babi dan sindrom pernapasan janin yang terinfeksi virus-2. *Plasenta.* 2021;112:153–161.
15. Guimaraes GC, Alves LA, Betarelli RP, dkk. Ekspresi faktor pertumbuhan endotel vaskular (VEGF) dan faktor VIII pada plasenta emas dan hubungannya dengan perkembangan janin. *Teriogenologi.* 2017;92:63–68.
16. Hamonic G, Pasternak JA, Forsberg NM, dkk. Ekspresi reseptor pengenal pola pada sel epitel uterus babi *in vivo* dan kultur. *Vet Immunol Immunopathol.* 2018;202: 1–10.
17. DJ Holtkamp, Kliebenstein JB, Neumann Ej, dkk. Penilaian dampak ekonomi virus sindrom pernapasan dan reproduksi babi pada produsen daging babi Amerika Serikat. *J Bab Menyembuhkan Prod.* 2013;21:72–84.
18. Karniyuchuk UU, Nauwynck HJ. Patogenesis dan pencegahan infeksi virus sindrom pernapasan dan reproduksi babi plasenta dan transplasenta. *Veter Res.* 2013;44: 1–14.
19. Karniyuchuk UU, Saha D, Geldhof M, dkk. Virus sindrom reproduksi dan pernapasan babi (PRRSV) menyebabkan apoptosis selama replikasinya di tempat implantasi janin. *Jalur Mikroba.* 2011;51:194–202.
20. Lacko LA, Hurtado R, Hinds S, dkk. Perubahan vaskularisasi feto-plasenta, malperfusi feto-plasenta, dan pembatasan pertumbuhan janin pada tikus dengan hilangnya fungsi Egfl7. *Perkembangan.* 2017;144:2469–2479.
21. Ladning A, Foxcroft G, Ashley C, dkk. Berat lahir, retardasi pertumbuhan intrauterin dan kerentanan janin terhadap virus sindrom pernapasan dan reproduksi babi. *PLoS SATU.* 2014;9:e109541.
22. Ladning A, Wilkinson J, Ashley C, dkk. Variasi dalam hasil janin, viral load dan mutasi urutan ORF5 dalam studi skala besar tanggapan fenotipik terhadap pajanan akhir kehamilan terhadap virus sindrom pernapasan dan reproduksi babi tipe 2. *PLoS SATU.* 2014;9:e96104.
23. Lager KM, Halbur PG. Lesi kasar dan mikroskopis pada janin babi yang terinfeksi virus sindrom pernapasan dan reproduksi babi. *J Vet Diagnosis Investasikan.* 1996;8: 275–282.
24. Mencintai CL, Osorio FA, Murtaugh MP, Zuckermann FA. Kekebalan bawaan dan adaptif terhadap virus sindrom pernapasan dan reproduksi babi. *Dokter Hewan Immunol Immuno.* 2015;167: 1–14.
25. Malgarin CM, Moser F, Pasternak JA, dkk. Hipoksia dan apoptosis janin setelah infeksi virus sindrom reproduksi dan pernafasan babi ibu (PRRSV). *Res Dokter Hewan BMC.* 2021;17: 1–14.
26. Malgarin CM, Nosach R, Novakovic P, dkk. Klasifikasi ketahanan janin terhadap sindrom reproduksi dan pernapasan babi (PRRS) berdasarkan viral load temporal pada jaringan ibu dan janin akhir kehamilan. *Res Virus.* 2019;260: 151–162.
27. Mengeling WL, Lager K, Vorwald A. Karakterisasi temporal infeksi transplasenta janin babi dengan virus sindrom pernapasan dan reproduksi babi. *Am J Vet Res.* 1994;55:1391–1398.
28. Miller AL, Pasternak JA, Medeiros NJ, dkk. Sintesis *in vivo* bakteri amyloid curli berkontribusi terhadap peradangan sendi selama Infeksi S. Typhimurium. *Patog PLoS.* 2020;16:e1008591.

29. Moura CAA, Johnson C, Baker SR, dkk. Penilaian dampak produksi langsung setelah vaksinasi virus PRRS tipe 2 yang dilemahkan pada peternakan babi. *Porcine Heal Kelola*. 2019;5:13.
30. Novakovic P, Detmer SE, Suleman M, dkk. Perubahan histologis terkait dengan pemisahan plasenta pada gilts yang terinfeksi virus sindrom pernapasan dan reproduksi babi. *Patol Dokter Hewan*. 2018;55:521–530.
31. Novakovic P, Harding JC, Al-Dissi AN, Detmer SE. Infeksi virus sindrom pernapasan dan reproduksi babi tipe 2 meningkatkan apoptosis pada antarmuka ibu-janin pada kehamilan akhir gilts. *PLoS ONE*. 2017;12:e0173360.
32. Novakovic P, Harding JC, Al-Dissi AN, dkk. Evaluasi patologis infeksi virus sindrom pernapasan dan reproduksi babi tipe 2 pada antarmuka ibu-janin pada kehamilan akhir gilts. *PLoS ONE*. 2016;11:e0151198.
33. Pasternak JA, MacPhee DJ, Harding JC. Respons sitokin janin terhadap infeksi virus-2 sindrom pernapasan dan reproduksi babi. *Sitokin*. 2020;126:154883.
34. Pasternak JA, MacPhee DJ, Harding JC. Disfungsi tiroid ibu dan janin setelah infeksi virus2 reproduksi babi dan sindrom pernafasan. *Dokter Hewan Res*. 2020;51: 1–14.
35. Redman CW, Sersan IL. Kemajuan terbaru dalam memahami preeklamsia. *Sains*. 2005;308:1592–1594.
36. Reynolds LP, Caton JS, Redmer DA, dkk. Buktii adanya perubahan aliran darah plasenta dan vaskularisasi pada kehamilan yang terganggu. *J Physiol*. 2006;572:51–58.
37. Rossow K, Laube K, Goyal S, Collins J. Lesi mikroskopis janin pada reproduksi babi dan sindrom pernapasan aborsi yang diinduksi virus. *Veter Pathol*. 1996;33:95–99.
38. Rowland RR. Interaksi antara PRRSV dan janin babi gestasi akhir. *Res Virus*. 2010;154:114–122.
39. Sanchis EG, Cristofolini AL, Fiorimanti MR, dkk. Apoptosis dan proliferasi sel dalam vaskularisasi plasenta babi. *Reproduksi Hewan Sci*. 2017;184:20–28.
40. Scholzen T, Gerdes J. Protein Ki-67: dari yang diketahui dan yang tidak diketahui. *Fisiol Sel J*. 2000;182:311–322.
41. Stenhouse C, Hogg CO, Ashworth CJ. Asosiasi antara ukuran janin, jenis kelamin dan proliferasi dan apoptosis pada antarmuka fetomaternal babi. *Plasenta*. 2018;70:15–24.
42. Suleman M, Novakovic P, Malgarin C, dkk. Evaluasi imunofluoresen spatiotemporal dari reproduksi babi dan transmisi virus sindrom pernapasan melintasi antarmuka ibu-janin. *Jalan Dis*. 2018;76:fty060.
43. Terpstra C, Wensvoort G, Pol J. Reproduksi eksperimental aborsi epidemi babi dan sindrom pernapasan (penyakit babi misterius) oleh infeksi Lelystad virus: Postulat Koch terpenuhi. *Quart Veter*. 1991;13:131–136.
44. Thomann B, Rushton J, Schuepbach-Regula G, Nathues H. Pemodelan efek ekonomi vaksinasi terhadap sindrom reproduksi babi dan pernapasan: dampak efektivitas vaksinasi, harga vaksin, dan cakupan vaksinasi. *Sci Dokter Hewan Depan*. 2020;7:500.
45. Todorova D, Simoncini S, Lacroix R, dkk. Vesikel ekstraseluler dalam angiogenesis. *Sir Res*. 2017;120:1658–1673.
46. Vallet J, Freking B. Perbedaan struktur plasenta selama kehamilan terkait dengan janin babi besar dan kecil. *J Anim Sci*. 2007;85:3267–3275.
47. Van Goor A, Pasternak A, Walker K, dkk. Respons diferensial pada plasenta dan timus janin pada 12 hari pasca infeksi menjelaskan mekanisme tingkat virus dan kompromi janin setelah infeksi PRRSV2. *Genomik BMC*. 2020;21: 1–20.
48. Vonnahme KA, Ford SP. Ekspresi mRNA sistem reseptor faktor pertumbuhan endotel vaskular plasenta pada babi dipilih untuk efisiensi plasenta. *J Physiol*. 2004;554:194–201.
49. Winther H, Ahmed A, Dantzer V. Lokalisasi imunohistokimia faktor pertumbuhan endotel vaskular (VEGF) dan dua reseptor spesifiknya, Flt-1 dan KDR, di plasenta babi dan rahim yang tidak hamil. *Plasenta*. 1999;20:35–43.
50. Zhou Y, McMaster M, Woo K, dkk. Ligan dan reseptor faktor pertumbuhan endotel vaskular yang mengatur kelangsungan hidup sitotrofoblas manusia mengalami disregulasi pada preeklamsia berat dan hemolis, peningkatan enzim hati, dan sindrom trombosit rendah. *Am J Pathol*. 2002;160:1405–1423.

JURNAL ASLI (DOKUMEN SUMBER)

Investigation of the Pathological and Biochemical Characterizations in Naturally Infected Calves with Foot and Mouth Disease (FMD)

Gehan N. Alagmy^{1*}, Sahar S. Abdel-Hamid², Suzan Salah³, Heba A. Ewis¹,
Hend, M. Megahed⁴, Dalia T. Mohamed²

¹Department of Pathology, Animal Health Research Institute (AHRI) Zagazig Branch, Agricultural Research Center (ARC), Egypt.

²Department of Clinical Pathology, Animal Health Research Institute (AHRI) Zagazig Branch, Agricultural Research Center (ARC), Egypt.

³Department of Virology, Animal Health Research Institute (AHRI) Shebin Branch, Agricultural Research Center (ARC), Egypt.

⁴Department of Biochemistry, Animal Health Research Institute (AHRI) Zagazig Branch, Agricultural Research Center (ARC), Egypt.

Abstract

All cloven-hoofed animals are susceptible to foot-and-mouth disease (FMD) which is highly contagious viral illness. FMD is answerable for serious economic losses in Egypt. Despite the primary control approach being annual mass vaccination campaigns using polyvalent inactivated vaccinations, failure of vaccination has been according in several cases. The study was conducted on fifty native breed calves up to one year of age from both sexes, thirty calves suspected to be infected with FMD, and twenty clinically healthy calves were considered as controls. A total of fifty samples from organs (heart- epithelial tissue) were gathered from calves suspected to be FMD infected obtained from September 2021 to March 2022 in Sharkia and Menoufia governorates/Egypt. The current study was designed for the isolation of FMDV using BHK-21 cells. Molecular identification, through the extraction of Viral RNA, and RT-PCR were used to test samples for the FMDV virus. Diseased animals have changes in body temperature, respiration rate, and heart rate compared to controls. Moreover, murmur sounds were observed during auscultation of the heart. A hematological study revealed significant reductions in the RBCs count, hemoglobin concentration, and PCV% with leukopenia and lymphopenia in the diseased group. The serum cardiac troponin, lipase, non-esterified fatty acid, beta hydroxyl butyric acid, glucose, AST, ALT activities, and blood urea nitrogen were considerably enhanced in diseased animals. But serum insulin and amylase were significantly reduced in diseased calves. Histopathological examination of calves revealed extensive lymph histiocytic myocarditis and necrotic lesions in the pancreas, liver, and kidney. In conclusion, the early stages of FMD in calves is characterized by myocardial cell injury, elevation of blood cardiac troponin, and necrotic pancreatitis represented by atrophy of pancreatic glands and islets of Langerhans.

KEYWORDS

Foot and mouth disease, BHK; RT-PCR, Troponin, Myocarditis, Pancreatitis

INTRODUCTION

FMD is seen in both domestic and wild animals with cloven hooves as one of the most prevalent contagious transboundary animal diseases, it has a negative impact on livestock productivity and results in economic losses. (OIE, 2021). FMDV belongs to the Picornaviridae family of the genus Aphthovirus. The virus is tiny, non-enveloped, positive sense, single-stranded, and non-segmented RNA, and it is encased in an icosahedral capsid that contains roughly 60 copies of four structural viral proteins (VP1, VP2, VP3, and VP4) (Domingo *et al.*, 2002). There are seven immunologically different serotypes of FMDV: SAT-1, SAT-2, SAT-3, A, O, C, and Asia. (Jamal and Belsham, 2013). Due to the endemic nature of FMD viruses as well as the introduction of exotic viral strains from the Middle East and Sub-Saharan Africa, the epidemiology of FMD in Egypt is complicated (Tekleghiorghis *et al.*, 2016). An important diagnostic method for the diagnosis of FMDV is reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), which is characterized by High sensitivity and specificity characteristics. (Asaad *et al.*, 2020). Fever, appetite loss,

lameness, and vesicular lesions of the foot, tongue, and teats are some of the clinical indications of FMD. The mortality rate is about 5 % in adult ruminants, but the rate may be boosted up to 50 % by heart muscle damage in young animals (Barker *et al.*, 1993). In calves, myocardial inflammation is regarded as a fatal variant of FMD that does not produce the typical blister lesions seen in mature cattle. (Barker *et al.*, 1993; Alexandersen *et al.*, 2003). The acute myocarditis of young animals is distinguished by hyaline degeneration, necrosis of muscle fibers, and an intense infiltration mainly of lymphocytes (Alexandersen *et al.*, 2003). The necrotic lesions in the heart make it incapable to pump out blood throughout the body leading to the development of a 'currant jelly clot' in the heart and its larger vasculature. Consolidated lungs were also found throughout the necropsy as described earlier (Alexandersen *et al.*, 2003). Since auscultation of the chest and heart, and the incidence of sudden death in the field, may apocalypse for the clinical diagnosis of FMD, the use of some biomarkers for assessment of myocardial damage is also recommended. Diagnosis of myocardial disease in cattle is still difficult and could be extreme, based primarily on clinical exam-

inations of the diseased animal. (Aslani *et al.*, 2013). The diagnosis of FMD can be tested by hemato-biochemical, estimation of specific cardiac biomarkers like cardiac troponin-I, virus isolation, and identification (Aktas *et al.*, 2015).

The primary goals of the current study are to identify recent FMD serotypes, assess the hematological and biochemical biomarker responses of local breed calves affected with myocarditis caused by FMD, and further evaluate the clinical and histopathological characteristics of afflicted and autopsied animals.

MATERIALS AND METHODS

Ethical approval

This study was declared by the Local Committee of the (ARC-IACUC) committee Institute: Animal Health Research Institute Ethical Committee Approval Number: ARC/AH/22/10. All methods were done in accordance with the Animal Health Research Institute guidelines according to the OIE standards for use of animals in research and education.

Animals

Fifty native Egyptian calves up to one year of age were included in the study. During a disease epidemic in the Sharkia and Menofia Governorates of Egypt, the calves were separated into 20 seemingly healthy control calves and 30 calves who had been clinically identified as having FMD infection from various farms. According to the methodology of Smith (2015), the calves were clinically checked for pulse rate, temperature, respiratory rate, and ruminal movement by auscultation to identify heart sounds and arrhythmias.

Sampling

Thirty samples were taken from calves exhibiting FMD clinical symptoms. Epithelial tissue from a recently ruptured or an unruptured tongue vesicle was used as samples, and they were placed in a transport medium made of phosphate-buffered saline (PBS) (OIE, 2012). From September 2021 to March 2022, samples from clinically diagnosed cattle were taken in the Egyptian governorates of Sharkia and Menofia.

Viral Identification

Virus Isolation

Baby hamster kidney-21 (BHK-21) cells were injected with prepared samples the supernatants. When cytopathic effects (CPE) manifested in roughly 80% of the monolayer, inoculated cells were collected (about three days post inoculation). It was performed according to Barry *et al.* (2009) and Ferris *et al.* (2009).

Reference FMD Virus was obtained from the Virology Department, Animal Health Research Institute, Egypt, that was used as a positive control for PCR.

Polymerase chain reaction was conducted in Animal Health Research Institute, Biotechnology unit, and reference lab for veterinary quality control (OIE, 2012).

Nucleic acid extraction from samples was conducted using the QIAampminielute virus spin kit (Qiagen, Germany, GmbH).

Oligonucleotide Primers were developed from the gene for VP protein with the following sequences:

Forward primer 5'- GCCTGGTCTTCAG GTCT -3'

Reverse primer 5' - CCAGCCCCCTCTCAGATC -3'. The ampl-

icon size of the PCR product is 326 bp. It was manufactured in the laboratories of Metabion- Germany according to OIE (2012).

Analysis of the PCR Products

The PCR products were separated on 1.5% agarose gel by electrophoresis. The fragment sizes were calculated using DNA ladders from Generuler 100bp. A gel documentation system (Alpha Innotech, Biometra) took pictures of the gel, and computer software was used to analyze the information.

Blood samples

By puncturing the jugular vein, ten ml of blood were drawn from the calves, and one ml of the blood was transferred into vacuum EDTA-coated tubes for hematological analysis. The remaining blood was drawn without using an anticoagulant and allowed to coagulate for the purpose of isolating the serum. Centrifugation at 3000 rpm for 10 minutes was used to obtain serum samples, which were then stored at 20°C until analysis.

The hematological studies

Blood samples with anticoagulants were subjected to detection of cellular blood constituents according to Feldman *et al.* (2000).

Biochemical studies

Using third-generation cardiac troponin T (cTnT) produced by Roche Diagnostics, Indianapolis, GMBH, Germany, the amount of cTnT was quantitatively measured using electro-chemiluminescence technology. The Card-I-kit Combo Test was used to evaluate the level of cTnI in blood samples (AboTech, Turku, Finland). Insulin level was detected according to Chevenne *et al.* (1998), amylase enzyme according to Winn-Deen *et al.* (2003), and lipase according to Tietz and Fiereck (1966). Serum glucose was determined according to the method described by Lott and Turner (1975). Non-esterified fatty acid (NEFA) according to Smith and Wilson (2006), and Beta hydroxyl butyric acid (BHBA) according to Young (2000). Serum liver enzymes (alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) activities were estimated according to Murray (1984). The BUN was determined according to Patton and Crouch (1977) and the serum creatinine was estimated according to Henry (1974).

Histopathological examination

Specimens from lesions representative of FMD from freshly died calves (heart, pancreas, liver, and kidney) were fixed in 10% neutral formalin then histopathological examination; the samples were dehydrated and embedded in paraffin wax, then stained with hematoxylin and eosin and examined (Suvarna *et al.*, 2013).

Statistical analysis

According to Tamhane and Dunlop (2000), the statistical analysis of the data from this study was done using the T-test.

RESULTS

Clinical findings

Depending on the calves' ages, the clinical symptoms varied

somewhat. Anorexia, cardiac arrhythmia, fever that occasionally reached 41°C, and the unexpected death of some animals without any prior clinical symptoms. The sick calves exhibit indications of lethargy, inactivity, panting while mouth breathing, being unable to suckle, and recumbent. Severe salivation with vesicles, erosions, and ulcers at different sites of the buccal cavities and inter-digital spaces of the hoof. 30 diseased calves showed high temperature ($>40^{\circ}\text{C}$), tachypnea (>50 breath / min), tachycardia (> 100 beats/ min), murmur sounds. 19 diseased calves showed oral lesions. 7 diseased calves showed foot lesion. 4 diseased calves showed both oral and foot lesions. This was compared to 20 control calves that are free from previous symptoms.

Tissue culture

Propagation of suspected samples on the BHK-21 cell line resulted in showing characteristic cytopathic effect (CPE) for three successive passages 24-48 h post-inoculation (Fig. 1).

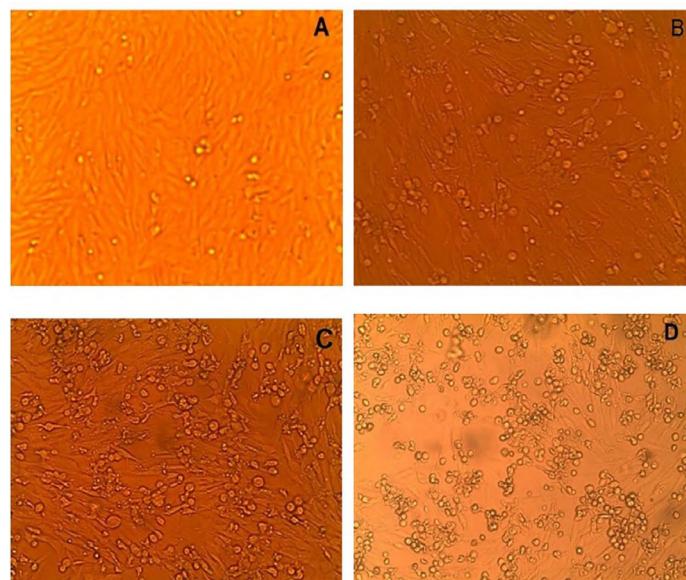


Fig. 1. (A) Normal control BHK-21 cell line. (B) FMD infected BHK-21 cell (stage 1: initiation of infection and cell rounding, and flattening started, photo taken after 12 hours). (C) FMD infected BHK-21 cell (stage 2, almost 100% cell infected, photo taken after 24 hours of infection). (D) FMD infected BHK-21 cell (stage 3) (D).

Molecular characterization of FMDV by PCR

FMDV samples (n.=10) tested for the presence of VP1 (target gene) at expected size: 326 (Fig. 2).

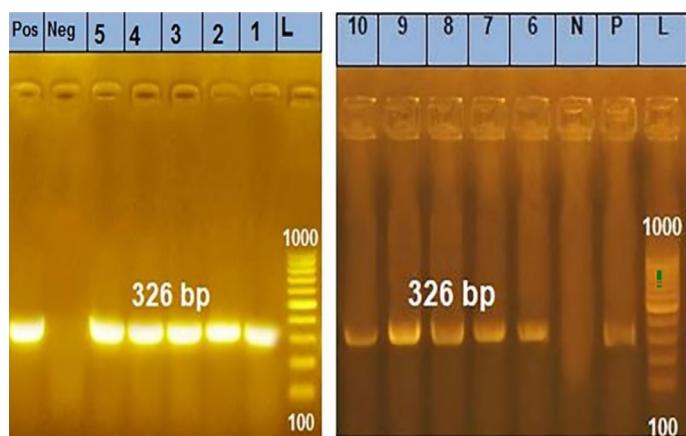


Fig. 2. Detection of FMDV by PCR (agarose gel electrophoresis of the PCR products). The size of amplicons are indicated. (L) A fragment of λ DNA is used as a size marker. The amplification product (amplicon) size from FMDV. Lanes: (L) 100 bp DNA ladder. (Pos): positive PCR products from FMD virus reference strain. (Neg): negative control (no primers). Lanes 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10): +ve samples.

Hematological findings

Diseased calves revealed significant decreases in RBCs count, Hb concentration and PCV% compared with the control group. Moreover, the leukogram of diseased calves revealed significant leukopenia and lymphopenia (Table 1).

Table 1. Hematological parameters (Mean values \pm S.E) of healthy control and diseased calves.

Parameters	Control calves (n=20)	Diseased calves (n=20)
RBCs (10^6 /UL)	7.12 \pm 0.14	5.24 \pm 0.16***
Hb (gm/dl)	11.48 \pm 0.10	9.22 \pm 0.17**
PCV %	37.38 \pm 0.18	28.04 \pm 0.21**
TLC (10^3 /UL)	8.66 \pm 0.19	7.09 \pm 0.23***
Neutrophil (10^3 /UL)	3.82 \pm 0.41	3.68 \pm 0.38
Lymphocyte (10^3 /UL)	4.28 \pm 0.25	2.89 \pm 0.18***
Eosinophil (10^3 /UL)	0.15 \pm 0.005	0.13 \pm 0.005
Monocyte (10^3 /UL)	0.41 \pm 0.02	0.39 \pm 0.02

*: Significant at $P < 0.05$; **: Significant at $P < 0.01$; ***: Significant at $P < 0.001$

Biochemical analysis

The data showed significant increases in cardiac troponin, lipase enzyme, glucose, non-esterified fatty acid, beta hydroxyl butyric acid, AST, ALT activities, and BUN. On the other hand, serum insulin and amylase showed significant decreases in diseased calves compared with the healthy control group (Table 2).

Table 2. Serum biochemical parameters (Mean values \pm S.E) of healthy control and diseased calves.

Parameters	Control calves (n=20)	Diseased calves (n=20)
Cardiac troponin ($\mu\text{g/L}$)	0.24 \pm 0.03	14.80 \pm 0 .62***
Insulin ($\mu\text{LU/ml}$)	16.42 \pm 1.17	12.89 \pm 1.06**
Amylase (U/L)	27.26 \pm 1.15	21.46 \pm 1.20*
Lipase (U/L)	33.58 \pm 2.12	47.98 \pm 3.85**
Glucose (mg/dl)	70.2 \pm 3.63	94.15 \pm 4.60***
Non-esterified fatty acid (mmol/L)	0.56 \pm 0.05	1.44 \pm 0.22**
Beta hydroxyl butyric acid (mmol/L)	1.35 \pm 0.30	4.74 \pm 0.43***
AST (IU/L)	63.9 \pm 2.74	98.7 \pm 3.62***
ALT (IU/L)	31.6 \pm 0.65	52.8 \pm 2.32***
Blood urea nitrogen (mg/dl)	22.5 \pm 0.40	27.3 \pm 0.51***
Creatinine (mg/dl)	1.72 \pm 0.007	1.74 \pm 0.008

*: Significant at $P < 0.05$; **: Significant at $P < 0.01$; ***: Significant at $P < 0.001$

Post-mortem examination

The heart was forming white greyish streaks on the myocardial wall separated by congested areas. The gastrointestinal tract mucosa was hyperemic with vesicle formation (Fig. 3A). The pancreas was hyperemic and firm (Fig. 3B). The Liver, and kidneys were enlarged and pale.

Histopathological examination

The heart of calves showed characteristic coagulative necrosis with massive lymphohistiocytic infiltration beside a few neutrophils together with focal edema between cardiac myofibrils (Fig. 3C & D). Endothelial destruction, perivascular and intermus-

cular edema containing fibrin threads and leucocytic cells mainly lymphocytes and neutrophils (Fig. 3E). The pericardium infiltrated with a number of mononuclear inflammatory cells mixed with fibrin threads (Fig. 3F).

The pancreas showed interlobular edema in the septa with necrosis and atrophy of exocrine and endocrine pancreatic glands together with edematous fibrous tissues infiltrated by leucocytes around pancreatic ducts were noticed (Fig. 4A&B). Additionally, the pancreatic ducts showed metaplasia or desquamation to the epithelial lining with degenerated and hyalinization in its smooth muscle fibers besides necrosis of the adjacent pancreatic glands and lymphocytic infiltration (necrotic pancreatitis) (Fig. 4C). Some islets of Langerhans showed hypocellularity and hyaline eosinophilic degenerative changes (Fig. 4D).

The liver showed focal hepatic coagulative necrosis and focal infiltration by mild inflammatory cells mainly lymphocytes and dilatation of the sinusoids (Fig. 4E). Th4e portal area showed hyperplasia of the biliary epithelium and the periductal interstitial congestion of the central (Fig. 4F). Later, the survival animals showed interstitial leucocytic aggregations among the hepatocytes.

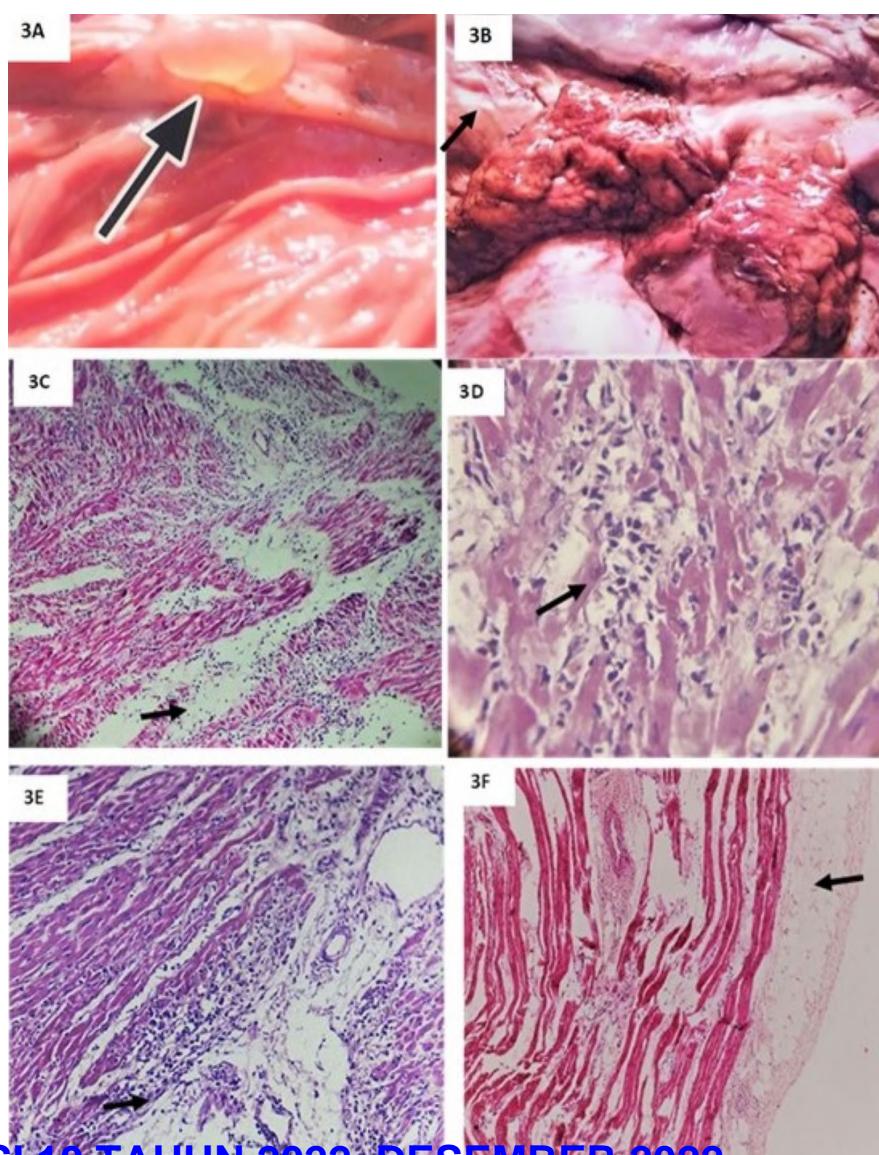
The kidney showed cloudy swelling, hydropic degeneration, hypercellularity of some glomeruli with the absence of the glomerular spaces of bowman's capsules, and endothelial hyper-

plasia (Fig. 4G). In advanced cases, the kidneys showed severe coagulative necrosis in some renal tubules and focal hemorrhage in the renal parenchyma (Fig. 4H). Some glomeruli revealed degenerative changes and shrinkage in some glomerular tufts.

DISCUSSION

In Egypt, despite the government's frequent vaccination of calves with the FMD vaccine, there are numerous FMD outbreaks in Egypt each year. Since FMD is endemic in Egypt and there have been numerous outbreaks involving serotypes O, A, and SAT-2 for a long time (Abd El-Rhman *et al.*, 2021). Immunologically, the viral protein 1 (VP1) coding area of FMDV strains is in charge of protective immunity, serotyping specificity, cell virus attachment, and antigenic heterogeneity. The world reference laboratory has tested RT-PCR techniques using primers for FMD for routine FMD viral diagnosis. A potent method for the accurate detection of FMDV is RT-PCR (Paixão *et al.*, 2008). When FMDV infects BHK-21 tissue culture, it typically causes significant cytopathology and cell death. (Herrera *et al.*, 2008).

In this current study, unruptured or recently ruptured vesicles from the tongue of clinically suspicious calves were used as trials for isolating FMDV from epithelial tissue. Samples were injected into a confluent BHK-21 cell culture and developed of CPE. By 12 hours after infection, characteristic CPE had begun to manifest,



Gehan N Alagmy et al. / Journal of Advanced Veterinary Research (2022) Volume 12, Issue 6, 728-735

which comprised flattening and rounding cells, the production of multinucleated cells, the dissolution of intracellular bridges. Within 48 hours, more than 60% of cells had died, and by 72 hours, the cell monolayer had separated from the surface of the culture vessels. BHK-21 cell isolation of FMDV is a highly sensitive technique.

To provide further confirmation, Molecular (RT-PCR) diagnosis was used as quick detection and confirmatory test according to OIE (2012), RT-PCR was carried out by choosing viral gene VP1-based primers as a conserved region. The RNA was extracted from the samples. The RT-PCR was conducted utilizing certain primer sets that resulted in an amplified fragment of 326 bp, which is equivalent to the FMDV amplicon size expected. The size of the attachment protein gene fragment was the same in the FMDV reference strain and the epithelial tissue test samples. Consequently, it was determined that 10 examined samples were FMD-positive.

Diseased animals in the current investigation had a variety of clinical symptoms previously documented by Alexendersen *et al.* (2003) and Alsaad *et al.*, (2020). However, FMD symptoms and severity may differ between animal breeds, and even within breeds, most likely attributable to the virus's strain and serotype, the animals' genetic factors, or their immune systems (Alsaad *et al.*, 2020). Clinical findings of fever raised heart and respiratory rates and murmur have conjointly been reportable in myocar-

ditis because of FMD, as seen previously (Karapinar *et al.*, 2010). These results therefore illustrate the clinical features of myocarditis-related circulatory insufficiency. The body temperature, pulse rate, respiration rate, and abnormal heart rhythm in auscultation without FMD vesicular lesions have all been described in suckling calves by Karapinar *et al.* (2010) as the major clinical changes in FMD-infected calves. There may or may not be concomitant vesicular lesions when FMDV myotropism develops. According to Arzt *et al.*, (2011) the existence of myotropism and vesicles is referred to as enlarged multi-tropism (the muscle and the epithelium).

Hematological analysis of FMD-infected animals revealed a significant reduction in RBCs count, hemoglobin concentration, and PCV%. Similar findings were recorded by Ghanem and Abdel-Hamid (2010) and Gattani *et al.* (2011). Therefore, endocrinopathy that develops as a result of FMD infection may be to blame for the predominance of anemia (Gokce *et al.*, 2004), or as a result of insufficient consumption of vitamin B12 and folic acid in the food, liver metabolism issues, and reduced absorption owing to intestinal damage (Nasr El-Deen *et al.*, 2017). However, from our histopathological study, the liver and kidneys of infected animals suffered from degenerations and focal necrosis, as erythropoietin is a vital substance produced by the kidneys and responsible for the process of erythropoiesis, one may make a case for the main reason for anemia in FMD infected animals

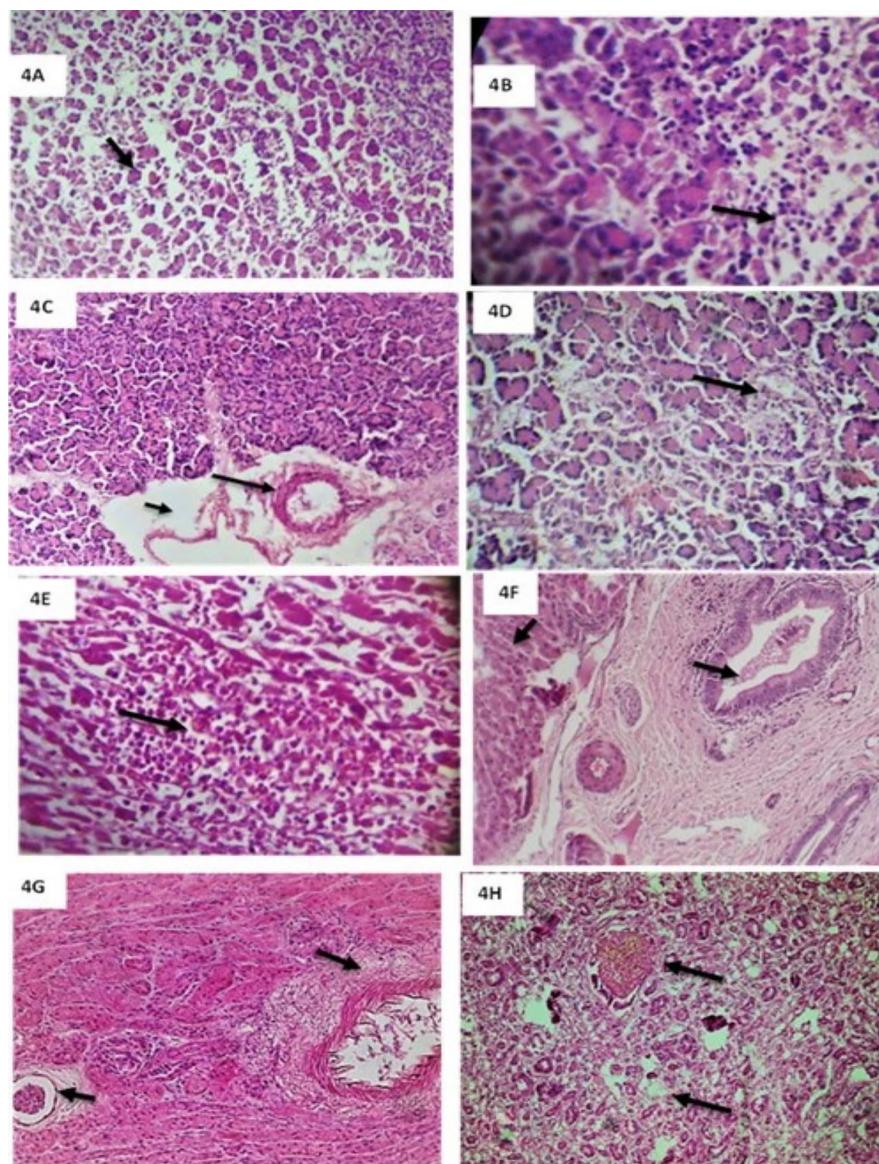


Fig. 4. (A & B) Pancreas showing interlobular edema in the septa with necrosis and atrophy of exocrine gland. (C) Interstitial edema, metaplasia of the epithelial lining with degenerated squamous cells in the small intestine. (D) Liver showing hypotrophic degeneration of hepatocytes, some degenerated bile ducts, and edema. (E) Liver showing focal infiltration mononuclear cells mainly lymphocytes among the necrotic hepatocytes. (F) Liver showing hyperplasia of the epithelial cells lining bile ducts and hepatocellular degenerative changes. (G) Kidney showing cloudy swelling, hydropic degeneration, and endothelial hyperplasia. (H) Kidney showing severe coagulative necrosis of the renal tubules, interstitial edema, and focal hemorrhage (H&E X100,200 and 400)

(Jubb *et al.*, 1991).

Leucopenia caused by lymphopenia was found in FMDV infection (gp.2) cases. Such a drop in lymphocytic count may be caused by transitory immunosuppression brought on by FMDV infection of T and B cells during a brief period when infection hits the peak of viremia (Diaz and Sevilla, 2006). This transient immunosuppression promotes widespread viral dispersal and shedding into the environment (Parida *et al.*, 2006). Moreover, Olabode *et al.* (2013) recorded a significant drop in total leukocyte count in blood samples taken within three days post foot and mouth disease infection.

Neutrophil, monocytic, and eosinophilic counts of sick groups showed no significant alterations. Similar results were additionally recorded by Krupakaran *et al.* (2009) and Ghanem and Abd-Hamid (2010).

The earliest biochemical signs of heart muscle injury are serum cardiac troponins (Boccardo *et al.*, 2000). Because cTnI is 100% tissue-specific for the heart, it is a great tool for use as a biochemical marker for identifying damage to the heart muscle (Bodor *et al.*, 1995).

According to Lim *et al.* (2005), the histologic finding of inflammation was a later sign of myocardial harm following viral infection than the blood cardiac troponin levels. The amount of inflammatory and degenerative alterations in the myocardium are likely reflected by the increase in serum cTnI, which is inversely correlated with disease severity.

The cardiac cell damage and degeneration are shown by the significantly substantial increases in cTnI levels in FMD-infected calves compared to control calves. This finding is supported by the work of Sobhy *et al.* (2018) and Aly *et al.* (2020) and is connected to FMDV's myotropism action, which causes cardiac insufficiency and myocardial damage, particularly in heart tissue (Sharma *et al.*, 2004).

These results were supported by necrosis of the myocardium in the histopathologic section. The characteristic lesion of myocardial infarction on the heart has been typically observed in FMD virus infection mainly in young calves which could be the cause of sudden death and high mortalities. The Cardiac muscles of calves revealed myocardial necrosis and multifocal lymphohistiocytic infiltration beside a few neutrophils. These results have an agreement with Ali, *et al.* (2016) and Gab-Allah *et al.* (2018) who recorded multifocal lymph histiocytic myocarditis. In our study serum lipase enzyme levels, non-esterified fatty acids (NEFA), and beta hydroxyl butyric acid (BHBA) were considerably increased in diseased calves compared with the control group, our results were approved by González, *et al.* (2011) and Eman *et al.* (2018), the rise in (NEFA) could also because of increasing its mobilization from adipose tissues to blood (Baird, 1982), and later on, increase the level of lipase enzyme in infected calves. The rise in (BHBA) is due to excessive fat mobilization and accumulation of acetyl-coenzyme A which changed into acetoacetate and later on reduced to BHBA by BHBA dehydrogenase (Baird, 1982). In our study, there is a significant increase in the level of glucose and a significant decrease in insulin and amylase levels in the infected calves, our result is compatible with Nasr El-Deen *et al.* (2017) and Saadoon *et al.* (2019). High BHBA concentrations were accompanied by higher insulin resistance and higher NEFAs concentrations were related to a lower insulin secretion considerably (Kerestes *et al.*, 2009). That would additionally explain the observed hypoinsulinemia in our present study. Hyperglycemia is because of the direct destruction of pancreatic -cells by FMD virus as a result of replication of the FMD virus within the pancreas which resulted in the destruction of insulin-producing cells (beta cells in the pancreas) and subsequently lead to hypoinsulinemia. These results were supported by necrosis of pancreatic cells as shown in the histopathology. The reduction in serum amylase enzyme level in the present study might be attributed to acute pancreatitis (Krehbiel *et al.*, 1995) or as a result of hypoinsulinemia as stated by Ali *et al.* (2016).

According to the results of the current investigation, the serum biochemical examination of calves that had been clinically

infected with FMD revealed a considerable rise in AST and ALT activities that might be caused by the virus's damaging effects on the myocardial muscles and hepatocytes, these findings agree with previous studies (Nath *et al.*, 2014; Nasr El Deen *et al.*, 2017). However, increased creatinine and BUN levels in diseased calves may be brought on by starvation, dehydration, fever, an increase in catabolism, and tissue injury, which all lead to pre-renal azotemia (Kaneko *et al.*, 1997). Similar results were reported by Saravanam *et al.* (2020).

The microscopic examination of the pancreas showed necrotic pancreatitis, interlobular edema among the septa with necrosis, and atrophy of exocrine and endocrine pancreatic glands infiltrated by round cells (mainly lymphocytes) around pancreatic ducts. Some islets of Langerhans showed hyaline eosinophilic degeneration and hypocellular. The authors opinion considers these lesions in the pancreas need further studies to explore if it is a primary target organ for viral infection and replication. Arzt *et al.* (2011) recorded pancreatic atrophy in both exocrine and endocrine portions with edema and necrosis besides the absence of some acinar lumen. Also, the previous lesions were partially agreed with those obtained by Thomas (2002) who recorded pancreatic islets and acini exhibit degeneration in chronically infected cattle.

Examination of the liver revealed multi-focal hepatic coagulative necrosis and focal infiltration by mild inflammatory cells mainly lymphocytes and dilatation of the sinusoids. These reports have great accordance with the results of Brown *et al.* (1996) and Ali *et al.* (2016) who recorded centrilobular coagulative necrosis, fatty changes, and some portal area infiltrated by few lymphocytes. Moreover, the lesion in the hepatic capsule and parenchyma (fibrosis) is due to concomitant infection by other pathogens.

The kidneys in this study revealed severe coagulative necrosis in the renal tubules and focal hemorrhage in the renal parenchyma. Some glomeruli were degenerative changes and shrinkage of some glomerular tufts Gab-Allah *et al.* (2018) found severely congested blood vessels, necrosis of renal tubular, hyaline degeneration, and necrotic glomerular tufts. Also, Lubroth (2002) explained that the lesions in liver and kidneys are due to infarction of heart muscle causing focal necrosis and the presence of clostridial bacilli causing a secondary bacterial infection.

CONCLUSION

In conclusion, the findings of this study indicate that the cardiac form of FMD in young animals does not manifest vesicular lesions or pathognomonic clinical symptoms. A highly sensitive approach for detecting myocardial cell injury in the early stages of the illness is the measurement of blood cardiac troponin. Necrotic pancreatitis, atrophy of pancreatic glands and islets of Langerhans were obviously need more investigation determined if these lesions might be one of the causes of mortalities due to hypoinsulinaemia. Myocarditis caused by FMDV is closely correlated with age and is more common in younger calves.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge the kind support of professor Dr. Mohamed Abdo Ebrahim Chief researcher of Biochemistry. Animal Health Research Institute (AHRI), Agricultural Research Center (ARC).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

- Abd-Ebrahim M, Suleiman A, Bazid A.I., Abo El-Hassan D.G., 2021. Molecular and serological typing of foot-and-mouth disease virus serotypes currently circulating in Egypt. Iraqi J. Vet. Sc. 35,

581-588.

- Aktas, M.S., Ozkanlar,Y., Oruc, E., Sozdutmaz, I., Kirbas, A., 2015. Myocarditis associated with foot-and-mouth disease in suckling calves. *Vet. Archiv.* 85, 273-282.
- Alexandersen, S., Zhang Z., Donaldson, A.I., Garland, A.J., 2003. The pathogenesis and diagnosis of foot and mouth disease. *J. Comp. Patho.* 129, 1-36.
- Ali, A.A., Hafez, M.H., Ahmad, B., Hasanin, S.A., Algabri, N., Sheire, H.A., 2016. Pathological and molecular investigations on foot and mouth virus outbreaks among cattle herds in Dakahlia Governorate, Egypt. *Zag. Vet. J.* 44, 128-137.
- Alsaad, K., Al-Autaish, H., Ahmed, J., 2020. Evaluation of cardiac enzymes and acute phase response as biomarkers for rapid diagnosis of myocarditis in calves with FMD. *Iraqi J. Vet. Sci.* 34, 31-37.
- Aly, M., Nayel, M., Salama, A., Ghazy, E., Elshahawy, I., 2020. Cardiac troponin I as a cardiac biomarker has prognostic and predictive value for poor survival in Egyptian buffalo calves with foot-and-mouth disease. *Vet. World*, 13, 890-895.
- Arzt, J., Juleff, N., Zhang, Z., Rodriguez, L., 2011. The Pathogenesis of Foot and Mouth Disease I: Viral Pathways in Cattle. *Trans. and Emer. Dis.* 58, 291-304.
- Aslani, M.R., Mohri, M., Movassagh, A., 2013. Serum troponin I as an indicator of myocarditis in lambs affected with foot and mouth disease. *Vet. Res. Forum* 4, 59-62.
- Baird, G.D., 1982. Primary ketosis in the high-producing dairy cow: clinical and subclinical disorders, treatment, prevention, and outlook. *J. Dairy Sci.* 65, 1-10.
- Barker, I., Van Dreumel, A., Palmer N., 1993. The alimentary system. In: *Pathology of Domestic Animals*, 4th ed. (Jubb, K.V.F., P.C. Kennedy, N. Palmer, Eds.). Academic Press, San Diego, CA, pp. 141-144.
- Barry, A.F., Aline Alfieri, A.F., Stipp, D.T., Alfieri, A.A., 2009. Bovine coronavirus detection in a collection of diarrheic stool samples positive for group bovine rotavirus. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 52, 45-49.
- Boccara, G., Pouzeratte, R., Troncin, A., Bonardet, A., Boulanar, P., Mann 2000. The risk of cardiac injury during laparoscopic fundoplication, cardiac troponin I, and ECG study. *Acta Anaesthesiol. Scand.* 44, 398-402.
- Bodor, G.S., Porterfield, D., Voss, E., 1995. Cardiac troponin I is not expressed in fetal and healthy or diseased adult human skeletal muscle tissue. *Clin. Chem.* 41, 1710-1715.
- Brown, C.C., Piccone, M.E., Mason, P.W., McKenna, T., Grubman, M., 1996. Pathogenesis of wild-type and leaderless foot-and-mouth disease virus in cattle. *J. Virol.* 70, 5638-5641.
- Chevenne, D., Letaillier, A., Trivin, F., Porquet, D., 1998. Effect of hemolysis on the concentration of insulin determined by RIA IRMA. *Clin. Chem.* 44, 354-356.
- Diaz, S., Sevilla, S., 2006. Selective lymphocyte depletion during early stage of immune response to foot and mouth disease virus infection in swine. *J. Virol.* 80, 2369-2379.
- Domingo, E., Baranowski, E., Escarmis, C., Sobrino, F., 2002. Foot and mouth disease virus. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 25, 297-308.
- Eman, A. K., Salama, M.F., Ahmed, E., Nabil, A.H., 2018. Alterations in some biochemical parameters in cattle affected with foot and mouth disease in dahlia governorate, Egypt. *Mansoura Vet. Med. J.* 19, 1-14.
- Feldman, B.F., Zinkl, J., Jain, N., 2000. *Schalm Vet. Hemato.* 5th Ed., Philadelphia, Lippincott Williams, and Wilkins, pp. 1120-1124.
- Ferris, N., Nordengrahn, A., Hutchings, G., Reid, S., King, D., Ebert, K., Paton, D., Kristersson, T., Brocchi, E., Grazioli, S., Merza, M., 2009. Development and laboratory validation of a lateral flow device for the detection of foot and mouth disease virus in clinical sample. *J. Virol. Metho.* 155, 10-17.
- Gab-Allah, M., Abdel-Baset, I., El-Mashad, Shawky, A., Moustafa, A., El-maghriby. 2018. Pathological Studies on Foot and Mouth disease at Kaluobia Governorate. *Benza Vet. Med. J.* 34, 1, 195-208.
- Gattani, A., Gupta, K.K., Joshi, G., Gupta, S.R., 2011. Metabolic profile of foot and mouth disease stressed sheep in semi-arid region. *J. Stress Physiolo. & Biochemist.* 7, 148-153.
- Ghanem, M., Abdel-Hamid, O.M., 2010. Clinical, hematological, and biochemical alterations in heat intolerance (panting) syndrome in Egyptian cattle following natural foot-and-mouth disease (FMD). *Trop. Ani. Health Prod.* 42, 1167-1173.
- Gokce, G., Gokce, H.I., Erdogan, H.M., Gunes, V., Citil, M., 2004. Alterations in some haematological and biochemical parameters in cattle suffering from foot-and-mouth disease. *Turkish J. Vet. Ani. Sci.* 28, 713-727.
- Gonzalez, F.D., Munho, R., Pereira, V., Campos, R., Benedito, J., 2021. Relationship among blood indicators of lipoprotein mobilization and hepatic function during early lactation in high-yielding dairy cows. *J. Vet. Sci.* 12, 251-25.
- Henry, R.J., 1974. Determination of serum creatinine. *Clinical Chemistry: Principles and technics.* 2nd Ed., Harper and Row, pp. 548-551.
- Herrera, M., Grande-Pérez, A., Perales, C., Domingo, E., 2008. Persistence of foot-and-mouth disease virus in cell culture revisited: implications for contingency in evolution. *Gen. Virol.* 89, 232-244.
- Jamal, S.M., and Belsham, G.J., 2013. Foot-and-mouth disease: Past, present, and future. *Vet. Resear.* 44, 116.
- Jubb, K., Kennedy, P. G., and Palmer, N., 1991. *Pathology. Domest. Ani.* 5th ed., Academic Press, Orlando, Florida, USA.
- Kaneko, J., Harvey, J., Bruss, M., 1997. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals.* 5th Ed. Academic Press San Diego, California, USA., pp. 661-668.
- Karapinar, T., Dabak D. O., Kuloglu T., Bulut, H., 2010. High cardiac troponin I plasma concentration in a calf with myocarditis. *Can. Vet. J.* 51, 397-399.
- Kerestes, M., Faigl, V., Kulcsar, M., 2009. Per parturient insulin secretion and whole-body insulin responsiveness in dairy cows showing various forms of ketone pattern with or without puerperal metritis. *Domest. Ani. Endocrin.* 37, 250-261.
- Krehbiel, C.R., Britton, R.A., Harmon, D.L., Wester, T.J., Stock, R., 1995. The effects of ruminal acidosis on volatile fatty acid absorption and plasma activities of pancreatic enzymes in lambs. *J. Ani. Sci.* 73, 3111-3121.
- Krupakaran, R.P., Porcheziyan, T., Sivseelan, S., 2009. Biochemical and hematological profile of foot and mouth disease affected crossbred cows in Karur district of Tamil Nadu. *Vet. Pract.* 10, 37-38.
- Lim, B.K., Shin, J.O., Choe, S.C., 2005. Myocardial injury occurs earlier than myocardial inflammation in acute experimental viral myocarditis. *Exp. Mol. Med.* 28, 37,51-57.
- Lott, J.A., and Turner, K., 1975. Evaluation of Trinder's glucose oxidase method for measuring glucose in serum and urine. *Clin. Chem.* 21, 1754-60.
- Lubroth, J., 2002. Foot-and-Mouth disease a review for the practitioner. *Vet Clin N. Am: Food Anim. Pract.*, 18, 475-499.
- Murray, R., 1984. Alanine aminotransferase. Kaplan LA., Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton., pp. 1088-1090.
- Nasr El-Deen, N.A., Neamat-Allah, A.N.F., Rizk, L.G., Fareed, R., 2017. Serological, hematological, biochemical and oxidative markers during foot and mouth disease serotype O infection. *Egypt. Bulletin UASVM Vet. Med.* 74, 218- 226.
- Nath, R., Prasad, R.L., Deka, S.S., Adil, A., Senapati, M., Islam, M., 2014. Impact of foot and mouth disease on ovarian activity in cows. *Sch. J. Agric. Vet. Sci.* 2, 166-168.
- OIE, 2012. Terrestrial Manual 2012. Chapter 2.1.5. Foot and mouth disease. https://www.oie.int/filea/dmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.08_FMD.
- OIE, 2021. Terrestrial Manual. Chapter 1.1.3, transport of biological materials. https://www.oie.int/filea/dmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.08_FMD.
- Olabode, H.O., Kazeem, H.M., Raji, M.A., Ibrahim, N.D., Adeh, B.M., Obafemi, F.M., 2013. Hematological variations associated with bovine foot and mouth disease virus infection. *J. Vet. Advan.* 3, 245-250.
- Paixão, A., Paiva, J., Reis, M., Barbosa, C., Serra, R., Silva, T., Beckham, B., Martin, N., Clarke, L., Santos, R., 2008. Diagnosis of foot and mouth disease by real-time reverse transcription polymerase chain reaction under field conditions in Brazil. *Vet. Res.* 4, 53-62.
- Parida, S., Reid, S.M., Cox, S.J., Statham, R.J., Mahapatra, M., Anderson, J., Barnett, P.V., Charleston, B., Paton, D.J., 2006. Interferon-gamma production in vitro from whole blood of foot-and-mouth disease virus (FMDV) vaccinated and infected cattle after incubation with inactivated FMDV. *Vaccine* 24, 964-969.
- Patel, R., Pariente, J. A., Martinez, M. A., Salido, G. M., Singh, J., 2006. Effect of Insulin on Acetylcholine- Evoked Amylase Release and Calcium Mobilization in Streptozotocin-Induced Diabetic Rat Pancreatic Acinar Cells. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1084, 58-70.
- Patton, C.J., Crouch, S.R., 1977. Enzymatic determination of urea. *Anal. Chem.*, 49: 466-469. Principle and Techniques. 2nd Ed., Harper and Row Publishers. New York.
- Saadoon, A. S., Al-Obaidi, Q.T., Al-Mahmood, S., Albaroodi, S.Y., 2019. Clinico-pathological and Biochemical Aspects of Foot and Mouth Disease in Calves. *Advan. Ani. Vet. Sci.* 7, 835- 843.
- Saravanan, S.V., Umapathi, M., Priyanka, M., Hosamani, B.P., Sreenivasa, B.H., Patel, K., Narayanan., Basagoudanava, S.H., 2020. Hematological and serum biochemical profile in cattle experimentally infected with foot-and-mouth disease virus. *Vet World* 13, 427-432.
- Sharma, S., Jackson, P., Makan, J., 2004. Cardiac troponins. *J. Clin. Pathol.* 57, 1025-1026.

- Smith, Wilson 2006. Free Fatty Acids and Atherosclerosis. *J Clin. Endocrinol. Metab.* 91, 2506-2508.
- Smith, B., 2015. Large Animal Internal Medicine. 5th ed. Elsevier Mosby, St Louis., pp.777-799.
- Sobhy, N.M., Bayoumi, Y.H., Mor, S.K., El-Zahar, H.I., Goyal, S.M., 2018. Outbreaks of foot and mouth disease in Egypt: Molecular epidemiology, evolution, and cardiac biomarkers prognostic significance. *Inter. J. Vet. Sci and Med.* 6, 22- 30.
- Suvarna, S.K., Layton, C., Bancroft, J.D., 2013. Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques. 7th ed. Elsevier, Churchill Livingstone, England.
- Tamhane, A.F.,Dunlop, D., 2000. Statistics and data analysis from Elementary to Intermediate Upper Saddle River, USA.
- Tekleghiorghis, T., Moormann, R., Weerdmeester, K., Dekker, 2016. A Foot and mouth disease transmission in Africa: implications for control, a review. *Transbound Emerg. Dis.* 63, 136–151.
- Thomas, J. R., 2002. Overall Pathological Findings. Editorial Overview Text Replicated on overall Disease PAG – Foot and mouth disease. National Wildlife Health Center, Video Available; Necropsy of Wild Ungulates.
- Tietz, N.W., Fiereck, E.A., 1966. A specific method for serum lipase determination. *Clinica Chimica Acta* 13, 352.
- Winn-Deen, E.S., Yeotikar, P. V., Bapat, S. T., Bilolikar, S. C., Kulkarni, S. S., 2003. Metabolic profile of healthy cattle and cattle affected by foot-and-mouth disease. *Vet. Record.* 153, 19-20.
- Young, D.S., 2000. Effect of drugs on clinical Lab. Test, 5th Ed. AACC Press.

Effect of *Plectranthus scutellarioides* (L.) Leaf Extract as Natural Antibacterial Against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* Isolated From Dairy Cattle with Subclinical Mastitis

Farah Shafina Hanum¹, Adiana Mutamsari Witaningrum², Yulianna Puspitasari³

¹Student, ²Departement of Veterinary Public Health, ³Departement of Veterinary Microbiology Faculty of Veterinary Medicine, Airlangga University

Corresponding author: farahshfina@yahoo.com

ABSTRACT

Mastitis is one of the causes of low milk production in dairy cows, and can be caused by bacteria such as *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Plectranthus scutellarioides* (L.) leaf has antibacterial compounds such as flavonoids, eugenol, polyphenols, steroids, tannins, and so on. The type of this research is experimental laboratory research that aims to test the antibacterial activity of the *P. scutellarioides* (L.) leaf extract with ethanol pro analysis as the solvent against *E. coli* and *S. aureus* bacteria isolated directly from the sample of dairy cow's milk which CMT score is (+) 3, by measuring its inhibition ability indicated by the presence of clear zone using the agar-well diffusion method. The extract concentrations tested are 5%, 10%, 20% and 40%. The result of the antibacterial test of *P. scutellarioides* (L.) leaf extract with ethanol p.a. as the solvent showed antibacterial activity against *E. coli* and *S. aureus* bacteria isolated directly from cow's milk samples with subclinical mastitis at certain concentrations.

Keywords: *Plectranthus scutellarioides* (L.), Mastitis, Dairy Cattle, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*

Received: 14-10-2022

Revised: 15-11-2022

Accepted: 01-12-2022

INTRODUCTION

Dairy milk product is a natural food product with high nutrition that is used to meet human animal protein needs. Important compounds found in milk include carbohydrates (lactose), fat, vitamins and minerals (Safitri and Swarastuti, 2013). Based on data from the Directorate General of Livestock and Animal Health in 2021, the population of dairy cattle is 0.5 million, the number of domestic demand for milk is 4.3 million tons per year, while domestic fresh milk production is 0.9 million tons per year, so domestic milk products only contribute 22% of the milk demand amount and the rest is fulfilled with milk imports. Dairy farms in Indonesia are dominated by small-scale businesses where farmers have an average of 2-4 adult dairy cattle per family (Surani, 2011). Because small-scale businesses

have limited workers, this results in a lack of good cattle management and care, so the production and quality of milk is low. Breeders have an important role in running milk production, lack of knowledge about hygiene management and the correct way of milking can result in disease in cattle followed by decrease in milk production. One of the common diseases that are found in dairy cattle is mastitis (Tewari, 2014).

Mastitis is an inflammatory disease of the mammary glands caused by several factors, including bacterial infection, trauma, and udder injury (Tewari, 2014). Mastitis is known to have 2 types of disease, the subclinical mastitis and clinical mastitis. Subclinical mastitis is the type that does not show clinical symptoms and is usually identified through examination

of mastitis, either by California Mastitis Test (CMT) or laboratory tests. While clinical mastitis shows clinical symptoms, such as swelling and hardening of the udder followed by pain and heat, decrease in udder function, milk production and quality (Nurhayati and Martindah, 2015). Mastitis-causing bacteria are divided into two groups, environmental such as coliforms (*Escherichia coli* and *klebsiella*), pseudomonas, and *Streptococcus uberis*, as well as contagious pathogens such as *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus dysgalactiae* and they cause acute or chronic subclinical and clinical mastitis in susceptible hosts (Garvey, 2019). Treatment used for mastitis are commonly antibiotics such as streptomycin, ampicillin, cloxacillin, penicillin, and tetracycline, but it also causes antibiotic resistance in pathogenic bacteria (Yang *et al.*, 2019). Plants with bacteriostatic qualities could be used to treat mastitis in dairy cattle as an alternative to antibiotics because they do not cause bacteria to develop resistance, allowing them to be used for a long period (Radzikowski *et al.*, 2020).

Plectranthus scutellarioides (L.) plant is an ornamental plant that comes from the Lamiaceae family. *P. scutellarioides* (L.) plant is 30-150 cm high with leaf shaped similar to heart shape (Tabalubun, 2013), the leaves also have continuous narrow grooves on either edge that are supported by petioles (Mentari, 2018). The size of the leaves are 6-12 cm long, 5-8 cm broad, the structure is hairy and it gives velvety looks, the color of the leaves are maroon in the middle part, green at the edge of the leaves, meanwhile the base of the leaves are wide and rounded, and the tip is sharp (Kalita *et al.*, 2020). *P. scutellarioides* (L.) plant contains anti-inflammatory, antioxidant, antimicrobial and antibacterial

properties, as well as the ability to accelerate wound healing (Rahmawati, 2018 in Utami *et al.*, 2020), and also used as antidiabetes, immunodulator, antihistamine, antihelminthic (Novanti and Susilawati, 2017). This research aims to examine the antibacterial effect of *P. scutellarioides* (L.) leaf extract against *S. aureus* and *E. coli* isolated from dairy cattle with subclinical mastitis.

METHODS

In order to know the antibacterial activity of the *P. scutellarioides* (L.) leaf extract against *E. coli* and *S. aureus* bacteria isolated directly from dairy cattle with subclinical mastitis, this study used the agar well diffusion method where the presence of clear zone indicating the ability of the *P. scutellarioides* (L.) leaf extract to inhibit the growth of *E. coli* and *S. aureus* isolated from dairy cattle with subclinical mastitis.

The samples used are the *P. scutellarioides* (L.) leaves which chosen based on the characteristics: fresh leaves, no holes, dirt, fungus or other diseases. The bacterial samples used for the test were isolated directly from the cow's milk which had CMT score (+) 3. The equipments used for this study are the California Mastitis Test(CMT) paddle, plastic bottle, styrofoam cool box, autoclave, incubator, ose, light microscope, bunsen burner, blender, petri dish, caliper, test tubes, analytical scale, evaporator, measuring cup, micropipette, funnel, vial bottle, beaker glass, glass jar. Meanwhile, the materials used for this study are The research materials used for this study are CMT reagents, Mannitol Salt Agar (MSA) plate, Eosin Methylene Blue Agar (EMBA) plate, cover glass, object glass, crystal violet, Lugol's solution, alcohol 95%, safranin, immersion oil, H₂O₂ 3%,

rabbit blood plasma, toothstick, peptone water, kovac's reagent, MR/VP broth, MR indicator, alpha naphthol, KOH 40%, simmons citrate agar, *P. scutellarioides* (L.) leaves, ethanol p.a. solvent, filter paper, sterile aquadest, aluminium foil, oxytetracycline powder, ciprofloxacin powder, Nutrient Agar (NA), physiological NaCl, Mueller Hinton Agar (MHA) plate, and micropipette tips.

Research Procedure

There are several procedure for this research. First, the sample collection. The leaf samples are taken from the toga plant shops around Pakal District, Surabaya. Milk samples were taken from a farm in the Mulyorejo sub-district, Surabaya, after the CMT test was carried out on the spot. The next step is the bacterial isolation and identification. The milk sample which tested (+) 3 for mastitis with the CMT were cultured in MSA and EMBA media, then incubated at 37°C for 24 hours. The bacteria identification for the colonies grew on MSA are the catalase and coagulase test. The bacteria identification for the colonies grew on EMBA are the IMViC tests. The Gram staining also done to both colonies.

The next step is the extraction of leaves. The collected leaves washed under flowing water before being dried with oven-drying method. Blend the leaves into smaller particles using a blender to expand the contact and increase the interaction with solvent (Ningsih *et al.*, 2017). Put 60 grams of simplicia into a glass jar that is air-tight, does not leak, and also covered in aluminium foil, then add ethanol p.a. solvent as much as 225 ml (Mpila *et al.*, 2012). Soak the simplicia in the solvent for 3 x 24 hours with occasional stirring at room temperature. After 3 days have passed, filter the *P. scutellarioides* (L.) leaf extract solution, and separate the filtrate and the residue. The residue is

remacerated 1 x 24 hours, then the final products are condensed using a rotary evaporator to evaporate the solvent in the extract (Kurnijasanti, 2019).

The antibacterial activity testing is done with several steps. The various concentration of *P. scutellarioides* (L.) R. Br leaf extract that are going to be tested are 5%, 10%, 20%, and 40%. They are made by diluting the extract in each 1 ml CMC solutions (Mpila *et al.*, 2012), as below:

Table 1. Calculation of various extractconcentration making

No.	Extract (gr)	CMC (ml)	Concentration
1.	0,4 gr	1 ml	40%
2.	0,2 gr	1 ml	20%
3.	0,1 gr	1 ml	10%
4.	0,05 gr	1 ml	5%

The positive control stock solution with the concentration 5 mg/ml is made by crushing ciprofloxacin 500 mg tablet in 100 ml of sterile aquadest, then 1 ml are taken from the stock and add 100 ml of sterile aquadest so that the concentration become 50 µg/ml (Hendriana, 2018). A positive control solution of ampicillin was prepared by weighing 50 mg of ampicillin and dissolving it with 100 ml of sterile aquadest, then 2 ml of the solution was pipetted and then added sterile aquadest up to 10 ml, then 1 ml of that solution was pipetted again and the volume was made up to 10 ml (Angrainy and Darwin, 2017). The negative control used is sterile aquadest.

Preparation of the tested bacterial suspension is carried out by culturing the bacteria on Nutrient Agar and incubate overnight, then the bacteria is diluted in physiological NaCl solution, its turbidity then will be standarized to the McFarland 0,5 or equivalent to 1.5 x 10⁸ CFU/ml so that the bacteria fits the

standard for sensitivity testing (Prayoga, 2013). Streak the bacteria suspension over the entire surface of Muellen Hinton Agar evenly (Rif'an *et al.*, 2014). The inhibition test of *P. scutellarioides* (L.) leaf extract is using the agar well diffusion method. Use the hole puncher with the diameter 6 mm to make the well before filled it with various concentration of *P. scutellarioides* (L.) leaf extract: 5%, 10%, 20%, 40%, ampicillin and ciprofloxacin as positive control and standard antibiotic for comparison, also sterile aquadest as the negative control; incubate at 37°C for 24 hours. The antibacterial activity of *P. scutellarioides* (L.) leaf extract is observed visually and measures the diameter of the clear zone with a caliper.

Data Analysis

The data taken are various sizes of inhibition zones which are observed visually and measured to know the antibacterial activity of the extract of *P. scutellarioides* (L.) leaf in various concentrations against mastitis-causing bacteria then will be explained descriptively.

RESULT AND DISCUSSION

The extract of *P. scutellarioides* (L.) leaf used the ethanol solvent which is a universal solvent that is able to dissolve polar compounds such as tannins, flavonoids, and polyphenolic compounds, as well as semipolar compounds such as alkaloids (Ghani, 2019). The extract of iler leaf product obtained after evaporation was weighing 2.30 grams. Its color was dark green and the consistency was condensed, it didn't spill out when it was poured. For the bacteria sample isolated from the milk from dairy cattle with CMT score (+) 3, the colonies of that were growing on EMBA looked metallic green, while growing colonies on MSA looked yellowish. The identification of bacteria

colonies grew on EMBA was carried out by the IMViC test. The result of the indole test was positive, showing a red ring which indicates a positive reaction.

The MR test showed a positive result with the color of the solution turning red. The VP test result was negative because it did not show any color change in the solution. The result of the citrate test on Simmons Citrate Agar (SCA) showed a negative reaction which was indicated by the absence of a color change on the agar. The Gram staining showed rod shaped bacteria which were pinkish in color. Meanwhile the identification of bacteria colonies grew on MSA was carried out by coagulase and catalase tests. Coagulase test showed the presence of thickening and smooth little particles, while the catalase test result showed the presence of bubbles. On Gram staining, the bacteria appear coccus-shaped with a purplish color. All tests showed positive results.

The method used to test the antibacterial activity of iler leaf extract in this study was the agar well diffusion using Muellen Hinton Agar (MHA) media with four times repetition to minimize data errors in research. According to Nurhayati *et al.* (2020), the agar well diffusion method has the advantage of measure the inhibition zone easily because the bacteria are active not only on the surface of the agar but also active on the lower part.

The positive control of this study are the ampicillin for the *S. aureus* and ciprofloxacin for *E. coli* testing. The sensitive diameter of inhibition zone of ampicillin against *Staphylococcus spp.* according to the CLSI is ≥29 mm, and ciprofloxacin is also noted to have an inhibition zone diameter criteria that is sensitive to *Enterobacteriaceae* bacteria, which is ≥31 mm. Below are the result of the agar well diffusion method which the

diameters have been measured using a caliper.

Based on the results of the agar well diffusion test for iler leaf extract against *E. coli* bacteria, it shows that extracts with concentration 10%, 20% and 40% showed antibacterial activity, while extract with a concentration of 5% did not show antibacterial activity. The largest diameter of the inhibition zone was shown by the extract with a concentration of 40% which had an average inhibition zone of 9,83 mm. Followed by a concentration of 20% which has an average inhibition zone of 8,69 mm. The smallest inhibition zone was shown by the concentration of 10% which had an average inhibition zone of 3,905 mm. Control (+) with ciprofloxacin had an inhibition zone diameter of 44,92 mm. Control (-) did not show any inhibition zone.

Meanwhile, the result against *S. aureus* in table 4.2, the extract showed the presence of antibacterial activity in the concentration of 40% while the extract concentrations of 5%, 10%, and 20% did not form an inhibitory zone. The concentration of 40% had an average inhibition zone of 7,315 mm. Control (+) with ampicillin showed an inhibition zone of 58,12 mm, while control (-) did not show any inhibition zone.

The criteria for assessing the strength of antibacterial agents' activity according to Davis and Stout (1971) in Rahayu (2019) are as follows:

- a. Inhibition zone diameter > 20 mm: very strong
- b. Inhibition zone diameter 10-20 mm: strong
- c. Inhibition zone diameter 5-10 mm: moderate
- d. Inhibition zone diameter < 5 mm: weak

Based on the results of the agar well diffusion test and from the categorization above, iler leaf extract against *S. aureus* bacteria at the

concentration of 40% can be categorized in moderate inhibition ability. Control (+) with ampicillin has very strong inhibitory strength. *E. coli* have weak to moderate inhibition zones at extract 10%, 20% and 40% when compared to control (+) which has very strong inhibitory ability.

Iler leaf extract with a higher concentration produced a larger inhibition zone for bacterial growth due to differences in substance levels active at each concentration so it affects the inhibition zone or antimicrobial activity of the extract (Isra, 2018). The higher the concentration of the extract, the more it consists active antibacterial compounds (Ningtyas, 2010 in Lingga *et al.*, 2016). In this research, extract with the concentration of 40% which is the highest concentration tested against the *E. coli* showed the largest diameter of inhibition zone compared the concentration of 5%, 10% and 20%. The largest inhibition zone diameter against *S. aureus* is also produced by the extract with the concentration of 40%, which is the highest concentration, compared to the lower concentrations.

The active compounds contained in the ethanol extract of iler leaf are flavonoids, alkaloids and tannins (Rizal *et al.*, 2018). Flavonoids work by inhibiting nucleic acid synthesis, inhibiting cell membrane function and inhibiting energy metabolism (Rijayanti, 2014 in Nurhasanah and Gultom, 2020), tannins causes protein denaturation that causes disturbances on bacterial metabolism (Angelina *et al.*, 2015 in Rahayu 2019), alkaloids work by interfering with the components constituent of peptidoglycan in bacterial cells causing the layer to not completely formed and causes cell death (Ningsih *et al.*, 2016 in Nurhasanah and Gultom, 2020).

Table 2. The result of the antibacterial activity testing of *P. scutellarioides* (L.) extract against *E. coli*

Concentration	Inhibition Zone Diameter (mm)				Mean
	1	2	3	4	
5%	0	0	0	0	0
10%	0	7,98	7,64	0	3,905
20%	9,24	8,92	8,12	8,48	8,69
40%	11,64	9,12	8,84	9,72	9,83
Control (+) Ciprofloxacin			44,92		
Control (-)			0		

Table 3. The result of the antibacterial activity testing of *P. scutellarioides* (L.) extract against *S. aureus*

Concentration	Inhibition Zone Diameter (mm)				Mean
	1	2	3	4	
5%	0	0	0	0	0
10%	0	0	0	0	0
20%	0	0	0	0	0
40%	7,14	7,24	7,22	7,66	7,315
Control (+) Ciprofloxacin			58,12		
Control (-)			0		

The result also showed that *E. coli* is more sensitive to the extract solution of iler leaf more than *S. aureus*. According to Radji (2011) in Mpila *et al.* (2012), Gram negative bacteria have a thin peptidoglycan layer, while Gram positive bacteria have a thick peptidoglycan layer. Due to the difference in the cell wall structure, Gram negative bacteria are more sensitive to physical shocks such as administration of antibiotics or other antibacterial agents compared to Gram positive bacteria. In this study, *E. coli* which is a Gram-negative bacteria is more sensitive to the tested extracts than *S. aureus*, which is a Gram-positive bacteria.

Positive controls with ampicillin for *S. aureus* and ciprofloxacin for *E. coli* showed greater results than the iler leaf extracts at various concentrations. This might be because herbal extracts have many active compounds that can cause various interactions that have the potential to have antagonistic properties

so that they are less effective in killing bacteria, while antibiotics only have a single compound (Gupta *et al.*, 2015 in Afdhila *et al.*, 2021). According to Ningtyas (2010) in Lingga *et al.* (2015), an increase in the concentration of antibacterial compounds contained in higher concentrations is suspected to increase the penetration of antibacterial compounds into the interior of bacterial cells which will cause cell death, so the higher the concentration is, the more cell death it will cause. In addition, the small inhibition zone produced by the extract solution can be due to the solvent used is ethanol which is a universal solvent that can dissolve various compounds, even those that don't have antibacterial activity, so the antibacterial components obtained are not maximal enough. When the ethanol extract concentration is high, the concentration of compounds that do not have the antibacterial activity is likewise high, resulting in a lower ability to

suppress bacterial growth (Sinarsih *et al.*, 2016 in Rahayu, 2019).

CONCLUSION

Based on the results of the research that has been done, it can be concluded that *P. scutellarioides* (L.) leaf extract with ethanol p.a. as the solvent showed antibacterial activity against *E. coli* and *S. aureus* bacteria isolated directly from cow's milk samples with subclinical mastitis at certain concentrations.

REFERENCES

- Afdhila, Z. L., H. Elyani dan A. Yahya. 2021. The Effect of Chloroform And Ethyl Extract of *Salvadora persica* To Inhibition Zone of *Staphylococcus aureus* And *Streptococcus mutans*. Jurnal Kedokteran Komunitas, 9(1): 1-14.
- Anggrainy, H. and A. M. Darwin. 2017. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Batang Inggu (*Ruta angustifolia* (L.) Pers) Terhadap *Streptococcus mutans*. Majalah Farmasi, vol. 14(2): 31-35.
- Garvey, M. 2019. Chronic Bovine Mastitis: A Food Safety and Public Health Hazard. Nutrition & Food Science International Journal, vol 8(5): 001-006.
- Ghani, S. N. 2019. Analisa Kandungan Kimia Senyawa Non Polar dan Polar Berdasarkan Umur Tanaman Dari Daun Kelapa Sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.). [Skripsi]. Fakultas Farmasi. Universitas Sumatra Utara Medan.
- Hendriana, A. 2018. Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi Dari Ekstrak Metanol Daun *Piper Crocatum* Ruiz & Pav. Terhadap *Staphylococcus aureus* Resisten Ampicillin [Skripsi]. Universitas Sanata Dharma Yogyakarta.
- Kalita, H., J. Basumatary, S. Sharmin dan C. Bordoloi. 2020. Floral and Anatomical Studies of *Plectranthus scutellarioides* (L.) R. Br. (Lamiaceae) From Udalguri, Assam, India. Plant Archives, vol. 20(2): 5883-5888.
- Kurnijasanti, R. and Candrarisna, M., 2019. The effect of pisang ambon (*Musa paradisiaca* L.) stem extract on the regulation of IL-1 β , IL-6 and TNF- α in rats' enteritis. *Iraqi Journal of Veterinary Sciences*, 33(2), pp.407-413.
- Lingga, A. R., U. Pato dan E. Rossi. 2016. Uji Antibakteri Ekstrak Batang Kecombrang (*Nicolaia speciosa* Horan) Terhadap *Staphylococcus aureus* Dan *Escherichia coli*. JOM Faperta, 3(1): 1-15.
- Mentari, C. 2018. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Iler (*Plectranthus scutellarioides* (L.) R. Br.) terhadap *Vibrio cholerae* [Karya Tulis Ilmiah]. Politeknik Kesehatan Bandung.
- Mpila, Deby A., Fatimawali dan Wiyono, Erny I. 2012. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Mayana (*Coleus atropurperus* [L] Benth) terhadap Etanol *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* dan *Pseudomonas aeruginosa* secara *In-vitro*. Pharmacon, 1(1): 13-21.
- Novanti, H. dan Y. Susilawati. 2017. Review: Aktivitas Farmakologi Daun Iler (*Plectranthus scutellarioides* (L.) R. Br.). Farmaka, vol. 15(1): 146-152.
- Nurhasanah and E. S. Gultom. 2020. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Metanol Daun Kirinyuh (*Chromolaena odorata*) terhadap Bakteri MDR (Multi Drug Resistant)

- dengan Metode KLT Bioautografi. *Jurnal Biosains*, vol. 6(2): 45-52.
- Nurhayati, I. S. dan E. Martindah. 2015. Pengendalian Mastitis Subklinis melalui Pemberian Antibiotik Saat Periode Kering pada Sapi Perah. *WARTAZOA*, vol 25(2): 065-074.
- Prayoga, E. 2013. Perbandingan Efek Ekstrak Daun Sirih Hijau (*Piper betle* L.) dengan Metode Difusi Disk dan Sumuran Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus aureus* [Skripsi]. Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan. Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah Jakarta.
- Radzikowski, D., A. Kalinska, U. Ostaszewska and M. Golebiewski. 2020. Alternative solutions to antibiotics in mastitis treatment for dairy cows - a review. *Animal Science Paper and Reports*, vol. 38(2): 117-133.
- Rahayu, N. 2019. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Pagoda (*Clerodendrum paniculatum* L.) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus aureus* dan *Staphylococcus epidermidis* [Skripsi]. Fakultas Farmasi dan Kesehatan. Institut Kesehatan Helvetia.
- Rahmawati, A. S. dan R. Erina. 2020. Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan Uji Anova Dua Jalur. *OPTIKA: Jurnal Pendidikan Fisika*, vol. 4(1): 54-62.
- Rifan, A., S. Chasbullah, L. P. Juita dan E. Emiati. 2014. Efek Farmakologis Ekstrak Daun Torbangun (*Coleus amboinicus* L.) sebagai Antibakteri dalam Pengobatan Bovine Mastitis secara *In Vitro* [Laporan Akhir]. Institut Pertanian Bogor.
- Rizal, N. M., Nurhaeni, A. Ridhay. 2018. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Mayana (*Coleus atropurpureus* [L] Benth) Berdasarkan Tingkat Kepolaran Pelarut. *Kovalen*, 4(2): 180-189.
- Safitri, M.F. dan A. Swarastuti. 2013. Kualitas Kefir Berdasarkan Konsentrasi Kefir Grain. *Jurnal Aplikasi Teknologi Pangan*, vol. 2(2):87-91.
- Surani, S. 2011. Strategi Pengembangan Usaha Ternak Sapi Perah (Studi Kasus di Desa Sukorejo, Kecamatan Musuk, Kabupaten Boyolali). Fakultas Pertanian. Universitas Sebelas Maret.
- Tabalubun, E. M. 2013. Efek Analgesik Infusan Daun Iler (*Coleus atropurpureus* L. Benth) dengan Metode Rangsang Kimia pada Mencit Betina [Skripsi]. Fakultas Farmasi. Universitas Sanata Dharma.
- Tewari, A. 2014. Bovine mastitis: An important dairy cattle disease. *Indian Dairyman*, 62-5.
- Utami, N. F., S. M. Nurdyanty, Sutanto, U. Suhendar. 2020. Pengaruh Berbagai Metode Ekstraksi Pada Penentuan Kadar Flavonoid Ekstrak Etanol Daun Iler (*Plectranthus scutellarioides*). *Fitofarmaka Jurnal Ilmiah Farmasi*, vol. 10(1): 76083.
- Yang, W. T., C. Y. Ke, W. T. Wu, R. P. Lee and Y. H. Tseng. 2019. Effective Treatment of Bovine Mastitis with Intramammary Infusion of *Angelica dahurica* and *Rhem officinale* Extracts. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2019: 1-8.

Full Length Research Paper

Interaction in the production of biofilm and drug susceptibility of *Candida kefyr* with *Escherichia coli* and *Streptococcus dysgalactiae* isolated from bovine mastitis

Israel Daniel Ricardo-González¹, Laura Hernández-Andrade^{2*}, Ana Lilia Del Monte-Rodríguez², Marco Antonio Santillán-Flores², Miguel Ángel Blanco Ochoa¹, Luis Octavio Campuzano-Reyes¹ and Alberto Jiménez-Saavedra³

¹Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México,
Av. Universidad 3000 Edificio A, Delegación Coyoacán. Col. Cd Universitaria CP 04510 México.

²Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, CENID-Salud Animal e Inocuidad, INIFAP,
Carretera México-Toluca, Km 15.5. Col. Palo Alto, CP 05110. Delegación Cuajimalpa, Ciudad de México.

³Instituto Mexicano del Seguro Social, México.

Received 18 February, 2022; Accepted 4 July, 2022

Bovine mastitis is a disease with a high economic impact on dairy farms and it has been described that different species of *Candida* can cause it. The objectives of this study were to evidence the production of biofilm by strains of *Candida Kefyr*, to carry out a comparative evaluation of its production by tube and plate techniques, to determine its interaction with *Escherichia coli* and *Streptococcus dysgalactiae* isolated from bovine mastitis and know the drug susceptibility of each of them. The identification of *C. kefyr* was carried out by fermentation and assimilation of carbohydrates, the confirmation of the identification and minimum inhibitory concentration to antimycotics was carried out with Vitek 2 Systems. Plate and tube biofilm formation assays were performed in triplicate. Analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test were performed, as well as Spearman's correlation to the data obtained. In plate tests, biofilm formation was demonstrated in seven *C. kefyr* isolates, as well as synergy in combinations with *E. coli* and *S. dysgalactiae*. However, the inoculum containing the three microorganisms behaved similarly to that containing only *C. kefyr* and *S. dysgalactiae*. It was possible to demonstrate a correlation between biofilm formation tests in tube and plate. This is the first report in Mexico of *C. kefyr*, as well as the production of biofilm in bovine clinical mastitis.

Key words: Mastitis, *Candida kefyr*, *Escherichia coli*, *Streptococcus dysgalactiae*, biofilm, drug susceptibility

INTRODUCTION

Mastitis is the inflammatory response of the mammary gland to a physical lesion or microbial infection. This condition has an enormous impact on dairy production, animal wellbeing and milk quality, and therefore on the

economy of the production units (Ávila and Gutiérrez, 2018; Romero et al., 2018).

There have been more than 135 microorganisms identified as etiological agents of bovine mastitis, the

most frequent of which are *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus* spp and *Mycoplasma* spp (Watts, 1988). Other microorganisms such as yeast, mold, algae and virus can also cause an inflammatory process in the mammary gland (Watts, 1988). Although mastitis incidence by fungi is generally low, they can be considered causal agents for mammary infections, when antimicrobial treatments are not effective (Bourtzi-Hatzopoulou et al., 2003; Krukowski et al., 2000).

Fungi are found mainly on soil; some yeast can be found as normal flora of mucous membranes such as in the vaginal, oral, rectal and ruminal cavities. They may get to colonize mammary gland skin in small amounts and generally, they are opportunistic microorganisms causing disease in conditions of immunosuppression (Hassan et al., 2018). The sources of origin are soil, plants, water, organic material, milker's hands, milk cups, and multi-dose syringes or treatments that may be contaminated, or which have not been handled hygienically which can cause the return of the condition, once treatment is suspended or improvement without any treatment. Transmission can happen through the milk cups, cow to cow, directly through the environment and from cow to cow during the milking process (Bourtzi-Hatzopoulou et al., 2003).

In general, yeast mastitis infections have a low presentation in commercial dairy farms, with a reported prevalence of around 3%. Nevertheless, there have been reports of higher prevalence such as in Brazil of up to 17.3% (De Casia dos Santos and Marin, 2005); in Greece, 6.2% (Bourtzi-Hatzopoulou et al., 2003) and in Poland, 7.07%, with *Candida krusey* isolated in 41.33% of cases and *C. kefyr* in 32% cases (Wawron et al., 2010). Other reports mention prevalence of 1 to 4% in cases of subclinical mastitis, and up to 25% in clinical mastitis, in dairy herds (Wawron et al., 2010; Bourtzi-Hatzopoulou et al., 2003).

During the last few decades, there has been an increase of infections caused by *Candida* (Sartori et al., 2014). When yeasts invade the mammary gland, they may cause a non-severe, generalized mastitis that is resistant to habitual treatments, and recur a few days after finishing treatment and that improve when there is no treatment. The most frequent microorganism that causes mastitis is *Candida albicans*, although other species have been described as mastitis causing, such as *Candida krusei*, *Candida parakrusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida guillermondii*, *Candida famata*, *Candida utilis*, *Candida rugosa*, *Candida dirferi*, *Candida kefyr* (Costa et al., 1993; Krukowski et al., 2000; Segundo et al., 2011).

Many candida species produce hydrolytic enzymes, toxins and hemolysins, can adapt to different habitats and produce biofilm, which is a structured community imbedded in an extracellular matrix that is generally composed of water, carbohydrates, proteins and hexosamines (Panizo and Reviakina, 2001), and adhered to a surface or to other microorganisms (Flemmins et al., 2016). It is one of the most important virulence factors since it ensures the permanence of bacteria in the mammary gland (Vanderhaeghen et al., 2014).

The ability to form biofilm is associated to infectious processes and to an increase in antifungal therapy resistance (Türkylmaz and Kaynarca, 2010). Yeast may produce polysaccharides that make them more virulent, aggressive and difficult to eliminate (Olson et al., 2002; Panizo and Reviakina, 2001). In the case of *C. albicans* they produce biofilm in 40% of the cases, while other types of *Candida* produce biofilm in 60% of the cases (Panizo and Reviakina 2001).

Escherichia coli is one of the most frequent environmental microorganisms in bovine mastitis cases. Among its virulence factors are toxins, adhesins, and the production of capsule. Recurring *E. coli* mastitis may derive its persistence from the production of biofilm (Gomes et al., 2016). *Streptococcus dysgalactiae* is another frequent microorganism in bovine clinical and subclinical mastitis that produces virulence determinants such as fibronectin and fibrinogen (Gomes et al., 2016), as well as, produce biofilm, that makes eradication from dairy herds difficult (Olson et al., 2002). The objectives of this study were to compare the biofilm formation by the plate and tube techniques, to know the interaction in the film formation by *C. kefyr*, *E. coli* and *Streptococcus* as well as to know the antimicrobial susceptibility in each one of them.

MATERIALS AND METHODS

Samples

Microorganisms analyzed in this study were isolated from milk samples taken from a dairy farm in the State of Querétaro México and sent to CENID Animal Health and Food Safety of the INIFAP Institute. The milk samples came from cows with clinical mastitis, seeded into McConkey agar and Blood agar, and incubated at 37°C for 24 h. Observation of type and color of the colony was done, and a smear was Gram stained to verify purity of the culture. Once the presence of yeast was detected in nine samples (coded, A, B, C, D, E, F, G, H, I) they were seeded in Sabouraud Dextrose Agar, and incubated at 37°C for 24 to 48 h. In some samples, besides yeast isolates, Gram-positive and Gram-negative bacteria were found. These colonies were then purified, and identification of

*Corresponding author. E-mail: hernandezandrade@yahoo.com.

Author(s) agree that this article remain permanently open access under the terms of the [Creative Commons Attribution License 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

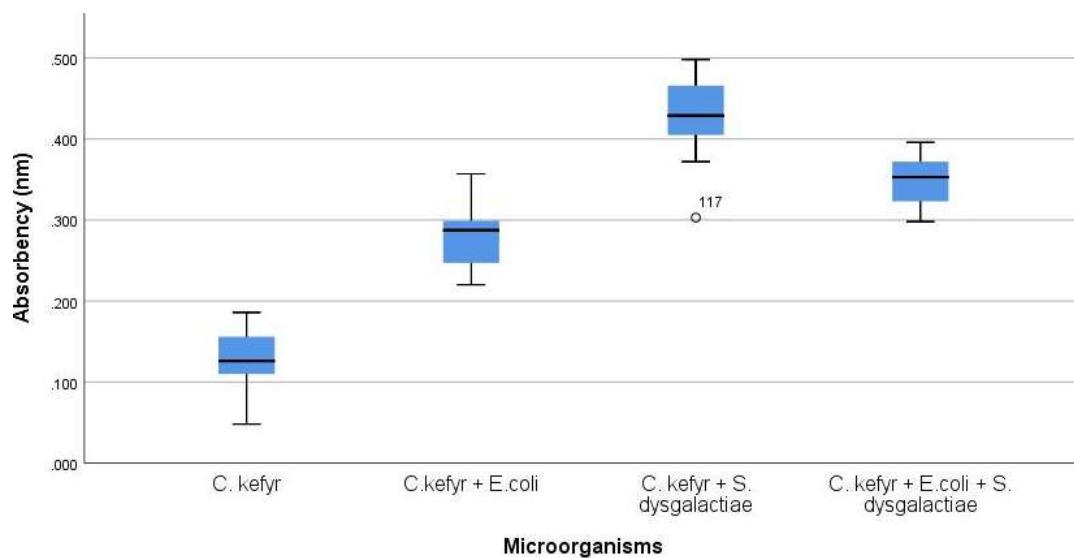


Figure 1. Comparison of absorbance obtained from groups of microorganisms in plate adherence tests.
IBM SPSS Version 22

E. coli and *S. dysgalactiae* was made by Gram stain and traditional biochemical tests using identification tables.

Yeast identification biochemical tests

The methodology used was the one described by Castillo (1974).

Carbohydrate fermentation

A base broth with phenol red, with 1% concentrations added of maltose, lactose, dextrose or galactose was used.

Carbohydrate assimilation tests

Red phenol broth with carbohydrates added in the concentrations previously mentioned, plus 1% absolute ethyl alcohol was used. A positive test was considered to be that in which the media became turbid, evidencing the growth of yeast.

Automatized yeast identification

In parallel, yeast was identified with Vitek 2 Systems (bioMérieux) equipment using the Automatized Yeast Identification (YST) identification card, which contains 46 biochemical tests that determine use of carbon and nitrogen, as well as enzymatic activity.

Antifungal susceptibility with Vitek 2

The AST-YSO7 card was used to determine the minimum inhibitory concentration of *C. kefyr* strains such as Amphotericin (0.25 to 8 µg/ml), Caspofungin (0.25 to 4 µg/ml), Fluconazole (1 to 64 µg/ml), Flucytosine (1 to 64 µg/ml), Micafungin (0.06 to 4 µg/ml), Voriconazole (0.12 to 8 µg/ml).

Susceptibility to antibiotics test

Antimicrobial susceptibility of *E. coli* and *Streptococcus dysgalactiae* strains was obtained by the Kirby Bauer method (Leber et al., 2016).

Tube test biofilm

Tube tests were carried out separately for *C. kefyr*, *E. coli*, *S. dysgalactiae*, as well as for each of the combinations of *C. kefyr* and *E. coli*; *C. kefyr* and *Streptococcus dysgalactiae* (Figure 1).

Inoculum preparation

The technique proposed by Bonilla et al. (2012) was used, soytrypticase broth was inoculated with a fresh *Candida* culture, and incubated at 37°C for 48 h. Once incubated, the tubes were centrifuged at 1000 rpm for 10 min. Obtained precipitate was separated and placed in physiological saline solution in tubes for a second centrifugation for 10 min at 1000 rpm. The precipitate was again re-suspended in 3 ml of soy trypticase broth in polystyrene test tubes, incubated at 37°C for 48 h in a horizontal position. As a positive biofilm formation control, the *S. aureus* Cowan strain, commonly used as a positive control for mastitis research, was used separately and standardized with the McFarland 0.5 tube. The negative control tubes were one with sterile soy trypticase broth and another with a sterile saline solution. The tubes were washed three times with a pH 7.3, phosphate buffer solution (PBS), to remove microorganisms that were not adhered.

Staining and reading

After the wash they were set using absolute ethanol for 5 min, the excess was removed and then left to dry. Once dry, they were stained with a 0.1% crystal violet solution for one minute and rinsed with distilled water to remove excess stain. Positive tubes

were those in which the purple stained biofilm was observed; they were categorized as: (-) not detected, (+) sensitive (weak presence), (++) intermediate presence and (+++) strong presence.

Production of biofilm on plate

Inoculum preparation

Before washing and staining of the tubes, 100 µl of culture inoculated in the tubes was added to 100 µl of soy trypticase broth for the biofilm formation test. The assay was done in triplicate, using polystyrene microplates of 96 flat bottom wells for cell culture, and incubated for 24 h at 37°C aerobically. As positive control, the *S. aureus* Cowan strain was inoculated in soy trypticase broth at a dilution of 1:100, attained by placing 2 µl of inoculum in 198 µl of soy trypticase broth. After the incubation time, the broth was eliminated, and the wells of the microplate were washed three times with PBS; then fixed with absolute ethanol for 5 min. The excess ethanol was removed, and the plate left to dry for an hour.

Staining and reading

The plates were stained with a 0.1% crystal violet solution for 1 min, washed with distilled water to remove excess stain, and dried at room temperature. The plates were read using the ELISA Labsystems multiskan Ascent 354 microplate reader, at a 492 nm wavelength. Plate and tube tests were carried out in triplicate.

Statistical analysis

An average was obtained from the absorbency results of the three test repetitions and a analysis of variance test was applied (ANOVA); a means comparison test (Tukey) with a $p \leq 0.05$ significance was applied to verify if there was a statistical difference between the negative control and the isolates that were under analysis, as well as between the adherence of the following groups: *C. kefyr*; *C. kefyr + E. coli*; *C. kefyr + S. dysgalactiae*; and *C. kefyr + E. coli + S. dysgalactiae*. Spearman's bivariate correlation test was applied at 99% to determine if there was association between the adherence in tube and adherence on plate. The statistical analysis of the data was carried out using the statistical program IBM SPSS Statistics 22.0.

RESULTS

Identification

The nine yeast isolates (A, B, C, D, E, F, G, H, I) followed the same biochemical and carbohydrate assimilation pattern; therefore, they were classified as *C. kefyr* by biochemical methods and by Vitek 2. Two milk samples had *C. kefyr*, *S. dysgalactiae* and *E. coli*, while four milk samples had *C. kefyr* and *S. dysgalactiae*, and in the remaining, three, only *C. kefyr* was obtained.

Susceptibility to antimicrobial and antifungal drugs

S. dysgalactiae showed a similar pattern of susceptibility

to the twelve antimicrobial drugs analyzed, of which it was susceptible only to cefalotin, cefotaxime and cefuroxime, which make evident the high degree of resistance that the isolated strains have (Table 1). *E. coli* were only sensitive to two antimicrobials of the twelve tested drugs: amikacin and trimethoprim/sulfamethoxazole (Table 2). Minimum inhibitory concentrations for the *C. kefyr* strains were similar in the nine isolates: amphotericin, 0.25 µg/ml; caspofungin, 0.25 µg/ml; fluconazole, 1 µg/ml; flucytosine, 1 µg/ml; micafungin, 0.06 µg/ml; voriconazole, 0.12 µg/ml, and therefore they were classified as sensitive to these drugs.

Biofilm formation tube test

Tube tests were positive in all the cases; nevertheless, six isolates of *C. kefyr* presented the most evident adherence when compared to the other three isolates and negative controls. In the case of *E. coli* and *S. dysgalactiae*, these were also positive, although the positive control *S. aureus* always had a greater biofilm formation.

Formation of biofilm on plate

Growth of microorganisms was observed in all the wells, especially where the positive controls were placed. When subjected to staining there was some degree of biofilm formation in all the wells. There was a significant statistical difference ($P \leq 0.05$) between seven yeast strains, the *E. coli* and *S. dysgalactiae* strains, as well as the positive control, when compared with the negative control. Therefore, it can be said that the mentioned microorganisms had the capacity for forming biofilm on plate. Furthermore, the remaining yeasts did not have a significant difference with the negative control.

Regarding the interactions between *C. kefyr* and *E. coli*, *C. kefyr* and *S. dysgalactiae*, and *C. kefyr*, *E. coli* and *S. dysgalactiae*, they all had statistically significant differences with the negative control. Similarly, observed absorbances were statistically greater than those seen in samples that only had *C. kefyr* (Table 3).

Significant differences were found when comparing absorbances obtained from inoculum that contained *C. kefyr*, and the ones obtained from those that contained two or three microorganisms with the negative control, as well as when comparing mixed inoculums with those that only had *C. kefyr* (Table 4 and Figure 1).

In the tube tests, the results showed that all the isolates had some degree of biofilm formation. Most of the yeast samples, had a weak to intermediate film formation (+ to ++), while the samples that contained more than one microorganism had intermediate biofilm formation values (++); all the positive controls in all

Table 1. Results of susceptibility to antimicrobial drug tests performed on isolates of *S. dysgalactiae* associated to yeast.

Antimicrobial	A	B	C	D	E	F
Cefalotin	S	S	I	S	S	S
Ceftazidime	R	R	R	R	R	R
Erythromycin	I	I	R	R	R	R
Ampicillin	R	R	R	R	R	R
Tetracycline	R	R	R	R	R	R
Trimethoprim/Sulfamethoxazole	S	I	I	I	I	I
Cefotaxime	S	S	S	S	S	S
Gentamicin	R	R	R	R	R	R
Cefuroxime	S	S	S	S	S	S
Pefloxacin	I	R	R	R	R	R
Dicloxacillin	R	R	R	R	R	R
Penicillin	R	R	R	R	R	R

S=Sensitive, I= Intermediate, R=Resistant.

IBM SPSS Version 22

Table 2. Results of susceptibility to antimicrobial drug tests performed on isolates of *E. coli* associated to yeast.

Antimicrobial	A	B
Cefalotin	R	R
Chloramphenicol	R	R
Ceftriaxone	R	R
Ampicillin	R	R
Amikacin	S	S
Trimethoprim/Sulfamethoxazole	S	S
Cefotaxime	R	R
Gentamicin	R	R
Netilmicin	R	R
Pefloxacin	R	R
Carbenicillin	R	R
Nitrofurantoin	R	R

S=Sensitive, I= Intermediate, R=Resistant.

IBM SPSS Version 22

Table 3. Absorbency obtained in plate adherence tests.

Microorganism	A	B	C	D	E	F	G	H	I	(+) CTRL	(-) CTRL
<i>C. kefyr</i>	Mean	0.171	0.177*	0.079	0.132*	0.156*	0.249*	0.114	0.162*	0.164*	1.041*
	+/- SD	0.054	0.055	0.021	0.029	0.041	0.313	0.048	0.030	0.071	0.129
<i>C. kefyr +</i>	Mean	0.336*	0.318*	0.250*	0.317*	0.288*	0.307*	0.290*	0.289*	0.307*	1.207*
<i>E. coli</i>	+/- SD	0.035	0.061	0.030	0.031	0.040	0.071	0.058	0.020	0.030	0.103
<i>C. kefyr +</i>	Mean	0.443*	0.382*	0.437*	0.439*	0.410*	0.463*	0.447*	0.430*	0.450*	1.147*
<i>S. dysgalactiae</i>	+/- SD	0.025	0.040	0.045	0.037	0.020	0.029	0.047	0.018	0.033	0.141
<i>C. kefyr +</i>	Mean	0.267*	0.256*	0.228*	0.247*	0.244*	0.267*	0.271*	0.276*	0.245*	1.087*
<i>E. coli +</i> <i>S. dysgalactiae</i>	+/- SD	0.008	0.034	0.028	0.035	0.032	0.022	0.026	0.026	0.032	0.107

*Significant difference with the negative control ($p \leq 0.05$).

IBM SPSS Version 22

Table 4. Comparison of obtained absorbencies by microorganism groups, in plate adherence tests.

Microorganisms	Absorbances
Negative Control	0.063 +/- 0.06
C. kefyr	0.129 +/- 0.03 ^{A,C,D and E}
C. kefyr + E.coli	0.278 +/- 0.04 ^{A,B,D and E}
C. kefyr + S. dysgalactiae	0.432 +/- 0.03 ^{A,B and C}
C. kefyr + S. dysgalactiae + E. coli	0.349 +/- 0.02 ^{A,B and C}

Different letters show significant differences ($p \leq 0.05$)
IBM SPSS Version 22

Table 5. Spearman's correlation test to determine the association between the tube and plate tests for biofilm formation.

		Absorbency	Tube
Spearman's Rho	Absorbency ($p \leq 0.01$)	Correlation Coefficient	1.000
		Sig. (2-tailed)	.
		N	54
	Tube ($p \leq 0.01$)	Correlation Coefficient	0.689**
		Sig. (2-tailed)	0.002
		N	54

**Correlation test with confidence ($p \leq 0.01$).
IBM SPSS Version 22

repetitions showed strong adherence values (+++). When comparing the two methods for determining biofilm formation, Spearman's bivariate correlation test resulted in a Rho of 0.689 (Table 5).

DISCUSSION

The *C. kefyr* strains isolated from cases of bovine mastitis, demonstrated the capacity for biofilm formation on plastic surfaces; nevertheless, there is not much information available about biofilm formation by this microorganism when derived from animal origin strains. Most of the existing information has been obtained with human origin strains (Bonilla et al., 2012; Hernandez et al., 2010).

Yet, the results found by Radford et al. (1998) in human origin strains, can be extrapolated in which certain variations may be evident in the formation of biofilm on different plastic material surfaces. The varying degrees of biofilm formation in the tube test, in which three yeast isolates had a lower degree of biofilm formation when compared with the rest, agree with the results of the biofilm production plate test, where these strains had no significant difference with the negative

control. This can be associated with an irregular growth of the *C. kefyr* strains, which was more obvious in certain zones in tube as well as in plate, and in turn, may be associated to the seeding method or simply with the natural behavior of the yeast, as described by Vasilas and Molina (1992).

The fact that there was a significant difference in the formation of biofilm in the samples where the yeast was combined with a biofilm producing bacteria, could be an indication that, if these microorganisms are found together during an intramammary infection, it might make the ailment difficult to treat due to complications related to biofilm production by the microorganisms such as chronic infections and resistance to antimicrobials.

Interactions between biofilm producing microorganisms may be antagonistic, mutualistic or commensal (Chaves et al., 2007; Burmølle et al., 2006). A synergy in the production of biofilm was found when the isolates of *C. kefyr*, *E. coli* and *S. dysgalactiae* were combined, since absorbance was increased significantly. Because the value or Rho reached 0.689 in Spearman correlation test, it can be inferred with high confidence ($p \leq 0.01$) that there is a good correlation between the biofilm formation tests carried out in tube and those carried out in plate.

It seems the increase in antibiotics use during the last

few years, has contributed to an increase of mycotic mastitis incidence. It has been suggested that yeast or fungi multiply during antibiotic therapy, stimulated by the elimination of antagonistic bacterial flora and a reduction of vitamin A in the mammary gland tissue (Wawron et al., 2010; Costa et al., 1993). Mycotic mastitis are considered environmental mastitis, predominantly caused by yeast of the *Candida* genus (Watts, 1988),

Türkylmaz and Kaynarca (2010), isolated from a total of 339 milk samples, 12.1% yeasts, of these, 36.6% were *C. krusei*, 7.3% *C. kefyr*, and 4.9% *C. guillermondii*. Furthermore, of the latter they reported that in 36.6% of them there was the formation of biofilm, as well as in 7 strains of *C. krusei* and in 4 of *Candida kefyr*.

Vinitha and Ballal (2007) reported that the production of biofilm is less frequent in *Candida albicans* (42.9%) while other species of *Candida* produce more, up to 63.4%. Studies carried out in Lublin, Poland, isolated yeasts in 9.6% of 604 milk samples, of which the most predominant was *C. kefyr* with 24.1% (Krukowski et al., 2000).

In samples from mammary glands with subclinical mastitis, 9.92% of the 383 samples had *Candida*, identifying 15 different species. The most frequent isolate was *C. albicans* 13.15% (5/38) and *C. krusei* (7.89%; 3/38). In 379 milk samples of clinical mastitis cases, the most frequent isolate was *C. krusei* (40.24%), while other *Candida* species, *C. kefyr* amongst them, had a frequency of 1.7% (Ksouri et al., 2015).

According to studies by Wawron et al. (2010) the increase in the use of antibiotics in the past few years is a key factor that contributes to the higher incidence of yeast in the mammary gland as they demonstrated that *Candida* spp. was the most frequently isolated etiological agent in mycotic mastitis in cows, while the most abundant species included *C. krusei* and *C. kefyr*. There is great difference in the reports around the world of yeast isolations in cases of bovine mastitis (Türkylmaz and Kaynarca , 2010).

Milanov et al. (2014) studied sensitivity against antifungal drugs and found that two isolates of *C. kefyr* showed resistance against nystatin, which is commonly used for treating yeast mastitis. Other isolates have shown resistance to fluconazole and Flucytosine, which are commonly used in the treatment of human infections (Hassan et al., 2018; Ochiuzzi et al., 2014). In contrast, in this study isolated yeasts were sensitive to the antimycotic drugs tested.

Conclusion

The relevance of the capacity of *C. kefyr* strains to form biofilm in this study lies on the secondary implications, since their presence may include the adsorption of other microorganisms and thus establish protection when

confronted with antimicrobial and/or antifungal agents. This effect was verified in this study, with the presence of *S. dysgalactiae* and *E. coli* associated to *C. kefyr*, in cases of clinical mastitis.

We conclude that *C. kefyr* is capable of forming biofilm on plastic materials, although not as strong as that which is generated by other microorganisms such as some *S. aureus* strains, which can then be converted into a source of infection if it adheres to the materials from which the mechanical milking equipment are made of. This situation may generate cases of mastitis where the presence of these yeasts is complicated with the presence of other microorganisms such as *S. dysgalactiae* or *E. coli*, amongst others.

A good association was found between the plate and tube tests for biofilm formation, and therefore the latter could be used as an indicator of biofilm formation by *C. kefyr* on plastic surfaces.

Likewise, an appropriate handling of mammary gland infectious processes is important, since the finding of microorganisms highly resistant to most antimicrobial agents used routinely makes evident the indiscriminate use of those drugs, and therefore it is recommendable to use susceptibility tests in all the mastitis control programs in dairy farms.

CONFLICT OF INTERESTS

The authors have not declared any conflict of interests.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors are grateful to INIFAP for the financial resources provided: SIGI 1317933918

REFERENCES

- Ávila TS, Gutiérrez Ch AJ (2018). Producción de leche con ganadobovino. 3a edición. México AMMVEB, A.C. ISBN 9786074480153.
- Bonilla RY, Moreno MV, Muñoz HB, Palma CM (2012). Adherencia *in vitro* de *Candida albicans* en tres diferentes acondicionadores de tejidos usados en prostodoncia total. Revista Odontológica Mexicana 16(1):40-45.
- Bourtzi-Hatzopoulou E, Zdragas A, Petridou E, Filiosis GT (2003). Yeast as a causative agent of bovine mastitis in Greece. Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society 54(2):105-110.
- Burmølle M, Webb JS, Rao D, Hansen LH, Sorensen JS, Kjelleberg S (2006). Enhanced biofilm formation and increased resistance to antimicrobial agents and bacterial invasion are caused by synergistic multispecies biofilms. Applied and Environmental Microbiology 72(6):396-3923.
- Castillo TE (1974). Algunos aspectos bioquímicos indispensables para la identificación de especies de *Candida*. Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas 3(1):41-66.
- Chaves SL, Somoza M, Joao VM (2007). Biofilm interactions between distinct bacterial genera isolated from drinking water. Applied and Environmental Microbiology 73(19):6192-6200.

- Costa EO, Gandra CR, Pires MF, Coutinho SD, Castilho W, Teixeira M (1993). Survey of bovine mycotic mastitis in dairy herds in the State. *Mycopathologia* 124(1):13-17.
- De Casia dos Santos R, Marin JM (2005). Isolation of *Candida* spp from mastitic bovine milk in Brazil. *Mycopathologia* 159(2):251-253.
- Flemming HC, Wingender J, Szewzyk U, Steinberg P, Rice SA, Kjelleberg S (2016). Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews: Microbiology* 14(9):563-575.
- Gomes F, Saavedra MJ, Henriques M (2016). Bovine mastitis disease/pathogenicity: evidence of the potential role of microbial biofilms. *Pathogens and Disease* 74(3):ftw006
- Hassan Y, Alhassan AS, Tian Lung TL (2018). *Candida albicans* interdigital foot infection: A case report highlighting the importance of antifungal susceptibility testing. *African Journal of Microbiology Research* 12(36):889-896.
- Hernandez SSE, Gonzalez RAS, Rueda-Gordillo F (2010). Capacidad de adhesión de cepas de *Candida albicans* aisladas de una población de niñosportadoralessanos. *Revista odontológica Latinoamericana* 2(2):33-37.
- Krukowski H, Tietze M, Majewski T, Różanski P (2000). Survey of yeast mastitis in dairy herds of small-type farms in the Lubrin region, Poland. *Mycopathologia* 150(1):5-7.
- Ksouri S, Djebir S, Hadef Y, Benakhla A (2015). Survey of bovine mycotic mastitis in different mammary gland statuses in two north-eastern regions of Algeria. *Mycopathologia* 179(3-4):327-31.
- Leber A (2016). Clinical Microbiology Procedures Handbook 4th (2016 edition. ASM Press.
- Milanov D, Prunic B, Velhner M, Bojkovski J (2014). Diagnosis of yeast mastitis in dairy cows. *Lucrari Stiintifice Medicina Veterinara* 47(1) Timisoara.
- Ochiuzzi ME, Arechavala A, Guelfand L, Maldonado I, Soloaga R y Red de Micología CABA, Argentina (2014). Evaluación de lastarjetas AST-YSO1 del sistema Vitek 2 para determinar la sensibilidad a antifúngicos de levaduras del género *Candida*. *Revista Argentina de Microbiología* 46(2):111-118.
- Olson ME, Ceri H, Morck DW, Buret GA, Read RP (2002). Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Canadian Journal Veterinary Research* 66(2):86-92.
- Panizo MM, Reviakina V (2001). Adhesinas y receptores involucrados en el fenómeno de adherencia de *Candida albicans* a las células epiteliales. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología* 21(1):05-11.
- Radford DR, Sweet SP, Challacombe SJ, Walter JD (1998). Adherence of *Candida albicans* to denture-base materials with different surface finishes. *Journal of Dentistry* 26(7):577-583.
- Romero J, Benavides E, Meza C (2018). Assessing financial impacts of subclinical mastitis on Colombian Dairy Farms. *Frontiers in Veterinary Science*. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00273>
- Sartori LCA, Santos RC, Marin JM (2014). Identification of *Candida* species isolated from cows suffering mastitis in four Brazilian states. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 6(5):1615-1617.
- Segundo ZC, Cervantes ORA, Ducoing WAE, De la Peña MA, Villa TL (2011). Yeasts isolation from bovine mammary glands under different mastitis status in the Mexican High Plateau. *Revista Latinoamericana de Micología*. 28(2):79-82.
- Türkyilmaz S, Kaynarca S (2010). The slime production by yeasts isolated from subclinical mastitic cows. *Acta Veterinaria Brno* 79(4):581-586, doi: 10.2754/avb201079040581
- Vanderhaeghen W, Piepers S, Leroy F, Van Coillie E, Haesebrouck F, De Vliegher S (2014). Invited review: Effect, persistence and virulence of coagulase-negative *Staphylococcus* species associated with ruminant udder health. *Journal of Dairy Science* 97(9):5275-5293.
- Vasilas A, Molina L (1992). The influence of morphological variation on *Candida albicans* adhesion to denture acrylic *in vitro*. *Archives of Oral Biology* 37(8):613-622.
- Vinitha M, Ballal M (2007). Biofilm as virulence marker in *Candida* isolated from blood. *World Journal of Medical Sciences* 2(1):46-48.
- Watts JL (1988). Etiological agents of bovine mastitis. *Veterinary Microbiology* 16(1):41-66.
- Wawron W, Bochniarz R, Piech T (2010). Yeast mastitis in dairy cows in the middle-eastern part of Poland. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy* 54(2):201-204.

Analysis of antimicrobial resistance and genetic correlations of *Escherichia coli* in dairy cow mastitis

Ke Li, Mingyuan Hou, Lin Zhang, Mengyue Tian, Ming Yang, Li Jia,
Yanyan Liang, Dongmin Zou, Ruonan Liu, Yuzhong Ma[✉]

College of Veterinary Medicine, Hebei Agricultural University,
Baoding, Hebei 071001, China
dkma@hebau.edu.cn

Received: March 23, 2022 Accepted: September 28, 2022

Abstract

Introduction: *Escherichia coli* is a widespread environmental pathogen frequently causing dairy cow mastitis. This bacterium is particularly capable of acquiring antimicrobial resistance, which can have severe impacts on animal food safety and human health. The objective of the study was to investigate antimicrobial resistance and genetic correlations of *E. coli* from dairy cow mastitis cases in northern China. **Material and Methods:** Forty strains of *E. coli* from 196 mastitis milk samples were collected, susceptibility to 13 common antibiotics and the prevalence of resistance genes were tested in these strains, and the genetic characteristics were identified by multilocus sequence typing. **Results:** The results showed that most isolates were multidrug resistant (MDR) (75%), and the resistance rates to cefazolin, trimethoprim-sulfamethoxazole and ampicillin were 77.5%, 55.0%, and 52.5%, respectively. The representative genes of the isolates were *aadA* (62.5%) and *tet(B)* (60.0%). Multilocus sequence typing showed 19 different sequence types (STs) and 5 clonal complexes (CCs) in the 40 isolates, mainly represented by ST10 and CC10. The strains of the same ST or CC showed a high level of genetic relatedness, but the characteristics of their antimicrobial resistance were markedly different. **Conclusion:** Most *E. coli* isolates in the study were MDR strains. Some strains of the same ST or CC showed diverse resistance characteristics to common antimicrobials. Therefore, *E. coli* from dairy cow mastitis in northern China should be investigated to elucidate its antimicrobial resistance and genotypes.

Keywords: *Escherichia coli*, molecular characteristics, antimicrobial resistance, genetic correlation, dairy cow mastitis.

Introduction

Dairy cow mastitis is a disease that is common on more than one continent and causes a decline in milk production and quality, leading to significant economic losses in the dairy industry (36). *Escherichia coli* is an important mammary pathogen in the environment of dairy farms and is closely associated with severe inflammatory symptoms (15). Currently, antibiotics are widely used to prevent and treat dairy cow mastitis. In the United States of America, it has been estimated that more than 80% of the total administered volume of antibiotics was used in animal production activities (14). Although the usage of antimicrobials usually brings positive effects, the problem of antimicrobial resistance (AMR) has also emerged (18). A nationwide study was conducted in China to determine the extent of AMR in common mastitis pathogens (including *E. coli*) infecting

dairy herds and the study showed its increasing prevalence (9). Antimicrobial resistance reduced the cure rates of cow mastitis and posed a grave threat to public health and animal welfare (42).

Antimicrobial-resistant bacteria often harbour antibiotic resistance genes, which is proven to be a driving factor in drug resistance (39). These bacteria can spread among different hosts, which transduce antibiotic resistance genes to strains which may in some cases already possess certain drug resistance, leading to the emergence of multi-drug-resistant (MDR) bacteria (35).

As a clonally structured population, *E. coli* was classified into different phylogenetic groups and clonal complexes (CCs) by multilocus sequence typing (MLST) (23). By comparing database sequence records with the MLST results, specific housekeeping genes of *E. coli* were indicated to denote different STs; such a comparison was considered a reliable molecular typing

method to explore the genetic correlations of microbial populations (24). Recent epidemiological investigations suggested that the antibiotic resistance of *E. coli* strains exhibited diversity in different microbial populations. It also brought more challenges to the prevention and treatment of dairy cow mastitis in veterinary clinics (32). In the face of the growing problem of antibiotic resistance and the potential threat to human health, it is necessary to analyse the antibiotic resistance of different *E. coli* populations. The objectives of the study were to understand the current state of antimicrobial resistance and the genetic characteristics of *E. coli* strains from dairy cow mastitis and to provide information helpful for the rational use of antibiotics in clinics.

Material and Methods

Sample collection and *E. coli* isolation. Between June 2019 and October 2021, 196 mastitis milk samples were collected from different dairy farms located in Xushui, Qingyuan, Quyang, and Mancheng in northern China. The criteria defining clinical mastitis were local pain in the mammary gland area accompanied by severe or general signs of inflammation, including swelling of the udder, tenderness to touch, fever, and depression (30, 40). Following convention, the teat was disinfected with 2% iodine tincture and 75% ethanol and the three initial streams were forestripped. Milk samples were aseptically collected in sterile tubes immediately. The samples were put on ice and sent to the laboratory within 4 h. A 10 µL volume of milk was aerobically cultured at 37°C for 12 h in blood agar (Aobox, Beijing, China) with 5% sheep blood. Primary identification of the *E. coli* isolates was based on the characteristics of a Gram stain and growth on Eosin-Methylene Blue (EMB) Agar (Solarbio, Beijing, China). The 16S rDNA of all isolates was amplified in a PCR using 27F (5'-AGAGTT TGATCMTGGCTCAG-3') and 1492R (5'-TACGGY TACCTTGTACGACTT-3') universal primers (37). The reaction procedures were as follows: 300 s at 95°C followed by 35 cycles of 30 s at 95°C, 30 s at 57°C and 60 s at 72°C. The PCR products were sequenced by Shanghai Sangon Biotech Co., Ltd (China) and compared with the sequences logged in GenBank. The confirmed *E. coli* isolates were stored in 25% sterile glycerol at -80°C.

Antimicrobial susceptibility test of *E. coli* isolates. Susceptibility to antimicrobial agents was determined by the Kirby–Bauer method as described by the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines (11). Confirmed isolates of *E. coli* were tested for susceptibility to 13 antimicrobial agents commonly used in China. The preparations included beta-lactams, aminoglycosides, macrolides, tetracyclines, sulfonamides and quinolones; the selection was ampicillin (AMP, 10 µg), amoxicillin (AMX, 10 µg), ceftriaxone (CRO, 30 µg), cefazolin (CFZ, 30 µg), gentamicin (GEN, 10 µg), streptomycin (STR, 10 µg), neomycin (NER, 30 µg),

amikacin (AMI, 30 µg), erythromycin (EM, 15 µg), doxycycline (DOX, 30 µg), trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT, 25 µg), ciprofloxacin (CIP, 5 µg) and enrofloxacin (ENR, 5 µg). The antimicrobial agents were purchased from the China Institute of Veterinary Drugs Control. Multidrug resistance (MDR) was defined as resistance to three or more classes of antibiotics. *Escherichia coli* ATCC 25922 was used as a reference strain.

DNA extraction. A single colony from a fresh bacterial culture on EMB Agar was picked and inoculated into 5 mL of fresh Luria–Bertani broth and incubated with shaking for 12 h. Extraction of DNA was achieved using the DNA Quick extraction kit (Tiangen, Beijing, China) following the manufacturer's instructions. All DNA preparation concentrations were measured using a Nanodrop ND-2000 spectrophotometer (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) and adjusted to be approximately 100 ng/mL. The DNA extracts were stored at -20°C.

MLST and phylogenetic group. One pair of primers for each of the *adk*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA* and *recA* housekeeping genes was designed utilising data from a public MLST database (<https://pubmlst.org/data>) and then used in a PCR (43). The reaction procedure was as follows: initial denaturation at 94°C for 5 min, 35 cycles of denaturation at 94°C for 45 s, annealing at different temperatures for 45 s (Table 1), extension at 72°C for 60 s, and final extension at 72°C for 7 min. The products were sequenced by Shanghai Sangon Biotech Co., Ltd. The sequences of housekeeping genes were processed by BioEdit (<https://www.bioedit.com>) to obtain the housekeeping gene number and they were submitted to the Achtman online database (<http://enterobase.warwick.ac.uk/species/index/ecoli>) for comparison. Each isolate's ST was acquired from the database. A minimum spanning tree was built using the goeBURST algorithm in Phyloviz1.0 software (<http://www.phyloviz.net>) (38). Subsequently, the sequences were further trimmed and concatenated (3,370 bp) to conduct molecular phylogenetic analysis using the maximum likelihood method in MEGA 7.0. Bootstrapping with 1,000 replicates was applied to estimate the reliability of the phylogenetic tree. The tree was visualised with iTOL online software (<https://itol.embl.de>) to analyse the distribution of drug resistance genes and resistance phenotype in the *E. coli* isolates.

Detection of antimicrobial resistance genes. Genes were detected by PCR with resistance to the following antimicrobials: beta-lactams (*blaTEM*, *blaSHV* and *blaOXA*), aminoglycosides (*aac(2')*, *aacA4* and *aadA*), macrolides (*erm(B)* and *erm(C)*), tetracyclines (*tet(A)* and *tet(B)*), sulfonamides (*sul1* and *sul2*) and quinolones (*qnrB*) (1, 2, 28, 44). The reaction procedure of PCR was as follows: initial denaturation at 94°C for 5 min, 30 cycles of denaturation at 94°C for 30 s, annealing at different temperatures for 30 s (Table 1), extension at 72°C for 30 s, and final extension at 72°C for 10 min. PCR products were visualised by 1% agarose gel electrophoresis.

Statistical analysis. The chi-squared test and Pearson's correlation coefficient were used to compare the correlations between an isolate's resistance to a particular antibiotic and the isolate's possession of the corresponding resistance gene. The significance level was set at $P < 0.05$ for statistical procedures. All analyses were conducted using SPSS 21.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Results

Isolates. Overall, 40 (20.41%) *E. coli* isolates from the 196 tested milk samples were culture-positive. The isolation rates of *E. coli* in Xushui, Qingyuan, Quyang and Mancheng were 22.22% (16/72), 24.14% (7/29), 17.86% (5/28) and 17.91% (12/67), respectively.

Antimicrobial susceptibility testing. The results of the susceptibility test were interpreted according to the criteria of the CLSI (Table 2). Antimicrobial susceptibility tests showed that most of the isolates were resistant to CFZ (77.5%), SXT (55.0%) and AMP

(52.5%). In contrast, most isolates were susceptible to AMI (95.0%), CIP (82.5%) and GEN (67.5%). In addition, some *E. coli* isolates were classified as intermediate susceptible to EM (52.5%), NER (37.5%), and ENR (27.5%) (Table 2). For analysis, intermediate susceptibility was considered as resistance (7). In this study, 29 (72.5%) MDR *E. coli* strains were detected. The most common antimicrobial resistance profile was AMP-AMX-CRO-CFZ-GEN-STR-NER-EM-DOX-SXT-CIP-ENR ($n = 4$, 13.8%). Resistance to eight antibacterial drugs was the most common occurrence of multiple resistance ($n = 6$, 20.7%) (Table 3).

Antimicrobial resistance genes. In the present study, 40 strains (100.0%) of *E. coli* with resistance genes were detected, and the genes detected most frequently were the aminoglycoside resistance gene, *aadA* ($n = 25$, 62.5%), the tetracycline resistance genes, *tet(B)* ($n = 24$, 60.0%) and *tet(A)*, ($n = 18$, 45.0%) and the macrolide resistance gene, *erm(B)* ($n = 16$, 40.0%). Resistance genes to beta-lactams or macrolides, *blaTEM* and *erm(C)*, were not detected in this study (Table 3).

Table 1. Primer sequences, product sizes, annealing temperature and references used for the PCR in the study

Gene	Primer sequence (5'-3')	Product size (bp)	Annealing temperature (°C)	Reference or GenBank accession no.
<i>blaTEM</i>	ATAAAATTCTTGAAGACGAAA GACAGTTACCAATGCTTAATC	643	53	(25)
<i>blaSHV</i>	TTTGTGCTCTTTACTGCCTTA GCCAGATCCATTCTATCATGCCTA	198	56	DQ247972
<i>blaOXA</i>	TCAACTTCAAGATCGCA GTGTGTTAGAATGGTGA	591	53	(25)
<i>aac(2')</i>	ACTGTGATGGGATACCGCTC CTCCGTCAAGCTTTAGCTA	482	54	(26)
<i>aacA4</i>	CTTCAGGATGGCAAGTTGGT TCATCTCGTTCCGCTCAT	286	55	(26)
<i>aadA</i>	CTGGAGGTCACTGTCGTGC CCGTGGATTGCCAAAGGTC	274	55	X68089
<i>erm(B)</i>	AAAACTTACCCGCCATACCA TTTGGCGTGTTCATTGCTT	126	53	MN461246
<i>erm(C)</i>	GCTCGTGTATTCTGGGAGT AGCCTAGCAGCCATTCTATC	375	53	GQ483470
<i>tet(A)</i>	CGGAGCAGAACAAAGAACGG GGATCAGGACGGATACACCAT	345	57	(26)
<i>tet(B)</i>	CATTAATAGGCGCATCGCTG TGAAGGTCACTGATAGCAGG	391	53	(26)
<i>sul1</i>	GCCTGGAACTGCTGCTGATGC TCGCCTGCCAACCGAACTCT	314	59	(27)
<i>sul2</i>	GCGCTCAAGGCAGATGGCATT GCGTTTGATACCGGCACCCGT	793	57	(27)
<i>qnrB</i>	GATCGTGAAAGCCAGAACGG ACGATGCCTGGTAGTTGTCC	513	55	(25)
<i>adk</i>	ATTCTGCTTGGCGCTCCGGG CCGTCACCTTCGGTATT	583	54	(20)
<i>fumC</i>	TCACAGGTCGCCAGCGCTTC GTACCGAGCGAAAAAGATTC	806	54	(20)
<i>gyrB</i>	TCGGCGACACGGATGACGGC ATCAGGCCTCACGCGCATC	911	60	(20)
<i>icd</i>	ATGGAAAGTAAAGTAGTTGTCCGGCACA GGACGCAGCAGGATCTGTT	878	54	(20)
<i>mdh</i>	ATGAAAGTCGCACTCCTCGCGCTGCTGGCG TTAACGAACTCCTGCCAGAGCGATATCTTCTT	932	60	(20)
<i>purA</i>	CGCGCTGATGAAAGAGATGA CATACGGTAAGCCACGCAGA	816	54	(20)
<i>recA</i>	CGCATTGCTTACCCCTGACC TCGTCGAAATCTACGGACCGA	780	58	(20)

Table 2. Susceptibility of 40 *E. coli* strains to 13 antibiotics commonly used in China

Antibiotic	Distribution of <i>E. coli</i> strains (number of strains/%)			Decision criteria/Diameter of inhibitory zone (mm)		
	R	I	S	R	I	S
Ampicillin	21/52.5%	6/15.0%	13/32.5%	≤13	14–16	≥17
Amoxicillin	18/45.0%	3/7.5%	19/47.5%	≤13	14–17	≥18
Ceftriaxone	19/47.5%	1/2.5%	20/50.0%	≤19	20–23	≥24
Cefazolin	31/77.5%	8/20.0%	1/2.5%	≤19	20–22	≥23
Gentamicin	13/32.5%	0	27/67.5%	≤12	13–14	≥15
Streptomycin	12/30.0%	5/12.5%	23/57.5%	≤11	12–14	≥15
Neomycin	1/2.5%	15/37.5%	24/60.0%	≤11	12–16	≥17
Amikacin	1/2.5%	1/2.5%	38/95.0%	≤14	15–16	≥17
Erythromycin	17/42.5%	21/52.5%	2/5.0%	≤13	14–22	≥23
Doxycycline	14/35.0%	5/12.5%	21/52.5%	≤10	11–13	≥14
Trimethoprim-sulfamethoxazole	22/55.0%	0	18/45.0%	≤12	13–16	≥17
Ciprofloxacin	7/17.5%	0	33/82.5%	≤15	16–20	≥21
Enrofloxacin	6/5.0%	11/27.5%	23/57.5%	≤15	16–23	≥24

R – resistant; I – intermediate; S – susceptible

Table 3. Sequence types, resistance phenotypes and resistance genes in 40 *E. coli* strains

ID	Location	MLST	Resistance phenotypes	Resistance genes
1	Xushui	ST10	AMP-AMX-CRO-CFZ-GEN-STR-EM-DOX-SXT-ENR	<i>aadA, qnrB</i>
2	Xushui	ST10	AMP-AMX-CRO-CFZ-GEN-STR-NER-EM-DOX-SXT-CIP-ENR	<i>aadA, tet(B)</i>
3	Xushui	ST359	AMP-AMX-CRO-CFZ-GEN-STR-NER-EM-DOX-SXT-CIP-ENR	<i>blaSHV, aadA</i>
4	Xushui	ST10	CFZ-EM	<i>aadA, tet(B), sul2</i>
5	Xushui	ST10	AMP-AMX-CRO-CFZ-STR-NER-EM-DOX-SXT-CIP-ENR	<i>aadA, sul2</i>
6	Xushui	ST1585	AMP-AMX-CRO-CFZ-GEN-STR-NER-EM-DOX-SXT-CIP-ENR	<i>aacA4, aadA</i>
7	Xushui	ST359	AMP-AMX-CRO-CFZ-GEN-STR-NER-AMI-EM-DOX-SXT-CIP-ENR	<i>blaSHV, blaOXA, aadA</i>
8	Xushui	ST359	AMP-AMX-CRO-CFZ-GEN-NER-EM-DOX-SXT-ENR	<i>blaOXA, aacA4, aadA</i>
9	Xushui	ST359	AMP-AMX-CRO-CFZ-GEN-STR-EM-DOX-SXT-CIP-ENR	<i>blaSHV, blaOXA, aadA, tet(B)</i>
10	Xushui	ST10	CFZ-EM	<i>aadA, sul2</i>
11	Xushui	ST10	CFZ-EM	<i>aadA, tet(B), sul2</i>
12	Xushui	ST359	AMP-AMX-CRO-CFZ-GEN-NER-EM-SXT-ENR	<i>blaOXA, aadA, sul2</i>
13	Xushui	ST1125	AMP-AMX-CRO-CFZ-STR-SXT	<i>aadA, tet(B)</i>
14	Xushui	ST1585	AMP-AMX-CRO-CFZ-EM-DOX-SXT-ENR	<i>blaSHV, aadA, tet(B)</i>
15	Xushui	ST327	AMP-AMX-CRO-CFZ-EM-DOX-ENR	<i>aadA, tet(B)</i>
16	Xushui	ST937	AMP-AMX-CRO-CFZ-STR-EM-SXT-ENR	<i>aadA, tet(B)</i>
17	Qingyuan	ST10717	AMP-CFZ-STR-NER-EM-DOX-SXT	<i>aac(2'), aadA, erm(B), tet(A), tet(B)</i>
18	Qingyuan	ST942	CFZ-NER-EM-DOX	<i>erm(B), tet(A), sul1, sul2</i>
19	Qingyuan	ST446	AMP-CFZ-GEN-STR-NER-EM-DOX-SXT	<i>aac(2'), aadA, erm(B), tet(A), tet(B)</i>
20	Qingyuan	ST1310	AMP-AMX-CRO-CFZ-GEN-STR-NER-AMI-EM	<i>aac(2'), erm(B), tet(A), tet(B), sul2</i>
21	Qingyuan	ST515	AMP-AMX-CRO-CFZ-STR-EM-DOX-SXT-ENR	<i>aac(2'), erm(B), tet(A), sul1</i>
22	Qingyuan	ST48	AMP-CFZ-NER-EM	<i>aac(2'), erm(B), tet(A), tet(B), sul1</i>
23	Qingyuan	ST10	CFZ-NER-EM	<i>aac(2'), tet(A), sul2</i>
24	Quyang	ST1252	AMP-AMX-CRO-CFZ-STR-EM-SXT-ENR	<i>aac(2'), erm(B), tet(A), tet(B)</i>
25	Quyang	ST1079	AMP-CFZ-EM	<i>tet(A), tet(B)</i>
26	Quyang	ST154	CFZ	<i>aac(2'), erm(B), tet(A), tet(B), sul2</i>
27	Quyang	ST1585	AMP-AMX-CRO-CFZ-GEN-STR-NER-EM-DOX-SXT-CIP-ENR	<i>aadA, erm(B)</i>
28	Quyang	ST1167	AMP-AMX-CRO-CFZ-STR-NER-EM-DOX-SXT	<i>aadA, erm(B), tet(A)</i>
29	Mancheng	ST1610	AMP-CFZ-EM	<i>aac(2'), tet(A)</i>
30	Mancheng	ST10	NER-EM	<i>aac(2'), tet(A), sul1, sul2</i>
31	Mancheng	ST2741	CFZ-EM	<i>aac(2'), aadA, tet(A), tet(B)</i>
32	Mancheng	ST2741	CFZ-EM	<i>aac(2'), tet(A), tet(B)</i>
33	Mancheng	ST48	AMP-CFZ-GEN-STR-EM-DOX-SXT-ENR	<i>aac(2'), aadA, erm(B), tet(A), tet(B), sul1</i>
34	Mancheng	ST10	AMP-AMX-CRO-CFZ-EM-DOX-SXT-ENR	<i>aac(2'), erm(B), tet(A), tet(B), sul1, sul2</i>
35	Mancheng	ST906	AMP-AMX-CRO-CFZ-EM-SXT	<i>aac(2'), tet(A), tet(B)</i>
36	Mancheng	ST48	CFZ-EM	<i>aac(2'), aadA, erm(B), tet(B), sul1, qnrB</i>
37	Mancheng	ST48	CFZ-EM	<i>erm(B), tet(B), sul1</i>
38	Mancheng	ST48	CFZ-EM	<i>aadA, erm(B), tet(B), sul1</i>
39	Mancheng	ST906	CFZ-EM	<i>aac(2'), tet(B)</i>
40	Mancheng	ST48	AMP-AMX-CFZ-GEN-EM-DOX-SXT	<i>aadA, erm(B), sul1</i>

AMP – ampicillin; AMX – amoxicillin; CRO – ceftriaxone; CFZ – cefazolin; GEN – gentamicin; STR – streptomycin; NER – neomycin; AMI – amikacin; EM – erythromycin; DOX – doxycycline; SXT – trimethoprim-sulfamethoxazole; CIP – ciprofloxacin; ENR – enrofloxacin

Table 4. Pearson's correlation coefficients (r) of resistance genes and corresponding antibiotics

Resistance gene	Antimicrobials												
	AMP	AMX	CRO	CFZ	GEN	STR	NER	AMI	EM	DOX	SXT	CIP	ENR
<i>blaSHV</i>	0.231	0.317	0.333	0.053	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>blaOXA</i>	-0.114	0.248	0.124	-0.059	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>aac(2')</i>	-	-	-	-	-0.27 3	-0.12 5	-0.083	0.035	-	-	-	-	-
<i>aacA4</i>	-	-	-	-	0.331	0.035	0.281	-0.053	-	-	-	-	-
<i>aadA</i>	-	-	-	-	0.427	0.353	0.105	-0.059	-	-	-	-	-
<i>erm(B)</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-0.04 7	-	-	-	-
<i>tet(A)</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-0.156	-	-	-	-
<i>tet(B)</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-0.347	-	-	-	-
<i>sull</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.174	-	-
<i>sul2</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.343	-	-
<i>qnrB</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-0.106	0.035

AMP – ampicillin; AMX – amoxicillin; CRO – ceftriaxone; CFZ – cefazolin; GEN – gentamicin; STR – streptomycin; NER – neomycin; AMI – amikacin; EM – erythromycin; DOX – doxycycline; SXT – trimethoprim-sulfamethoxazole; CIP – ciprofloxacin; ENR – enrofloxacin

Pearson's correlation coefficients (r) shown in bold are significant at $P < 0.05$

A positive r indicates a positive association between the two variables, whereas a negative r indicates a negative association

- represents antimicrobials without corresponding antibiotic resistance genes

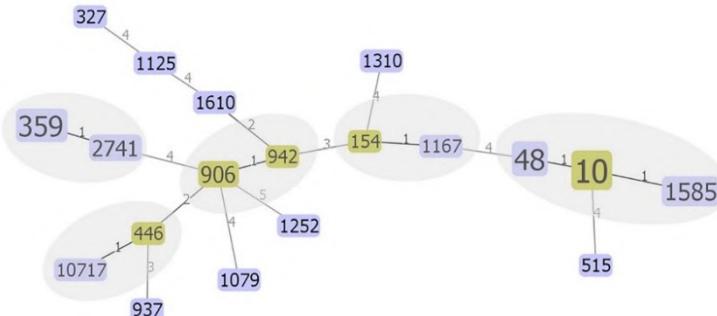


Fig. 1. Full minimum spanning tree using the goeBURST algorithm ($n = 40$). Each square represents a single sequence type (ST), and the circumference is proportional to the number of isolates within each ST. Grey regions represent a clonal complex. The numbers above the lines (1–5) represent the number of different alleles between the two ST types. The major nodes are indicated by olive green

The associations of resistance genes and the corresponding antibiotics. The relationship between resistance genes and the corresponding antibiotics of *E. coli* strains was evaluated (Table 4). The results showed that four kinds of antimicrobials, namely amoxicillin (AMX), ceftriaxone (CRO), gentamicin (GEN), and streptomycin (STR), correlated positively with their corresponding resistance genes in *E. coli* strains ($P < 0.05$).

MLST and phylogenetic analyses. Nineteen STs were identified among all the 40 strains, of which the most prevalent was ST10 ($n = 9$, 22.5%), followed by ST48 ($n = 6$, 15.0%), ST359 ($n = 5$, 12.5%) and ST1585 ($n = 3$, 7.5%); 13 STs presented only once. No new STs were found in this study (Table 3). Five major nodes comprising 14 *E. coli* isolates were found by minimum spanning tree analysis of all ST types. Based on the single-locus variant level, 40 *E. coli* strains were classified as five clonal complexes (CC10, CC154, CC359, CC446 and CC906) and their main sequence types were ST10, ST154, ST359, ST446 and ST906, respectively. There was only one pair of allelic differences between neighbouring ST types in these clonal complexes (Fig. 1).

The evolutionary tree demonstrated a close genetic relationship between strains in the same clonal complex, such as CC154 (purple area, Fig. 2) and CC446 (yellow area, Fig. 2). The strains in CC10 (blue area, Fig. 2) were distributed in different clusters of the evolutionary tree, while ST48 strains were more distantly related to ST10 and ST1585 strains (Fig. 2). By antimicrobial resistance analysis, it was shown that there were differences in drug resistance profile and gene carriage in the same ST or CC strains. For example, two *E. coli* strains in CC446 (ID17 and ID19) (Fig. 2) had similar drug resistance profiles and carried a similar number of resistance genes, and the five ST359 strains (ID3, ID7, ID8, ID9 and ID12) (Fig. 2) also matched each other in the same manner. The reverse trend was found for two strains in CC154 (ID26 and ID28) (Fig. 2) and six ST10 strains (ID1, ID10, ID11, ID23, ID30 and ID34) (Fig. 2): compared with the other strains in the same CC group or the same ST type, these strains showed remarkable differences in their drug resistance profiles and numbers of antimicrobial resistance genes (Fig. 2).

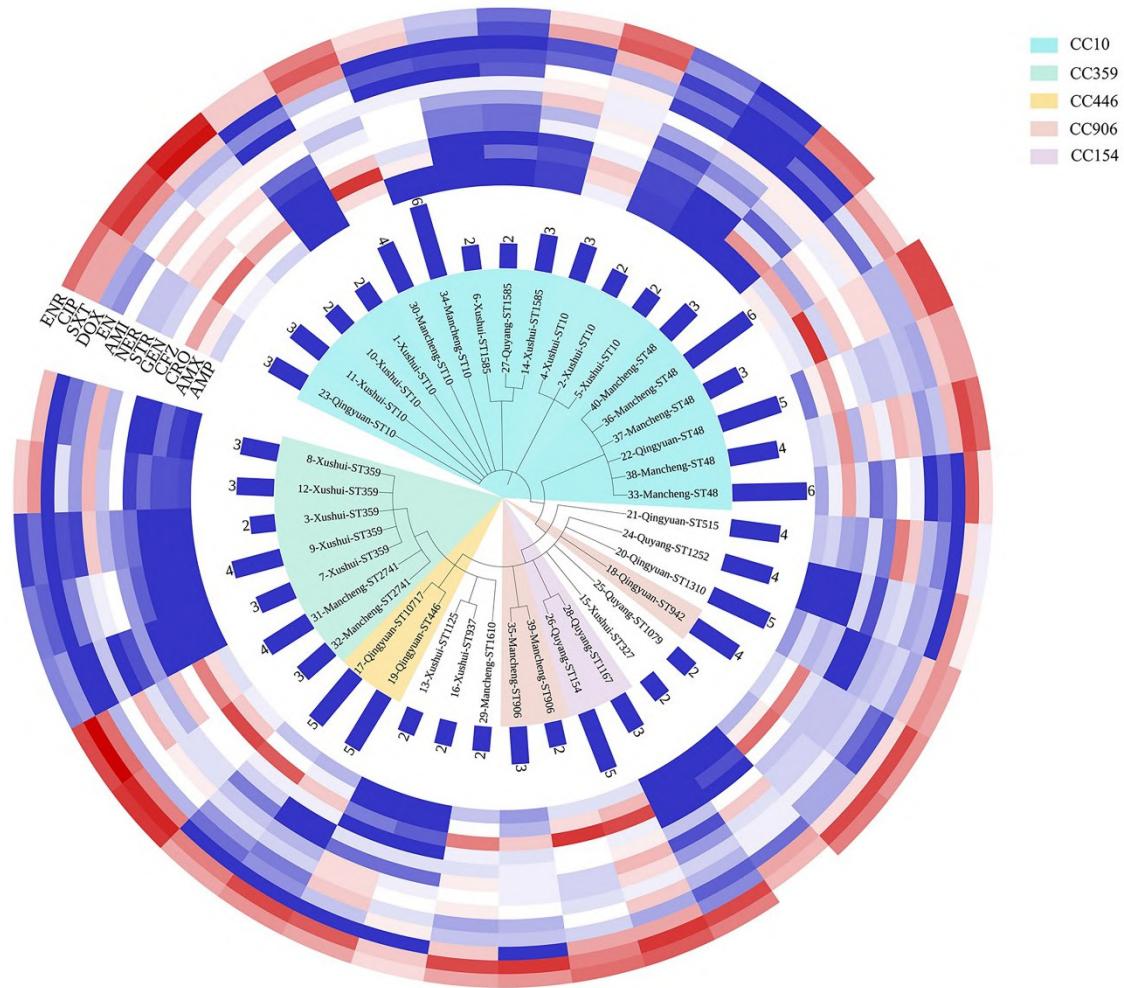


Fig. 2. Molecular phylogenetic and antimicrobial resistance analysis of 40 *E. coli* isolates. The evolutionary tree was inferred using the maximum likelihood method based on the Tamura–Nei model. The bootstrap consensus tree inferred from 1,000 replicates was taken to represent the evolutionary history of the taxa analysed. The branches of the evolutionary tree were named with ID, location, and ST type of *E. coli* isolates. The same clonal complexes were highlighted in the same colour area. The height of the blue bar graph on the periphery of the evolutionary tree represents the number of drug-resistant genes (2–6) carried by *E. coli* isolates. The diameter of different antibiotic inhibition zones (6–34 mm) was displayed as a heatmap where red represents high-resistance diameters (trending to susceptible) and blue represents low-resistance diameters (trending to resistant)

Discussion

Escherichia coli is a primary environmental bacterium that can cause mastitis in dairy cow herds. A previous review indicated that dairy cows with mastitis caused by *E. coli* generally showed severe clinical signs such as redness, swelling, pain, and fever, and that even death could result from the disease (10). In response to coliform mastitis outbreaks or the threat of them in cattle herds, large amounts of antibiotics have been used worldwide. The overuse of antibiotics is severe in China. Statistically, more than 23% of antibiotics used in the world for food animal production were used in China, and the proportion is projected to increase to 30% in 2030 (5, 34). This questionable practice has led to the emergence of AMR in *E. coli* strains. Unfortunately, the adverse effects of antimicrobial resistance in bacteria have not attracted

enough attention in livestock production (31). There are complicated genetic relationships among *E. coli* strains because of the clonal complex. Exploring these can provide helpful information to better understand the rules of antimicrobial resistance in a region. Therefore, it is constructive to analyse the perspective for *E. coli* antimicrobial resistance on dairy farms from the starting point of the phylogenetic community.

In this study, the isolation rate of *E. coli* in milk samples in the northern China region was 20.41%, which was higher than that of previous reports (7.8%) (6). Such a difference might be related to sample sizes, regional differences and detection methods. The results of susceptibility testing showed that the proportion of MDR strains was as high as 72.5%, which is higher than the 40% rate reported in milk samples from Egypt (31) but lower than the 87.8% reported in the Middle East (41). As was recently reported by Cheng *et al.* (9), MDR

E. coli in bovine mastitis is a problem in sizeable Chinese dairy herds. Most *E. coli* strains exhibited broad resistance to the beta-lactam antibiotics cefazolin (77.5%), ampicillin (52.5%), ceftriaxone (47.5%) and amoxicillin (45.0%), whereas the opposite situation was seen for neomycin (2.5%) and amikacin (2.5%) which are aminoglycoside antibiotics. In comparison, a study on the antimicrobial susceptibility of nine udder pathogens isolated from bovine clinical mastitis milk in Europe showed a higher resistance rate to ampicillin and tetracycline and a lower one to the beta-lactam antibiotics amoxicillin/clavulanic acid and cefazolin (12). We found apparent differences in antimicrobial consumption patterns between Europe and China (13), reflecting a combination of factors including pharmaceutical marketing strategies, veterinarian prescription patterns, governmental guidelines for proper antimicrobial use and farm economic benefit in different regions (33). Therefore, we inferred that our finding arose from the inappropriate use of antibiotics on the farms in the investigated region. Moreover, we found that resistance had emerged to gentamicin that was hitherto usually effective, which could be explained by the long-term use of this antibiotic in dairy herds (19).

There are many mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. In most cases, the presence of antimicrobial resistance genes strongly correlated with resistant phenotypes (3, 22), and a genetic origin aggravates the problem of antimicrobial resistance (21) because antimicrobial resistance genes can be transmitted both vertically and horizontally by plasmid, transposon and integrator in bacterial populations. This study found that more than half of the isolates carried the *aadA* and *tet(B)* genes and none carried the *blaTEM* and *erm(C)* genes, which is consistent with a previous study conducted in the north-eastern region of Jordan demonstrating the relatively high rate of *E. coli* of carriage of these resistance genes (17). To investigate the effects of difference in resistance gene distribution on antibiotic resistance in *E. coli* strains (8), we analysed correlations between antibiotics and corresponding resistance genes of *E. coli* isolates. The results showed that resistance to amoxicillin and ceftriaxone was correlated positively with resistance genes to beta-lactams (Table 4). This association is considered the main reason for the widespread resistance of *E. coli* to beta-lactam antibiotics on the regions' farms: although a large number of beta-lactam resistance genes were not detected, this trend could be the result of carriage of other genes of resistance to beta-lactams and also attributable to other complicated resistance mechanisms, such as extended-spectrum beta-lactamase production (4). Furthermore, some *E. coli* strains show no association between the antibiotics they resist and the corresponding resistance genes. Liu *et al.* (22) reported that most antibiotic resistance genes showed no correlations with their corresponding/non-corresponding antibiotics in conferring the expected resistance except the *tet(A)* resistance gene in bacteria from river

drinking-water sources. Our results are only partially consistent with these findings. Perhaps environmental selection pressure affects the diversity and dissemination of antimicrobial resistance in *E. coli* strains (22, 27). In a further study, the relationship between the antimicrobial resistance of *E. coli* and various environmental factors needs to be clarified.

Multilocus sequence typing is a robust and reproducible method for analysing genetic relationships in population genetics and is frequently used in molecular epidemiological investigations (29). In this experiment, 40 *E. coli* strains were divided into 19 STs and 5 CCs. Most of the strains with the same ST type or CC had similar genetic relationships, which is in line with the previous study (43) and is evident in the minimum spanning tree and phylogenetic tree (Figs 1 and 2). Interestingly, unlike other CCs in the phylogenetic tree, ST48 strains have a distant relationship with other ST strains in CC10. However, there is only a pair of housekeeping genes' (*adk*) difference between ST48 and ST10 strains on the minimum spanning tree, and we speculate that this phenomenon is caused by the difference in the *adk* sequence (38). We also input the heat map of antimicrobial susceptibility and the number of resistance genes into the phylogenetic tree and found that the molecular characteristics were very different in the same CCs or in the same ST strains; this is consistent with reports that the antimicrobial sensitivity of *E. coli* differs greatly from region to region (16). We attribute the polymorphism of *E. coli* molecular characteristics to differences in the environment's hygiene level, farm management model and antibiotic use on dairy farms in different regions.

In conclusion, the present study elucidated the molecular characteristics of antimicrobial resistance and genetic correlations of *E. coli* from mastitic dairy cows in northern China. The farms in our study area were contaminated with MDR *E. coli*, which could have been caused by the inappropriate use of antibiotics. The high detection rates of MDR isolates and the differences in resistance suggested that measures should be taken to reduce the risk to animal food safety and human health, such as the use of only those antimicrobials which are prudent having regard to the AMR *E. coli* and genotypes on northern Chinese dairy farms.

Conflict of Interests Statement: The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this article.

Financial Disclosure Statement: This research was supported by Hebei Key Research and Development Program (19226611D).

Animal Rights Statement: Milk was sampled through expression through the teats and no further procedures were carried out on the study cows. No animal rights statement is required. The sample collection was approved by the relevant farms.

References

1. Ahmed A.M., Furuta K., Shimomura K., Kasama Y., Shimamoto T.: Genetic characterization of multidrug resistance in *Shigella* spp. from Japan. *J Med Microbiol* 2006, 55, 1685–1691, doi: 10.1099/jmm.0.46725-0.
2. Ahmed A.M., Motoi Y., Sato M., Maruyama A., Watanabe H., Fukumoto Y., Shimamoto T.: Zoo animals as reservoirs of gram-negative bacteria harboring integrons and antimicrobial resistance genes. *Appl Environ Microbiol* 2007, 73, 6686–6690, doi: 10.1128/aem.01054-07.
3. Ai W., Zhou Y., Wang B., Zhan Q., Hu L., Xu Y., Guo Y., Wang L., Yu F., Li X.: First Report of Coexistence of blaSFO-1 and blaNDM-1β-Lactamase Genes as Well as Colistin Resistance Gene mcr-9 in a Transferrable Plasmid of a Clinical Isolate of *Enterobacter hormaechei*. *Front Microbiol* 2021, 18, 12, 676113, doi: 10.3389/fmicb.2021.676113.
4. Alam M.Z., Aqil F., Ahmad I., Ahmad S.: Incidence and transferability of antibiotic resistance in the enteric bacteria isolated from hospital wastewater. *Braz J Microbiol* 2013, 44, 799–806, doi: 10.1590/s1517-83822013000300021.
5. Antimicrobial Resistance Collaborators: Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet* 2022, 399, 629–655, doi: 10.1016/S0140-6736(21)02724-0.
6. Aslam N., Khan S., Usman T., Ali T.: Phylogenetic genotyping, virulence genes and antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolates from cases of bovine mastitis. *J Dairy Res* 2021, 88, 78–79, doi: 10.1017/S002202992100011X.
7. Bahadori M., Motamedifar M., Derakhshandeh A., Firouzi R., Motamedi Boroojeni A., Alinejad M., Naziri Z.: Genetic relatedness of the *Escherichia coli* fecal population and strains causing urinary tract infection in the same host. *MicrobiologyOpen* 2019, 8, e00759, doi: 10.1002/mbo3.759.
8. Cai W., Fu Y., Zhang W., Chen X., Zhao J., Song W., Li Y., Huang Y., Wu Z., Sun R., Dong C., Zhang F.: Synergistic effects of baicalein with cefotaxime against *Klebsiella pneumoniae* through inhibiting CTX-M-1 gene expression. *BMC Microbiol* 2016, 16, 181, doi: 10.1186/s12866-016-0797-1.
9. Cheng J., Qu W., Barkema H.W., Nobrega D.B., Gao J., Liu G., De Buck J., Kastelic J.P., Sun H., Han B.: Antimicrobial resistance profiles of 5 common bovine mastitis pathogens in large Chinese dairy herds. *J Dairy Sci* 2019, 102, 2416–2426, doi: 10.3168/jds.2018-15135.
10. Cheng W., Han S.: Bovine mastitis: risk factors, therapeutic strategies, and alternative treatments – A review. *Asian-Australas J Anim Sci* 2020, 33, 1699–1713, doi: 10.5713/ajas.20.0156.
11. Clinical and Laboratory Standards Institute: VET08: Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals, Fourth Edition. CLSI, Wayne, PA, 2018.
12. El Garch F., Youala M., Simjee S., Moyaert H., Klee R., Truszkowska B., Rose M., Hocquet D., Valot B., Morrissey I., de Jong A., VetPath Study Group: Antimicrobial susceptibility of nine udder pathogens recovered from bovine clinical mastitis milk in Europe 2015–2016: VetPath results. *Vet Microbiol* 2020, 245, 108644, doi: 10.1016/j.vetmic.2020.108644.
13. European Medicines Agency.: Second ESV AC Report. European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption Report (ESV AC). Sales of veterinary antimicrobial agents in 19 EU/EEA countries in 2010, 2018.
14. Gelband H., Miller-Petrie M., Pant S., Gandra S., Levinson J., Barter D., White A., Laxminarayan R.: The state of the world's antibiotics. Center for Disease Dynamics, Economics & Policy, Washington, D.C., 2015.
15. Ghanbarpour R., Oswald E.: Phylogenetic distribution of virulence genes in *Escherichia coli* isolated from bovine mastitis in Iran. *Res Vet Sci* 2010, 88, 6–10, doi: 10.1016/j.rvsc.2009.06.003.
16. Holmer I., Salomonsen C., Jorsal S., Astrup L., Jensen V., Høg B., Pedersen K.: Antibiotic resistance in porcine pathogenic bacteria and relation to antibiotic usage. *BMC Vet Res* 2019, 15, 449, doi: 10.1186/s12917-019-2162-8.
17. Ismail Z., Abutarbush S.: Molecular characterization of antimicrobial resistance and virulence genes of *Escherichia coli* isolates from bovine mastitis. *Vet World* 2020, 13, 1588–1593, doi: 10.14202/vetworld.2020.1588-1593.
18. Ivano H., Inoue Y., Takasago T., Kobayashi H., Furusawa T., Taniguchi K., Fujiki J., Yokota H., Usui M., Tanji Y., Hagiwara K., Higuchi H., Tamura Y.: Bacteriophage ΦSA012 Has a Broad Host Range against *Staphylococcus aureus* and Effective Lytic Capacity in a Mouse Mastitis Model. *Biology* 2018, 7, 8, doi: 10.3390/biology7010008.
19. Kimera Z., Mshana S., Rweyemamu M., Mboera L., Matee M.: Antimicrobial use and resistance in food-producing animals and the environment: an African perspective. *Antimicrob Resist Infect Control* 2020, 9, 37, doi: 10.1186/s13756-020-0697-x.
20. Levin-Reisman I., Ronin I., Gefen O., Braniss I., Shores N., Balaban N.Q.: Antibiotic tolerance facilitates the evolution of resistance. *Science* 2017, 355, 826–830, doi: 10.1126/science.aaq2191.
21. Li Y., Yang L., Fu J., Yan M., Chen D., Zhang L.: Genotyping and high flux sequencing of the bacterial pathogenic elements - integrons. *Microb Pathog* 2018, 116, 22–25, doi: 10.1016/j.micpath.2017.12.073.
22. Liu Y., Chen Y., Feng M., Chen J., Shen W., Zhang S.: Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes and their correlations in river-type drinking water source, China. *Environ Sci Pollut Res Int* 2021, 28, 42339–42352, doi: 10.1007/s11356-021-13637-8.
23. Maiden M.C., Bygraves J.A., Feil E., Morelli G., Russell J.E., Urwin R., Zhang Q., Zhou J., Zurth K., Caugant D.A., Feavers I.M., Achtman M., Spratt B.G.: Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998, 95, 3140–3145, doi: 10.1073/pnas.95.6.3140.
24. Maiden M.C., Jansen van Rensburg M.J., Bray J.E., Earle S.G., Ford S.A., Jolley K.A., McCarthy N.D.: MLST revisited: the gene-by-gene approach to bacterial genomics. *Nat Rev Microbiol* 2013, 11, 728–736, doi: 10.1038/nrmicro3093.
25. Martínez J.L.: Antibiotics and antibiotic resistance genes in natural environments. *Science* 2008, 321, 365–367, doi: 10.1126/science.1159483.
26. Mather A.E., Denwood M.J., Haydon D.T., Matthews L., Mellor D.J., Coia J.E., Brown D.J., Reid S.W.: The prevalences of *Salmonella* genomic island 1 variants in human and animal *Salmonella typhimurium* DT104 are distinguishable using a Bayesian approach. *PLoS One* 2011, 6, e27220, doi: 10.1371/journal.pone.0027220.
27. Natarajan M., Kumar D., Mandal J., Biswal N., Stephen S.: A study of virulence and antimicrobial resistance pattern in diarrhoeagenic *Escherichia coli* isolated from diarrhoeal stool specimens from children and adults in a tertiary hospital, Puducherry, India. *J Health Popul Nutr* 2018, 37, 17, doi: 10.1186/s41043-018-0147-z.
28. Navajas-Benito E.V., Alonso C.A., Sanz S., Olarte C., Martínez-Olarde R., Hidalgo-Sanz S., Somalo S., Torres C.: Molecular characterization of antibiotic resistance in *Escherichia coli* strains from a dairy cattle farm and its surroundings. *J Sci Food Agric* 2017, 97, 362–365, doi: 10.1002/jsfa.7709.
29. Núñez-Samudio V., Pecchio M., Pimentel-Peralta G., Quintero Y., Herrera M., Landires I.: Molecular Epidemiology of *Escherichia coli* Clinical Isolates from Central Panama. *Antibiotics* 2021, 10, 899, doi: 10.3390/antibiotics10080899.
30. Oliveira L., Ruegg P.L.: Treatments of clinical mastitis occurring in cows on 51 large dairy herds in Wisconsin. *J Dairy Sci* 2014, 97, 5426–5436, doi: 10.3168/jds.2013-7756.
31. Ombarak R.A., Zayda M.G., Awasthi S.P., Hineno A., Yamasaki S.: Serotypes, Pathogenic Potential, and Antimicrobial Resistance of *Escherichia coli* Isolated from Subclinical Bovine Mastitis Milk Samples in Egypt. *Jpn J Infect Dis* 2019, 72, 337–339, doi: 10.7883/yoken.JJID.2018.538.

32. Osman K.M., Kappell A.D., Elhadidy M., ElMougy F., El-Ghany W.A.A., Orabi A., Mubarak A.S., Dawoud T.M., Hemeg H.A., Moussa I.M.I., Hessain A.M., Yousef H.M.Y.: Poultry hatcheries as potential reservoirs for antimicrobial-resistant *Escherichia coli*: A risk to public health and food safety. *Sci Rep* 2018, 8, 5859, doi: 10.1038/s41598-018-23962-7.
33. Patel S., Wellington M., Shah R., Ferreira M.: Antibiotic Stewardship in Food-producing Animals: Challenges, Progress, and Opportunities. *Clin Ther* 2020, 42, 1649–1658, doi: 10.1016/j.clinthera.2020.07.004.
34. Qiao M., Ying G., Singer A., Zhu Y.: Review of antibiotic resistance in China and its environment. *Environ Int* 2018, 110, 160–172, doi: 10.1016/j.envint.2017.10.016.
35. Rossolini G.M., Arena F., Pecile P., Pollini S.: Update on the antibiotic resistance crisis. *Curr Opin Pharmacol* 2014, 18, 56–60, doi: 10.1016/j.coph.2014.09.006.
36. Seegers H., Fourichon C., Beaudeau F.: Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. *Vet Res* 2003, 34, 475–491, doi: 10.1051/veteres:2003027.
37. Song X., Wu H., Yin Z., Lian M., Yin C.: Endophytic Bacteria Isolated from *Panax ginseng* Improves Ginsenoside Accumulation in Adventitious Ginseng Root Culture. *Molecules* 2017, 22, 837, doi: 10.3390/molecules22060837.
38. Souto A.C., Bonfietti L.X., Ferreira-Paim K., Trilles L., Martins M., Ribeiro-Alves M., Pham C.D., Martins L., Dos Santos W., Chang M., Brito-Santos F., Santos D.C., Fortes S., Lockhart S.R., Wanke B., Melhem M.S., Lazéra M.S., Meyer W.: Population Genetic Analysis Reveals a High Genetic Diversity in the Brazilian *Cryptococcus gattii* VGII Population and Shifts the Global Origin from the Amazon Rainforest to the Semi-arid Desert in the Northeast of Brazil. *PLoS Negl Trop Dis* 2016, 10, e0004885, doi: 10.1371/journal.pntd.0004885.
39. Sukumar S., Roberts A.P., Martin F.E., Adler C.J.: Metagenomic Insights into Transferable Antibiotic Resistance in Oral Bacteria. *J Dent Res* 2016, 95, 969–976, doi: 10.1177/0022034516648944.
40. Suojala L., Simojoki H., Mustonen K., Kaartinen L., Pyörälä S.: Efficacy of enrofloxacin in the treatment of naturally occurring acute clinical *Escherichia coli* mastitis. *J Dairy Sci* 2010, 93, 1960–1969, doi: 10.3168/jds.2009-2462.
41. Tartor Y., Abd El-Aziz N., Gharieb R., El Damaty H., Enany S., Soliman E., Abdellatif S., Attia A., Bahnass M., El-Shazly Y., Elbedwi M., Ramadan H.: Whole-Genome Sequencing of Gram-Negative Bacteria Isolated From Bovine Mastitis and Raw Milk: The First Emergence of Colistin mcr-10 and Fosfomycin fosA5 Resistance Genes in *Klebsiella pneumoniae* in Middle East. *Front Microbiol* 2021, 12, 770813, doi: 10.3389/fmicb.2021.770813.
42. Wang D., Wang Z., Yan Z., Wu J., Ali T., Li J., Lv Y., Han B.: Bovine mastitis *Staphylococcus aureus*: antibiotic susceptibility profile, resistance genes and molecular typing of methicillin-resistant and methicillin-sensitive strains in China. *Infect Genet Evol* 2015, 31, 9–16, doi: 10.1016/j.meegid.2014.12.039.
43. Wirth T., Falush D., Lan R., Colles F., Mensa P., Wieler L.H., Karch H., Reeves P.R., Maiden M.C., Ochman H., Achtman M.: Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. *Mol Microbiol* 2006, 60, 1136–1151, doi: 10.1111/j.1365-2958.2006.05172.x.
44. Zhang A., Wang H., Tian G., Zhang Y., Yang X., Xia Q., Tang J., Zou L.: Phenotypic and genotypic characterisation of antimicrobial resistance in faecal bacteria from 30 Giant pandas. *Int J Antimicrob Agents* 2009, 33, 456–460, doi: 10.1016/j.ijantimicag.2008.10.030.

The Presumptive Effectiveness of Silver Nanoparticles in Treatment of Postpartum Endometritis in Dairy Cows

Gamal El-Amrawi¹, Dina R.S. Gad El-Karim^{2*}

¹Department of Theriogenology, Faculty of Veterinary Medicine, Alexandria University, Egypt.

²Department of Pathology and Clinical Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Alexandria University, Egypt.

Abstract

Clinical postpartum endometritis due to bacterial invasion is one of the most common diseases affecting dairy cows in postpartum period; antibiotics are widely utilized as a treatment to overcome this affection. Recently, bacterial resistance to antibiotics due to uncontrolled usage became one of the most serious problems facing the medical community, so, the aim of study was to detect the effectiveness of nano-silver particles as a treatment for postpartum endometritis in dairy Holstein cows. At 35-40 days postpartum, twenty one Holstein cows were diagnosed to be affected with postpartum endometritis, depending on clinical and ultrasonography examination. The treatment protocol included intrauterine infusion with 50 ml of silver nanoparticles solution (50 ppm/ml) for five consecutive days, and single dose of PGF-2 α analogue as a treatment for animals with a corpus luteum on their ovaries. At the 7th day post-treatment, serum level tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), C-reactive protein (CRP) and serum amyloid-A (SAA) and was significantly decreased ($P<0.01$). Also, the level of ceruloplasmin and haptoglobin (Hp) in serum recorded a significant decrement ($P<0.05$) upon treatment with silver nanoparticles. In addition, uterine secretions were found with a significant decrease or disappeared completely, and endometrial thickness decrement was detected upon ultrasonography examination. At re-examination (49-54 days postpartum), 14 animals out of 21 animals (66.6%) were recovered successfully from endometritis. The pregnancy rate on 40th day post-service was 71.4% (10 out of 14 animals were found pregnant after insemination on their observed estrus). As a conclusion, this study proved the efficacy of silver nanoparticles as a treatment for postpartum endometritis in dairy Holstein cows. So, it could substitute antibiotic treatment in such cases to avoid the antibiotic resistance problems.

KEYWORDS

Postpartum endometritis, Nano-silver, Dairy cows.

INTRODUCTION

Endometrial inflammation which occurs beyond three weeks or more after parturition in dairy cows without any apparent systemic illness signs can be called postpartum endometritis (Sheldon *et al.*, 2006). Uterine bacterial contamination after parturition is likely to occur, but occurrence of clinical postpartum endometritis depends on challenge between host immunity, virulence of invading microbes and finally some environmental factors (Potter *et al.*, 2010). Clinical endometritis would disturb ovarian cycle, delay involution of uterus or damage its tissues (Bonnet *et al.*, 1993; Sheldon *et al.*, 2002) which could prolong calving interval, decrease subsequent conception rate or lead to animal culling due to repeated failure of conception (Gilbert *et al.*, 1998). The most common bacterial species which are involved in occurrence of clinical endometritis are *Escherichia coli*, *Fusobacterium necrophorum*, *Arcanobacterium pyogenes* and *Prevotella* species (Huszenicza *et al.*, 1991, Sheldon *et al.*, 2002). Presence of abnormal vaginal discharge is one of the most characteristic signs of clinical endometritis (Holt *et al.*, 1989). Treatment of clinical endometritis depends mainly on intrauterine antibiotic infusion (Singh *et al.*, 2014), but overwhelming and uncontrolled usage of

antibiotics unfortunately have led to multidrug resistance (Yah and Simate, 2015; Gurunathan, 2015), so development of novel antibacterial agents is an urgent need to overcome bacterial resistant to antibiotics (Panáček *et al.*, 2006). Silver nanoparticles (AgNPs) are one of the most commercialized nanoparticles in health care field due to their antibacterial effect (Chen and Schluessener, 2008). Antibacterial effect of AgNPs may depends on release of the silver ions (Ag $+$) which could attach to nucleic acids forming a complex which would inhibit bacterial replication (Yakabe *et al.*, 1980; Chouhan and Guleria, 2020). Also, AgNPs have electrostatic affinity to sulfer proteins of cell membrane and cytoplasm, after adherence, they could increase permeability of cell wall and disturb cell casing (Khorrami *et al.*, 2018). In this consistence, this study hypothesized that intrauterine infusion of silver nanoparticles would aid in effective elimination of bacterial infection which cause postpartumendometritis in dairy cows owing to its proved wide spectrum antibacterial activity against different ranges of bacterial strains, such recovery could be indicated in early stage through estimation of peripheral level of some inflammatory cytokines and proteins and subsequently through detection of complete recovery and pregnancy rates. So, this study aimed to evaluate the effectiveness of silver nanoparti-

cles as a treatment for postpartum endometritis in dairy Holstein cows.

MATERIALS AND METHODS

Animals

In an extensive private dairy farm on Alexandria-Cairo desert road, twenty one Holstein cows, weight about 450-500 Kg were diagnosed suffering from clinical postpartum endometritis at 35-40 days postpartum, on the basis of clinical examination, as the animals were suffering from abnormal vaginal discharge, increased thickening of uterine wall and presence of uterine fluids upon ultrasonography examination (Real time, B-mode, 7.5MHz, Sonoscope®, China).

This study was approved by The Institutional Animal Care and Use committee (IACUC), Alexandria University, Egypt.

Treatment protocol

The treatment protocol was in form of intrauterine administration of 50 ml of aqueous solution of silver nanoparticles (silver nitrates nano-particles solution, 50ppm/ml) (Fig.1) (Seif Nano-technolgy®, Egypt) for five consecutive days using intrauterine metal catheter, and single dose (Estrumate®, 500µg cloprostetrol) (I/M) for animals with a corpus lutetum on the ovaries. Blood samples were obtained just before start of the treatment and on the 7th day from application of the treatment protocol, and animals were re-examined clinically and by ultrasonography on both the 7th and 14th day after start point of the treatment. After second examination, the recovered animals were artificially inseminated with trusted source semen straws at their upcoming estrous.

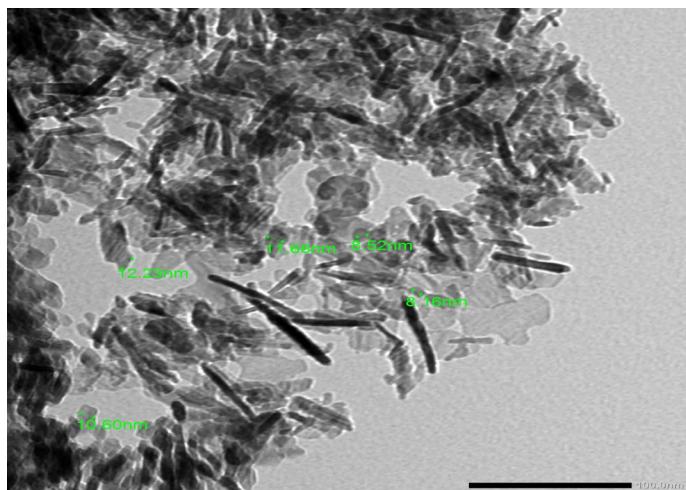


Fig. 1. Electron microscopy imaging of nano-silver particles.

Serum preparation and analysis

Blood aliquots were drawn from tail vein in plain vacutainers, left for 30 minutes to coagulate, and then centrifuged for 10 minutes at 3000 rpm to separate serum, which were kept at -20 °C for subsequent analysis. ELISA kits were used for determination of serum level of TNF-α, IL-6 (Abcam, USA) and SAA (Abbexa, UK). CRP level was detected using rapid latex slide test commercial kit (Spectrum, Egypt), serum concentration of haptoglobin and ceruloplasmin was evaluated by immuno-turbidimetry method using a commercially available kits (Randox, UK; Spectrum, Egypt).

Statistical analysis

The statistical differences in means of the serum concentration of the tested parameters before and after treatment were detected using independent samples t-test with aid of SPSS 16.0 for windows.

RESULTS

Changes in serum concentration of inflammatory cytokines and proteins

On the 7th day post-treatment, serum level of TNF-α, IL-6, SAA and CRP was decreased ($P<0.01$) significantly upon treatment with silver nanoparticles. Also, the level of haptoglobin and ceruloplasmin recorded a significant decrement ($P<0.05$) after the treatment.

Recovery and conception rate

Turbid vaginal secretions were decreased or disappeared, also decrement in endometrial thickness and uterine fluids were recorded upon ultrasonography examination on the 7th day post-treatment. Upon re-examination, 14 cows out of 21 (66.6%) were completely recovered from Endometritis (complete absence of vaginal secretion and uterine fluids with normal thickness of endometrium). Upon pregnancy diagnosis through rectal palpation, pregnancy rate was 71.4 % at 40th day after insemination (10 out of 14 animals were found pregnant).

DISCUSSION

Postpartum endometritis is one of the most common diseases affecting dairy cows, as its annual worldwide incidence may reach about 10-50% (Lewis, 1997; Noakes *et al.*, 2001) and its incidence may reach 40% in some dairy herds (Lewis, 1997). Due to its potent antibacterial effect, nano-silver particles are attracting more interest nowadays; also, AgNPs have been proved as anti-inflammatory agent which would help in the healing process (Chaloupka *et al.*, 2010). Several studies have talked over

Table 1. Mean values (mean± SD) of different evaluated parameters before and after treatments.

	Before treatment	After treatment	t-value
TNF-α (pg/ml)	209.95±8.84A	158.57±7.91B	4.33**
IL-6 (pg/ml)	219.05±9.95A	168.67±7.47B	4.05**
SAA (µg/ml)	37.90±2.64A	26.29±2.0B	3.47**
CRP (mg/L)	5.08±0.25A	3.42±0.16 B	5.56**
Ceruloplasmin (mg/dl)	62.71±3.13A	58.19±2.98B	2.16 *

Means within the same row of different litters are significantly different. * Significant at ($P < 0.05$); **: Significant at ($P < 0.01$)

about the increased level of inflammatory cytokines and proteins during course of endometritis in cattle (Li *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2014; Kaya *et al.*, 2016a; Kaya *et al.*, 2016b). The presence of bacterial lipopolysaccharide (LPS) as in case of endometritis induces inflammatory cytokines (as TNF- α) production, in order to attract inflammatory cells and increase their influx inside uterine lumen for elimination of the causative bacteria (Sheldon *et al.*, 2009). Also, uterine endometrium can produce IL-6 in response to presence of pathogens (Turner *et al.*, 2012) for leukocytes chemotaxis and enhancement of neutrophils and macrophages phagocytosis (Singh *et al.*, 2008). In the same manner, acute phase proteins play a key role in inflammatory response and serve as an accurate marker of different cattle diseases (Maden *et al.*, 2012; Tothova *et al.*, 2012). After infection, SAA is produced from liver as one of first line of defense mechanism in response to stimulation of TNF- α and/or IL-1 (Petersen *et al.*, 2004; Tothova *et al.*, 2014). In the same consistence, CRP is one of acute phase proteins which play an important role in innate defense system against pathogens (Du Clos and Mold, 2001), and its level is proved to be increased in response to endometritis (Li *et al.*, 2010; Kaya *et al.*, 2016b). Second line response include Hp, which is secreted from liver in response to increased level of IL-6 in case of prolonged inflammatory process (Petersen *et al.*, 2004; Tothova *et al.*, 2014). In addition, ceruloplasmin is also one of acute phase protein which may enhance immune cells phagocytosis and antimicrobial effect (Ceron *et al.*, 2000). Both of haptoglobin and ceruloplasmin are proved to be increased according to severity of endometritis (Kaya *et al.*, 2016b). Concerning antimicrobial impact of silver nanoparticles, after cellular uptake of nano-silver ions (Ag $+$), respiratory system of the cell will be activated and produce reactive oxygen species (ROS) and inhibit ATP release, also ROS would disturb cell membrane integrity and damage DNA, which collectively may affect bacterial replication and propagation (Pareek *et al.*, 2018; Das *et al.*, 2020). In addition, antibacterial effect of silver ions may depend on its ability to frustrate cellular protein synthesis due to ribosomal component denaturation (Pareek *et al.*, 2018). Side by side, anti-inflammatory effect of nano-silver ions was detected previously (Chaloupka *et al.*, 2010; Morozova, 2021). The previous explanations may illustrate the cause of highly significant decrement in serum level of TNF- α , IL-6, SAA and CRP in response to treatment with nano-silver particles due to elimination of causative agents. On contrary, the minimal decrease in serum level of ceruloplasmin and haptoglobin may be owed to their prolonged half-life time (Hellman and Gitlin, 2002; Eckersall and Conner, 1988). The recovery of the tested animals from endometritis upon treatment with nanosilver particles was further indicated by gradual decrease in vaginal discharge and thickness of endometrium, as abnormal vaginal secretions (Holt *et al.*, 1989) and thickened endometrium (Barlund *et al.*, 2008) are the most common signs for existence of postpartum endometritis.

CONCLUSION

In conclusion, this study indicated that silver nanoparticles solution seems to be an effective treatment for clinical postpartum endometritis in dairy cows. So, it could substitute the treatment of clinical endometritis with antibiotic to avoid the antibiotic resistance problems.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

- Barlund, C.S., Carruthers, T.D., Waldner, C.L., Palmer C.W.A., 2008. A comparison of diagnostic techniques for bovine uterine endometritis in dairy cows. *Theriogenol.* 69, 714-723.
- Bonnett, B.N., Martin, S.W., Meek, A.H., 1993. Association of clinical findings, bacteriological and histological results if Endometrial biopsy with reproductive performance of postpartum dairy cows. *Prev. Vet. Med.* 15, 252-220.
- Cerone, S.I., Sansinanea, A.S., Streitenberger, S.A., Garcia, M.C., Auza, N.J., 2000. Cytochrome c oxidase, Cu, Zn-superoxide dismutase, and ceruloplasmin activities in Copper-deficient bovines. *Biol. Trace. Ele. Res.* 73, 269-278.
- Chaloupka, K., Malam, Y., Seifalian, A.M., 2010. Nanosilver as a new generation of nanoproduct in biomedical applications. *Tren. in Biotechnol.* 28, 580-588.
- Chouhan, S., Guleria, S., 2020. Green synthesis of AgNPs using Cannabis sativa leaf extract: characterization, antibacterial, anti-yeast and α -amylase inhibitory activity. *Mater. Sci. Energy Technol.* 3, 536-544.
- Das, S.S., Alkahtani, S., Bharadwaj, P., Ansari, M.T., ALKahtani, M.D., Pang, Z., Hasnain, M.S., Nayak, A.K., Aminabhavi, T., 2020. Molecular insights and novel approaches for targeting tumor metastasis. *Int. J. Pharm.* 590, 119556.
- Du Clos, T.W., Mold, C., 2001. The role of C-reactive protein in the resolution of bacterial infection. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 14, 289-293.
- Eckersall, P.D., Conner J.G., 1988. Bovine and canine acute phase proteins. *Vet. Res. Comm.* 12, 169-178.
- Gilbert, R.O., Shin, S.T., Guard, C.L., Erb, H.N., 1998. Incidence of endometritis and effects on reproductive performance of dairy cows. *Theriogenol.* 1, 251.
- Gurunathan, S., 2015. Biologically synthesized silver nanoparticles enhance antibiotic activity against gram-negative bacteria. *J. Ind. Eng. Chem.* 29, 217-226.
- Hellman, N.E., Gitlin, J.D., 2002. Ceruloplasmin metabolism and function. *Ann. Rev. Nutri.* 22, 439-458.
- Holt, L.C., Whittier, W.D., Gwazdauskas, F.C., Vinson, W.E., 1989. Early postpartum reproductive profiles in Holstein cows with retained placenta and uterine discharges. *J. Dairy Sci.* 72, 533-539.
- Huszenicza, G., Fodor, M., Gacs, M., Kulcsar, M., Dohmen, M.J.W., Vamos, M., Porkolab, L., Legl, T., Bartyik, J., Lohuis, J.A.C.M., Janosi, S., Szita, G., 1991. Uterine bacteriology, resumption of cyclic ovarian activity, and fertility in postpartum cows kept in large-scale dairy herds. *Reprod. Dom. Anim.* 34, 237-245.
- Kaya, S., Kacar, C., Ogun, M., Kuru, M., Ozen, H., Demir, M.C., Şahin L., Zonturlu, A.K., 2016b. Evaluation of Serum C-Reactive Protein and Natural Antibodies in Cows with Endometritis. *Kafkas. Univ. Vet. Fak. Derg.* 22, 709-715.
- Kaya, S., Merhan, O., Kacar, C., Colak, A., Bozukluhan, K., 2016 a. Determination of ceruloplasmin, some other acute phase proteins, and biochemical parameters in cows with Endometritis. *Vet. World.* 9, 1056-1062.
- Khorrami, S., Zarabi, A., Khaleghi, M., Danaei, M., Mozafari, M., 2018. Selective cytotoxicity of green synthesized silver nanoparticles against the MCF-7 tumor cell line and their enhanced antioxidant and antimicrobial properties, *Int. J. Nanomed.* 13, 8013-8024.
- Kim, I., Kang, H., Jeong, J., Hur, T., Jung, Y., 2014. Inflammatory cytokines concentration in uterine flush and serum samples from dairy cows with clinical and subclinical endometritis. *Theriogenol.* 82, 427-432.
- Lewis, G.S., 1997. Symposium: health problems of the postpartum cows. Uterine health and disorders. *J. Dairy. Sci.* 80, 984-994.
- Li, D.J., Liu, Y.F., Pei, X.Y., Guo, D.Z., 2010. Research on change of acute phase protein and IL-6 in cows with endometritis. *CJAVS.* 41, 1333-1336.
- Maden, M., Ozturk, A.S., Bulbul, A., Avci, A., Yazar, E., 2012. Acute-phase proteins, oxidative stress, and enzyme activities of blood serum and peritoneal fluid in cattle with abomasal displacement. *J. Vet. Intern. Med.* 26, 1470-1475.
- Morozova, O.V., 2021. Silver Nanostructures: Limited Sensitivity of Detection, Toxicity and Anti-Inflammation Effects. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 9928-9939.
- Noakes, D.E., Parkinson, T.J., England, C.W., 2001. Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics. Harcourt Publishers Limited, The United Kingdom.
- Panáček, A., Kvítek, L., Prucek, R., Kolar, M., Vecerová, R., Pizúrová, N., Sharma, V.K., Nevečník, T.J., Zboril, R., 2006. Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization, and their antibacterial activity. *J. Phys. Chem.* 110, 16248-16253.
- Pareek, V., Gupta, R., Panwar, J., 2018. Do physico-chemical properties of silver nanoparticles decide their interaction with biological media and HeLa cell line? A review. *Mater. Sci. Eng. C* 90, 739-749.
- Petersen, H.H., Nielsen, J.P., Heegaard, P.M.H., 2004. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. *Vet. Res.* 35, 163-187.

- Potter, T.J., Guitian, J., Fishwick, J., Gordon, P.J., Sheldon, I.M., 2010. Risk factors for clinical endometritis in postpartum dairy cattle Theriogenol. 74, 127-134.
- Sheldon, I.M., Lewis, G.S., LeBlanc, S., Gilbert, R.O., 2006. Defining postpartum uterine disease in cattle. Theriogenol. 65, 1516-1530.
- Sheldon, I.M., Noakes, D.E., Rycroft, A.N., Pfeiffer, D.U., Dobson, H., 2002. Influence of uterine bacterial contamination after parturition on ovarian dominant follicle selection and follicle growth and function in cattle. Reprod. 123, 837-845.
- Sheldon, I.M., Price, S.B., Cronin, J., Gilbert, R.O., Gadsby, J.E., 2009. Mechanisms of Infertility Associated with Clinical and Subclinical Endometritis in High Producing Dairy Cattle. Reprod. Dom. Anim. 44, 1-9.
- Singh, J., Murray, R.D., Mshelia, G., Woldehiwet, Z., 2008. The immune status of the bovine uterus during the peripartum period. Vet. J. 175, 301-309.
- Singh, K.P., Singh, B., Singh, S.V., Singh, J.P., Singh, P., Singh, H.N., 2014. Evaluation of Anti-microbials in Treatment and Improving Conception rate in Endometritic Crossbred cows. Intas. Polivet. 15, 79-83.
- Tothova, C.S., Nagy, O., Seidel, H., Kovac, G., 2012. Acute phase proteins in relation to various inflammatory diseases of calves. Comp. Clin. Pathol. 21, 1037-1042.
- Tothova, C.S., Nagy, O., Seidel, H., Kovac, G., 2014. Acute phase proteins and their use in the diagnosis of diseases in ruminants: a Review Vet. Med-Czech 59, 163-180.
- Turner, M.L., Healey, G.D., Sheldon, I.M., 2012. Immunity and inflammation in the uterus. Reprod. Dom. Anim. 47, 402-409.
- Yah, C.S., Simate, G.S., 2015. Nanoparticles as potential new generation broad spectrum antimicrobial agents. DARU J. Pharm. Sci. 23, 1-14.
- Yakabe, Y., Sano, T., Ushio, H., Yasunaga, T., 1980. Kinetic studies of the interaction between silver ion and deoxyribonucleic acid, Chem. Lett. 4, 373-376.

Research Article

Experimentally Induced Endometritis Impairs the Developmental Capacity of Bovine Oocytes[†]

Mackenzie J. Dickson¹, Rachel L. Piersanti¹,
Rosabel Ramirez-Hernandez¹, Eduardo Barros de Oliveira¹,
Jeanette V. Bishop², Thomas R. Hansen², Zhengxin Ma¹,
Kwang Cheol C. Jeong¹, Jose E.P. Santos¹, Martin I. Sheldon³,
Jeremy Block⁴ and John J. Bromfield^{1,*}

¹Department of Large Animal Clinical Sciences, University of Florida, Gainesville FL, USA, ²Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, Department of Biomedical Sciences, College of Veterinary Medicine and Biomedical Sciences, Colorado State University, Fort Collins, CO, USA, ³Institute of Life Science, Swansea University Medical School, Swansea University, Swansea, UK and ⁴OvaTech, Gainesville, FL, USA

*Correspondence: Department of Animal Sciences, University of Florida, P.O. Box 110910, Gainesville, FL 32611-0910, USA. Tel: +1 (352)294-6991; E-mail: jbromfield@ufl.edu

†Grant Support: This study was supported by the Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development of the National Institutes of Health under Award Number R01HD084316. The content is solely the responsibility of the authors and does not necessarily represent the official views of the National Institutes of Health.

Conference presentation: Presented in part at the American Dairy Science Association 35th Discover Conference, 29 October–1 November 2018, Itasca, Illinois, and 52nd Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction, 18–21 July 2019, San Diego, California.

Received 5 December 2019; Revised 1 March 2020; Editorial Decision 7 May 2020; Accepted 11 May 2020

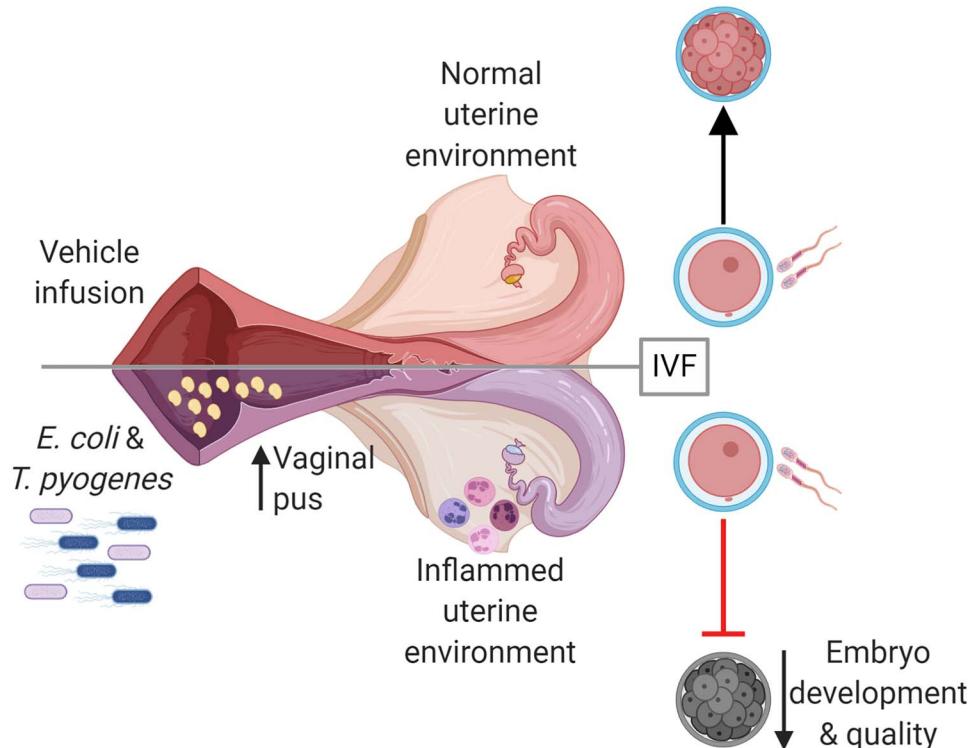
Abstract

Uterine infection is associated with infertility in women and dairy cows, even after the resolution of infection. However, the mechanisms causing this persistent infertility are unclear. Here, we hypothesized that induced endometritis in non-lactating dairy cows would reduce the developmental competence of oocytes. Non-lactating Holstein cows received an intrauterine infusion of endometrial pathogenic bacteria (*Escherichia coli* and *Trueperella pyogenes*; $n = 12$) or vehicle control ($n = 11$) on day 2 of the estrous cycle. Bacterial infusion increased expression of endometrial inflammatory mediators, and a mucopurulent discharge in the vagina confirmed the establishment of endometritis. Oocytes were collected by transvaginal ultrasound-guided ovum pickup on days 2, 24, 45, and 66 following infusion and subjected to in vitro fertilization and embryo culture. Bacterial infusion resulted in fewer cleaved oocytes developing to morulae compared to vehicle-infused controls (30.7 versus 45.0%), with the greatest effect observed in oocytes collected on day 24. Development to morula was inversely correlated with endometrial expression of *IL6* on day 6. The expression of genes associated with embryo quality did not differ significantly between morulae from bacteria-infused and control cows. Artificial insemination 130 days after intrauterine infusion resulted in normal, filamentous embryos that produced interferon tau 16 days after conception in both infusion groups. This model of experimentally induced uterine infection successfully resulted in endometritis and a reduction in the proportion of oocytes that developed to morulae following in vitro fertilization. In conclusion, endometritis reduced the capacity of oocytes to develop to morulae.

Summary Sentence

Induction of uterine infection has a long-term impact on the oocyte, reducing the capacity of the oocyte to develop to an embryo in dairy cows.

Graphical Abstract



Key words: oocyte, inflammation, female infertility, embryo, endometritis.

Introduction

Uterine infections of women and dairy cows are associated with reduced fertility [1, 2], yet the mechanisms responsible for persistent infertility are unclear. An estimated 3.6 million cases of gonorrhea or chlamydia infections occur in women annually in the United States [3], of which 10% cause pelvic inflammatory disease [4]. Bacterial infections of the reproductive tract and pelvic inflammatory disease both result in uterine inflammation [2, 5]. Each case of pelvic inflammatory disease costs approximately \$3000 and results in high rates of hospitalization [6]. Similarly, bacterial infection of the postpartum uterus is ubiquitous in dairy cows, with up to 40% of cows developing a clinical uterine disease [1, 7]. Cows diagnosed with postpartum uterine disease are less likely to become pregnant and are more likely to abort [8]. Uterine disease in cows costs approximately \$900 million annually in the United States due to treatment cost, loss of milk production, infertility, increased culling, and cost of replacement cows [1, 9].

Although infections occur in the uterus, ovarian signaling and function are altered in cattle with active uterine infection. Cows with uterine disease have slower follicle growth, impaired ovulation, and delayed and irregular ovarian cyclicity [10–12]. Interestingly, infertility in cows is evident even after resolution of disease, as many cows remain unable to conceive [13–15].

The Gram-negative bacteria, *Escherichia coli*, and Gram-positive bacteria, *Trueperella pyogenes*, are common pathogens that cause clinical endometritis in dairy cows [16]. Outer membrane components of Gram-negative bacteria, including lipopolysaccharide (LPS), are detectable in follicular fluid, and follicular fluid LPS concentrations are correlated with the severity of uterine inflammation [17, 18]. Granulosa cells produce an inflammatory response to LPS and other bacterial components in vitro, and uterine infection changes the transcriptome of granulosa cells long after the clearance of infection [17, 19]. Oocytes cultured in the presence of bacterial components have an increased frequency of meiotic failure [13] and a decreased capacity to develop to the blastocyst [14]. Oocytes are a finite resource in the ovary and require in excess of 100 days to develop from the primordial follicle until ovulation [20, 21]; this allows for the intriguing possibility that oocytes could be affected during uterine infection and bear prolonged perturbations that could compromise their quality and affect fertility long after the resolution of infection.

Lactation, negative energy balance (when the metabolic energy required for maintenance and lactation exceeds the energy available from the diet), uterine environment, and common postpartum diseases can influence fertility of the postpartum dairy cow. To disentangle the effects of uterine infection on oocyte quality from

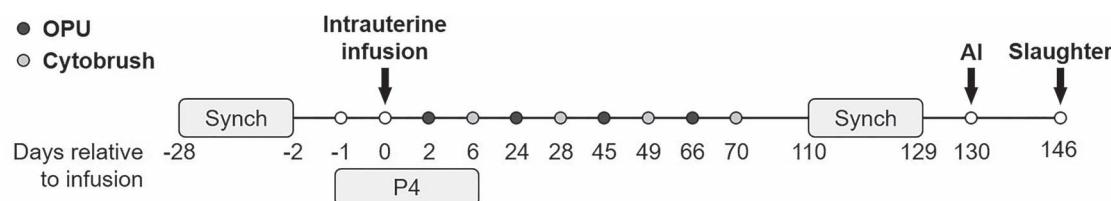


Figure 1. Timeline of major experimental events. Estrous cycles were synchronized with gonadotrophin-releasing hormone and prostaglandin F_{2α} prior to intrauterine infusion of either LB broth vehicle medium (vehicle; $n = 11$) or pathogenic *E. coli* and *T. pyogenes* in LB broth (bacteria; $n = 12$) on experimental day 0. Major events include oocyte pickup (OPU,*), endometrial cytobrush (*) sampling, artificial insemination (AI), progesterone (P4) administration, and slaughter. Timeline is not drawn to scale.

other postpartum factors, we experimentally induced endometritis in non-lactating dairy cows and collected oocytes to assess their capacity to develop to morulae following in vitro fertilization and embryo culture. We hypothesized that induced endometritis in non-lactating dairy cows would reduce the competence of oocytes to develop into embryos following in vitro fertilization and embryo culture. We aimed to establish infection in non-lactating cows using pathogenic bacteria, determine the impact of uterine infection on oocyte quality and subsequent embryo development, and assess the ability of cows to conceive following artificial insemination.

Materials and methods

The University of Florida Institutional Animal Care and Use Committee approved all animal procedures (protocol number 201508884). The experiment was conducted from February to August 2018 at the University of Florida Dairy Research Unit.

Experimental protocol and establishment of uterine infection

Establishment of endometritis followed the protocol of Piersanti et al. [22], with minor modifications (Figure 1). Twenty-three 2-year-old first lactation Holstein cows were enrolled in the study. Cows were free of clinical disease following parturition (including uterine disease) prior to enrollment. At least 38 days prior to the beginning of the study, cows were vaccinated against bovine viral diarrhea, infectious bovine rhinotracheitis, parainfluenza, bovine respiratory syncytial virus, and multiple serovars of Leptospira (Bovi-Shield Gold FP 5 VL5 HB; Zoetis, Parsippany, NJ) and dewormed using moxidectin (Cydectin; Bayer HealthCare, LLC, Animal Health Division, Shawnee Mission, KS). Lactation was ended within 67 days of calving and at least 45 days prior to the initiation of the study by a final milking and intramammary treatment with ceftiofur hydrochloride (Spectramast, Zoetis), followed by a teat sealant (Orbeseal, Zoetis). No cows developed mastitis during the study period. Cows were maintained on pasture and fed a total mixed ration daily with free access to water. Cows were blocked by days postpartum and divided into two cohorts consisting of two infusion groups (vehicle or bacteria intrauterine infusion, see below). Random assignment to either treatment group was performed for each block by random number generation in Microsoft Excel.

Estrous cycles of cows were synchronized (Figure 1) using 100 µg GnRH (gonadorelin diacetate tetrahydrate; OvaCyst, Bayer) i.m., followed by 25 mg prostaglandin (PG) F_{2α} (dinoprost tromethamine; Prostamate, Bayer) i.m. 7 days later, followed by GnRH after 3 days and 10 days, PGF_{2α} 7 days later, and another, final GnRH injection 56 h following PGF_{2α} to stimulate ovulation [23]. Progesterone (200 mg) in corn oil (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) was administered i.m. to cows daily starting on the final day of GnRH

administration and continued for 7 days. On the day of intrauterine infusion (experimental day 0), cows received an epidural anesthetic of 60 mg lidocaine hydrochloride 2% (Aspen Veterinary Resources, Greeley, CO) injected into the intercoccygeal intervertebral space. External genitalia were cleaned with 1% Virkon solution (DuPont, Wilmington, DE), followed by 1% chlorhexidine solution (Aspen Veterinary Resources) and 70% ethanol. A sheathed Neilson catheter (450 mm; Supplies for Farmers, Lincolnshire, UK) was introduced transvaginally into the reproductive tract and guided into the uterine body via rectal palpation. Once in the uterine body, the sheath was retracted to expose the catheter port, which was rotated three times against the endometrial lining to debride the endometrium prior to intrauterine infusion. Bacteria-infused cows ($n = 12$) received 10 mL of Luria-Bertani (LB) broth containing 5.05×10^7 CFU/mL *E. coli* MS499 and 10 mL of LB containing 3.65×10^7 CFU/mL of *T. pyogenes* MS249, followed by 10 mL of LB to flush the catheter. Vehicle-infused cows ($n = 11$) received an intrauterine infusion of 30 mL of LB broth.

Propagation of pathogenic *E. coli* and *T. pyogenes* for intrauterine infusion

Bacterial cultures were prepared as previously described by Piersanti et al. [22]. Briefly, *E. coli* MS499 was cultured from frozen glycerol stocks on LB agar [24]. The day before intrauterine infusion, a single bacterial colony was picked from the plate and inoculated into LB broth containing 1% tryptone, 0.5% yeast extract, and 1% sodium chloride. The culture was incubated overnight at 37 °C with shaking at 200 rpm. In parallel, *T. pyogenes* MS249 was grown from frozen glycerol stocks on trypticase soy blood agar at 37 °C for 48 h [25]. The day prior to intrauterine infusion, a single bacterial colony was selected and inoculated into Bacto Brain Heart Infusion broth (BHI; Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) supplemented with 5% fetal bovine serum (Fisher Scientific) and cultured overnight at 37 °C with shaking at 200 rpm. Bacterial growth was monitored by measuring optical density at 600 nm. A final preparation of 5.05×10^7 CFU/mL *E. coli* or 3.65×10^7 CFU/mL of *T. pyogenes* MS249 was diluted in sterile LB broth and loaded into 10-mL syringes for infusion. To measure the final concentrations of bacterial cells infused, tenfold serial diluted bacterial cultures were plated on agar and grown at 37 °C to count CFU. Sterile LB broth for flushing catheters and vehicle infusions was loaded into 10-mL syringes. Infusions were transported to the farm on ice.

Evaluation of uterine infection

Rectal temperature was measured (AG-102 thermometer, AG-Medix, Mukwonago, WI) between 7 AM and 9 AM on day -2, 1, 3, 5, and 10. Vaginal mucus samples were collected and examined using a clean, gloved hand on days -2, 3, 5, 10, 14, 20, 28, 49, and 70. Briefly, the vulva was cleaned with 70% alcohol and dried with

paper towels. Mucus was collected by introducing a clean, gloved hand into the vagina and retrieving any contents from the lateral, dorsal, and ventral vaginal walls. Mucus was graded on a scale of 0–4 according to Sheldon et al. [1], where grade 0 was no mucus or clear/translucent mucus; grade 1 was mucus containing flecks of white or off-white pus; grade 2 was mucus containing $\leq 50\%$ white or off-white mucopurulent material; grade 3 was mucus containing $> 50\%$ purulent material; and grade 4 was mucus containing $> 50\%$ purulent material and dark brown blood.

Endometrial cytobrush samples were collected on day 6, 28, 49 or 50, and 69 or 70 (Figure 1). Briefly, external genitalia were cleaned with 1% chlorhexidine solution followed by 70% ethanol. Guided by rectal palpation, the cytobrush tool (Medscand Medical, Cooper Surgical, Trumbull, CT) contained within a metal sheath and covered in a plastic chemise was introduced into the vagina and passed through the cervix. The plastic chemise was retracted over the tool exposing the brush to the endometrium. The brush was rotated three times to collect endometrial cells before being retracted into the metal sheath and removed from the cow. The cytobrush was smeared on a clean, glass slide for cytology, and then the brush was snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until used for real-time RT-PCR. For cytology, slides were air dried and stained with Rapid-Chrome Kwik-Diff (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) to assess the proportion of polymorphonuclear cells present. A total of 200 cells were counted at both $10\times$ and $40\times$ magnification on a Nikon Optiphot microscope (Nikon Instruments, Melville, NY), and the proportion of polymorphonuclear cells was determined.

Blood was collected via coccygeal venipuncture on days –2, 5, and 145 into evacuated tubes containing lithium heparin (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) for plasma collection or Z serum clot activator (Greiner Bio-One, Monroe, NC) for serum collection and centrifuged for 10 min at $2400 \times g$ at room temperature, aliquoted and stored at -20°C . Plasma haptoglobin (Life Diagnostics, Inc., West Chester, PA) and serum progesterone (DRG International, Springfield Township, NJ) were quantified using commercially available ELISAs according to the manufacturer's instructions. The haptoglobin and progesterone intra-assay coefficient of variation was 4.2 and 2.9%, and the limit of detection was 3.91 and 0.3 ng/mL, respectively. Serum anti-Müllerian hormone (AMH) was quantified by a commercial laboratory (Ansh Labs, Webster, TX). The intra-assay coefficient of variation was 1.5% for high-concentration (1721 pg/mL), 2.8% for medium-concentration (687 pg/mL), and 0.4% for low-concentration (336 pg/mL) bovine serum AMH controls. The inter-assay coefficient of variation was 9.3, 7.4, and 5.7% for high-, medium-, and low-concentration controls, respectively. The limit of detection for AMH was 22 pg/mL.

Follicle aspiration for oocyte pickup and follicle ablation

To assess the impact of endometritis on oocytes over time, transvaginal ultrasound-guided oocyte pickup was performed on experimental days 2, 24, 45, and 66 (Figure 1). Between each oocyte pickup procedure, dominant follicle ablation was performed 4 days prior to oocyte pickup to maximize the number of oocytes collected and facilitate estrous synchronization. In brief, cows were restrained and received epidural anesthetic in the intercoccygeal intervertebral space using 3 mg xylazine (AnaSed; Akorn, Lake Forest, IL) and 60 mg of lidocaine hydrochloride 2%. External genitalia were cleaned with 1% chlorhexidine solution, followed by 70% ethanol. The vagina was rinsed three times by lavage, first using 100 mL of 0.5%

chlorhexidine solution and then twice with 100 mL sterile 0.9% saline. The oocyte pickup instrument, including a 7.5-MHz convex ultrasound probe (Choice Medical, South Pasadena, FL) covered in a disposable chemise, was introduced into the vagina using sterile lubricant. The ovary was visualized by ultrasound (Aloka SSD-500, Hitachi Healthcare Americas, Twinsburg, OH), and an 18-gauge needle and vacuum were employed for dominant follicle (> 8 mm) ablation or follicle (< 8 mm) aspiration for oocyte pickup. Follicular aspirates from dominant follicle (> 8 mm) ablation were discarded. Follicle aspirates (< 8 mm) were collected into ovum pickup medium (IVF Bioscience, Falmouth, UK) and subsequently filtered and rinsed using an embryo flush filter (Watanabe Tecnologia Aplicada, Brazil). Oocytes were isolated and washed in three drops of 39°C HEPES-buffered oocyte maturation medium (IVF Bioscience) and matured in glass vials containing HEPES-buffered maturation medium at 38.5°C for 24 ± 3 h. All procedures for oocyte maturation, fertilization, and embryo culture were performed keeping oocytes and subsequent embryos from each cow at each time point as an individual group.

In vitro fertilization and embryo culture

Following oocyte maturation, groups of 1 to 12 oocytes were transferred to 100 μL drops of BO-IVF medium overlaid with light mineral oil (IVF Bioscience). Oocytes were fertilized with sperm from the sire Monument 014HO04784 (Select Sires, Plain City, OH) to yield a final concentration of 2×10^6 sperm/mL and placed in a humidified incubator at 38.8°C with 6% O_2 , 6% CO_2 , and balanced N_2 . After 22 ± 2 h of fertilization, oocytes were rinsed in oocyte wash medium (IVF Bioscience), and cumulus cells were removed by mechanical pipetting (CooperSurgical, Trumbull, CT). Subsequently, oocytes were moved to 100 μL drops of BO-IVC embryo culture medium (IVF Bioscience) overlaid with light mineral oil. Embryos were cultured in groups of 1 to 12 at 38.8°C in a humidified environment of 6% O_2 and 6% CO_2 and balanced N_2 . Embryos were assessed for cleavage 3.5 days after fertilization and development to morula 6 days after fertilization. Six days after fertilization, morulae from each individual cow were washed three times in DPBS containing 0.2% polyvinylpyrrolidone, the zona pellucida removed in Tyrode acid solution (Sigma-Aldrich) and washed three times in DPBS before snap freezing in liquid nitrogen and storage at -80°C . Embryo development was halted at the morula stage, prior to differentiation to inner cell mass and trophectoderm, in order to analyze a homogenous cell population.

Fixed-time artificial insemination

Beginning at experimental day 110, estrous cycles of cows were synchronized for fixed-time artificial insemination (Figure 1). The synchronization protocol was initiated using PGF_{2α}, followed by injection of GnRH 48 h later and another GnRH injection 6 days later, two subsequent PGF_{2α} injections 24 h apart, 1 week after the previous GnRH injection, and a final GnRH injection 12 h before insemination. On experiment day 130, all cows were inseminated with 500 μL of semen from the sire Passat 7HO12659 (Select Sires). Sixteen days following insemination, cows were euthanized on experimental day 146 (details below) to recover embryos and collect reproductive tissues.

Postmortem tissue collection

Cows were euthanized by captive bolt and exsanguination 146 days after intrauterine infusion (16 days following insemination;

Figure 1). Reproductive tracts were collected, placed on ice, and processed within 1 h of slaughter. Excess tissue was trimmed and the reproductive tract (cervix, uterus, oviduct, and ovaries) was weighed. The uterine horn ipsilateral to the side of ovulation was identified by the corpus luteum in the ovary. The ovaries and oviducts were removed for further processing. The uterus was clamped with hemostats near the uterotubal junction and at the uterine bifurcation. The ipsilateral horn was flushed with 20 mL of 0.9% saline to collect uterine fluid and potential embryos. An additional three uterine flushes were performed to maximize the potential of recovering an embryo. The first uterine flush was examined for the presence of an embryo prior to centrifugation for 10 min at 1000 × g to remove debris, snap-frozen in liquid nitrogen, and stored at -80 °C. Embryo morphology was recorded prior to sampling the distal portion of trophectoderm using clean 20-gauge needles. Trophectoderm samples were washed twice in PBS, snap-frozen in liquid nitrogen, and stored at -80 °C.

Interferon tau quantification in uterine fluid

Interferon tau (IFNT) content of uterine fluid was quantified by ELISA (Bishop JV and Hansen TR, unpublished in collaboration with a Biopharma Company). Briefly, glycosylated recombinant bovine IFNT was purified from cultures of human HEK cells that were transformed with bovine IFNT cDNA (bTP509) and used to generate polyclonal antibodies in goats (#51; 3.5 µg/mL) and in rabbits (#5670; 9.6 µg/mL). These antibodies were used as capture and biotinylated detection antibodies, respectively, in a sandwich ELISA. The ELISA had a detection range of 7.8–500 pg/mL and limit of detection of 61 pg/mL. The intra-assay coefficient of variation was 0–1.4% for high-concentration (500 pg/mL), 0–3.9% for medium-concentration (100 pg/mL), and 0.9–2.2% for low-concentration (20 pg/mL) recombinant bovine IFNT controls. The inter-assay coefficient of variation was 1.1, 1.6, and 1.8% for high-, medium-, and low-concentration controls, respectively. The ELISA specifically detects IFNT and does not cross-react with IFN ω , IFN α/β , or IFN γ . Samples were assayed undiluted or at dilutions in steer serum of 1:10, 1:100, 1:1000, 1:5000, or 1:10 000 to detect IFNT in the linear range of the assay. Operators were blind to the treatment of samples being assayed. Samples below the limit of detection were assigned a concentration of 61 pg/mL for statistical analysis.

RNA extraction and real-time RT-PCR

Total RNA was extracted from cytobrush and trophectoderm samples using the Trizol method (Life Technologies, Carlsbad, CA). Total RNA was extracted from morula that were pooled from a single cow at each time point using the RNeasy Micro Kit according to the manufacturer's instructions (Qiagen, Hilden, Germany). Reverse transcription was performed using the Verso cDNA synthesis kit (Thermo Fisher Scientific). Morula cDNA underwent additional selective pre-amplification using SsoAdvanced PreAmp Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA) prior to real-time RT-PCR.

Primers were designed using the NCBI database (Table 1). Amplification efficiency for each primer pair was evaluated and met MIQE guidelines of $r^2 > 0.98$ and efficiency of 90–110% [26]. Real-time RT-PCR was performed in duplicate using a two-step PCR protocol for cytobrush samples and a three-step protocol for morula and trophectoderm. Each 20 µL reaction consisted of 500 nM of each forward and reverse primer and iTaq Universal SYBR Green Master Mix (Bio-Rad) and cDNA. A Bio-Rad CFX Connect light cycler (Bio-Rad) was employed with an initial denaturation step at 95 °C for 30 s

followed by 40 cycles at 95 °C for 5 s, specific annealing temperature (Table 1) for 10 s, and final extension at 60 °C for 30 s. A no template negative control was used in place of cDNA to determine nonspecific amplification for each primer pair. Relative expression for genes of interest was calculated using the $2^{-\Delta Ct}$ method relative to selected housekeeping genes (GAPDH for endometrial cytobrush data; geometric mean of GAPDH, RPL19, and SDHA for morula data; and geometric mean of ACTB and GAPDH for trophectoderm data). Reference gene expression was stable across experimental treatments ($P > 0.05$).

Statistical analysis

Rectal temperature, haptoglobin, polymorphonuclear cell number, progesterone, AMH, gene expression, and IFNT were analyzed using SPSS v25 (IBM Corporation, Armonk, NY). Data were analyzed with a generalized linear mixed model with repeated measures (if applicable) and autoregressive covariance structure. The fixed effects of treatment, day, and the interaction were analyzed using pairwise comparisons. Analysis of treatment combined all days and only studied an effect of bacterial infusion, while analysis of day combined treatments and only assessed effect of each day regardless of treatment. Rectal temperature and haptoglobin each had a pre-infusion data point (day -2) which was used as a covariate. Gene expression and haptoglobin data were log-transformed for normality. Vaginal mucus grade, oocyte cleavage, and morula development data were analyzed using logistic regression with Poisson and binomial distribution, respectively, with the GLIMMIX procedure in SAS (SAS Institute, Cary, NC). Cow within treatment was considered a random effect, and fixed effects of treatment, day, and the interaction were analyzed. Carcass weight, uterine weight, corpus luteum diameter, and number of embryos collected at slaughter were analyzed using the two-tailed t-test function in GraphPad Prism 7.04 (GraphPad Software, La Jolla, CA). Statistical significance was set at $P \leq 0.05$.

Results

Establishment of uterine infection

Intrauterine infusion of bacteria induced clinical endometritis, as determined by an increased vaginal mucus grade compared to vehicle infusion ($P \leq 0.05$; Figure 2A). Although the proportion of cows with polymorphonuclear cells present in uterine cytology samples on day 6 was not different between treatments, polymorphonuclear cells were detected in 5 of 12 bacteria-infused cows and only 1 of 11 vehicle-infused cows ($P > 0.05$; Figure 2B). Bacteria-infused cows did not have elevated rectal temperatures compared to vehicle-infused cows, and no cows exhibited fever (>39.5 °C, $P > 0.05$; Figure 2C). Circulating haptoglobin concentrations on day 5 were not significantly increased by bacterial infusion compared to vehicle infusion ($P > 0.05$; Figure 2D), but the four highest concentrations were all in the bacterial infusion group. Together these data show that clinical endometritis was induced by bacterial infusion without causing systemic disease.

Endometrial inflammation was evaluated using samples collected on days 6, 28, 49, and 70 (Figure 3). Expression of endometrial CXCL8, IL1B, IL6, PTGS2, and TNF was increased ($P \leq 0.05$; Figure 3B–D, F, and G) on day 6 in bacteria-infused cows compared to vehicle-infused controls. Expression of endometrial IL1B and PTGS2 remained increased on day 28 in bacteria-infused cows compared to vehicle-infused controls ($P \leq 0.05$; Figure 3C and F).

Table 1. Primer sequence and annealing conditions used for real-time RT-PCR.

Gene Symbol	Primer sequence	Annealing temperature (°C)	Accession number
ACTB	5'-TTGGCCTTAGGGTCAGGG 3'-CAGAACACTCGTACGTGGG	60	NM_173979.3
AKR1C4	5'-TGCACCAGGTGGAATGTCA 3'-ACCCATTCTTTAGTCGTTGGGA	60	NM_181027.2
BAX	5'-CAGGGTGGTGGACGG 3'-CTTCCAGATGGTGAGCGAGG	60	NM_173894.1
BCL2	5'-GAGTTCGGAGGGGTATGTG 3'-ACAAAGCGTCCCAGCC	60	NM_001166486.1
CDKN1C	5'-GCCTCTCATCTCCGACTTCT 3'-CCCAGGAACCTCGTTGAC	60	NM_001077903.2
CXCL8	5'-GCAGGTATTGTGAAGAGAGCTG 3'-CACAGAACATGAGGCACTGAA	60	NM_173925.2
DNMT3A	5'-CCATGTACCGCAAGGCTATCTA 3'-CCTGTCATGGCACATTGGAA	60	XM_024998.68.1
GAPDH	5'-AGGTCGGAGTGACGGATTC 3'-ATGGCGACGATGTCCACTT	60	NM_001034034.2
HSPA1A	5'-GACAAGTGCCAGGAGGTGATT 3'-CAGTCTGCTGATGATGGGTTA	60	NM_203322.3
IFNT2	5'-TCCATGAGATGCTCAGCAGT 3'-TGTGGAGCCCAGTCAGA	60	NM_001015511.4
IGF2R	5'-CAGGTCTTGCACACTGGTGTATGA 3'-TTGTCAGGGAGATCAGCATG	60	NM_174352.2
IL1B	5'-CTTCATTGCCAGGTTCTG 3'-CAGGTGTTGGATGCAGCTCT	60	NM_174093.1
IL6	5'-ATGACTTCTGCTTCCCTACCC 3'-GCTGCTTCACACTCATCATT	60	NM_173923.2
PPARG	5'-ATTATTCTCAGTGGAGACGCC 3'-CAAGGCTTGACAGATTG	60	NM_181024.2
PTGES	5'-GCTCGGAAGAAGGCTTTG 3'-AAAGCCCAGGAACAGGAAGG	60	NM_174443.2
PTGS2	5'-CGTAAAGGCTGCCCTTA 3'-ATCTAGTCCAGAGTGGGAGAG	62	NM_001105323.1
PTPRC	5'-CTCGATGTTAACGAGAGGAAT 3'-TCTTCATCTTCCACGCAGTCTA	56	NM_001206523.1
RPL19	5'-ATGCCAACTCCGCCAGCAGAT 3'-TGTTTTCGGCATCGAGCCG	60	NM_001040516.2
SDHA	5'-GGAACACTGACCTGGTGAG 3'-GGAACACTGACCTGGTGAG	60	NM_174178.2
SLC2A1	5'-AGCGTCATCTTCATCCCAGC 3'-AGCTCTTCAGCACGCTCTT	60	NM_174602.2
TNF	5'-CACATACCCTGCCACAAGGC 3'-CTGGGGACTGCTTCCCTCT	62	NM_173966.3

The expression of endometrial TNF was increased in bacteria-infused cows compared to vehicle controls overall ($P \leq 0.05$; Figure 3H), while AKR1C4, CXCL8, IL1B, IL6, PTGES, PTGS2, PTPRC, and TNF expression was affected by day relative to infusion ($P \leq 0.05$; Figure 3A–H), and CXCL8, IL6, and PTGS2 expression was affected by the interaction between treatment and day relative to infusion ($P \leq 0.05$; Figure 3B, D, and F). The expression of CXCL8, IL1B, IL6, PTGES, and TNF was different on day 6 compared with days 28, 49, and 70, while PTGES, PTGS2, PTPRC, and TNF expression was different on day 28 compared to days 49 and 70. The expression of PTGS2 was different on day 6 compared to day 28, while expression of AKR1C4 was different on days 6 and 28 compared to day 70. Finally, the expression of PTPRC was different on day 6 compared to days 49 and 70, while expression of IL1B on day 70 was different compared to days 28 and 49. These findings

provide further evidence of endometritis in the bacteria-infused cows.

Developmental competence of oocytes following in vitro fertilization

Oocytes were collected from cows by aspiration of follicles (<8 mm) on days 2, 24, 45, and 66. There was no impact of intrauterine infusion on the total number of oocytes collected (vehicle: $n = 438$, vs. bacteria: $n = 493$; $P > 0.05$). There was variability in the number of oocytes (range 1 to 26) collected from each cow at any given time point, with an average of 10.7 ± 1.0 oocytes collected from vehicle-infused cows and 10.7 ± 0.9 oocytes collected from bacteria-infused cows at each time point (Supplementary Figure 1). Following IVF, the overall cleavage rate of oocytes on day 3.5 postfertilization was

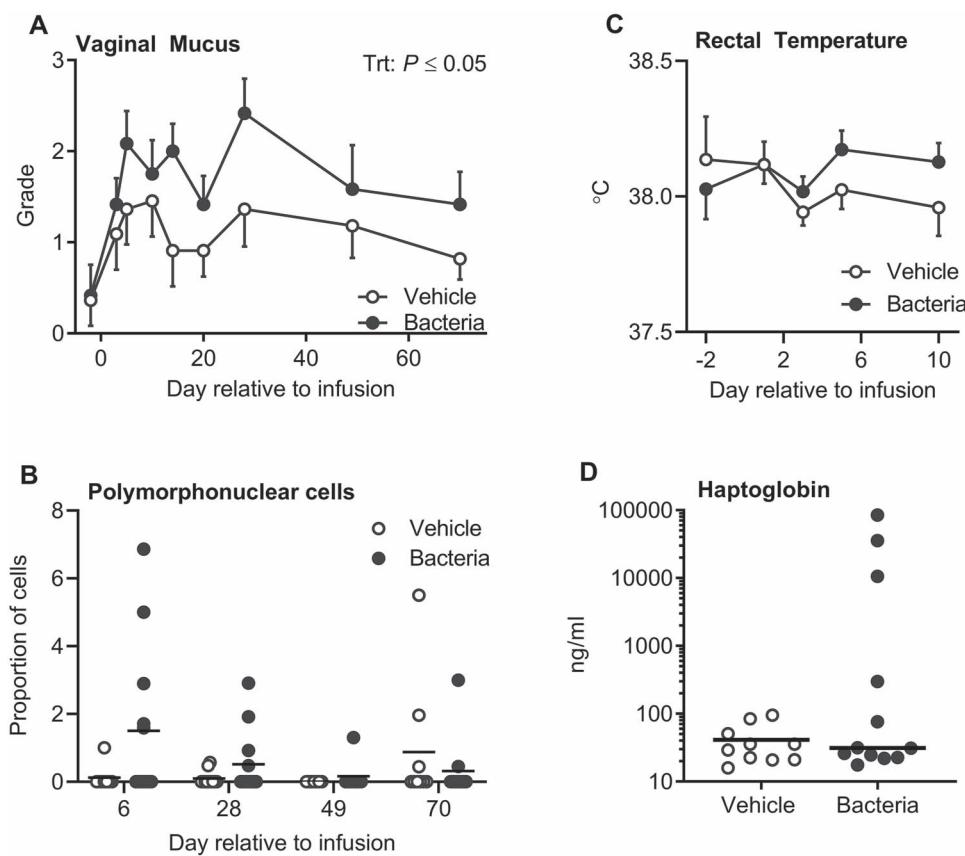


Figure 2. Establishment and quantification of uterine disease. Vaginal mucus (A) was collected and graded on a scale of 0 to 4 based on the presence of mucopurulent discharge. Data are the mean grade \pm SEM. The proportion of polymorphonuclear cells in cytological samples (B) was assessed in a total of 200 cells per cow. Each dot represents a cow and the solid line represents the mean. Rectal temperatures (C) are displayed as mean \pm SEM. Plasma haptoglobin (D) was evaluated on day 5 relative to infusion, and each dot represents an individual cow and the solid line represents the mean.

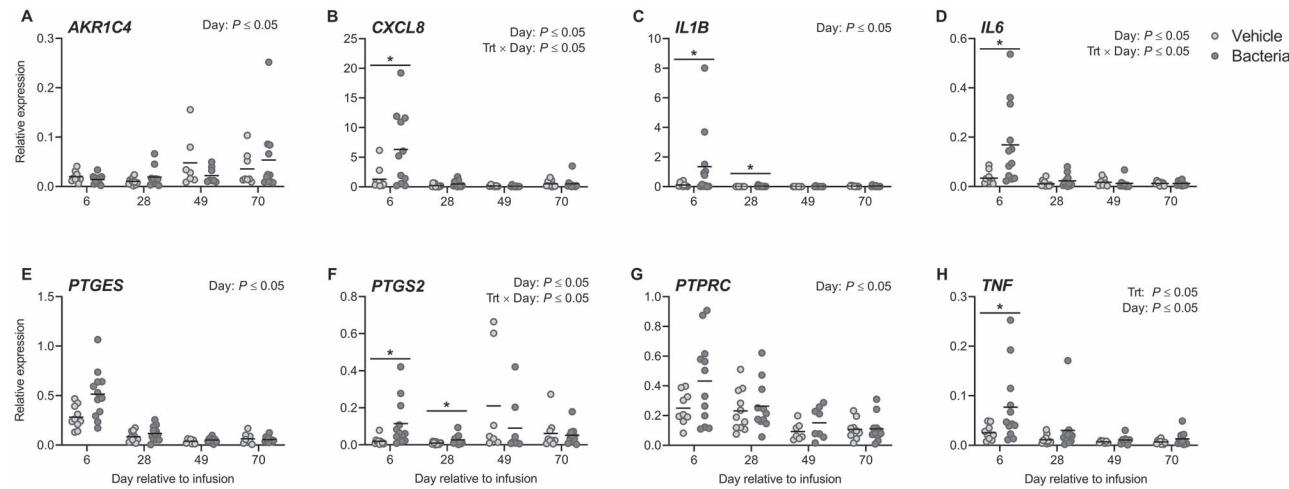


Figure 3. Endometrial expression of inflammatory mediators following intrauterine infusion. Expression of *AKR1C4* (A), *CXCL8* (B), *IL1B* (C), *IL6* (D), *PTGES* (E), *PTGS2* (F), *PTPRC* (G), and *TNF* (H) in cytobrush samples was evaluated by real-time RT-PCR. Data are presented as expression relative to *GAPDH*. Each dot represents a single cow and the solid line indicates the mean. Comparisons between treatments at a given day are indicated by * when $P \leq 0.05$.

$62.9 \pm 2.2\%$ (Figure 4A), and there was no difference in oocyte cleavage rate between treatment groups (bacteria: $63.5 \pm 3.3\%$, vehicle: $62.3 \pm 3.0\%$, respectively; $P > 0.05$). However, the day of oocyte collection affected ($P < 0.05$) the rate of oocyte cleavage,

resulting in an increased rate of oocyte cleavage in the bacteria-infused group compared to vehicle infusion on day 2 (68.7 ± 8.4 and $53.1 \pm 4.6\%$, respectively; $P \leq 0.05$). The overall proportion of oocytes to develop to morulae was $24.3 \pm 1.7\%$ (Figure 4B),

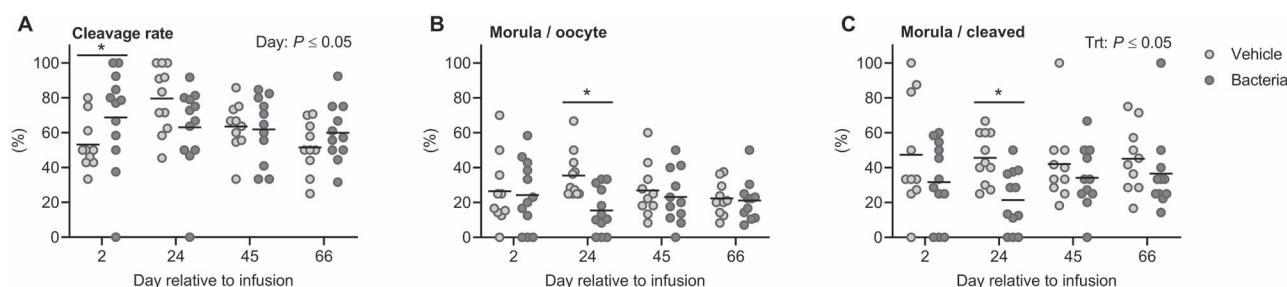


Figure 4. Effect of intrauterine infusion on developmental capacity of oocytes following in vitro fertilization and embryo culture. Oocytes were collected via ultrasound-guided transvaginal oocyte pickup on days 2, 24, 45, and 66 relative to infusion of either LB broth vehicle medium (vehicle; $n = 11$) or pathogenic *E. coli* and *T. pyogenes* in LB broth (bacteria; $n = 12$) and subjected to in vitro fertilization and embryo culture. Pooled oocytes from each cow were maintained as an individual replicate throughout insemination and culture. Each dot represents an individual cow, and the solid line represents the mean of the treatment. The proportion of oocytes that cleaved 3.5 days post-insemination (A), the proportion of oocytes to develop to morulae 6 days post-insemination (B), and the proportion of cleaved oocytes to develop to morulae 6 days post-insemination (C) are shown. Comparisons between treatments on a specific day are indicated by * when $P \leq 0.05$.

whereas the overall proportion of cleaved oocytes to develop to morulae was $37.5 \pm 2.4\%$ (Figure 4C). The proportion of oocytes that developed to morulae was not affected by bacterial infusion, day of oocyte collection, or the interaction between the two (Figure 4B). However, oocytes collected from bacteria-infused cows on day 24 had a reduced capacity to develop to morulae compared to those collected from vehicle-infused cows (15.5 ± 3.8 and $35.4 \pm 4.0\%$, respectively; $P \leq 0.05$). Bacterial infusion reduced the overall proportion of cleaved oocytes to develop to morulae compared to vehicle infusion (30.7 ± 3.0 and $45.0 \pm 1.1\%$, respectively; $P \leq 0.05$; Figure 4C). Specifically, bacterial infusion reduced the proportion of cleaved oocytes to develop to morulae day 24 compared to vehicle infusion (21.4 ± 5.0 and $45.6 \pm 4.4\%$, respectively; $P \leq 0.05$).

Markers of embryo quality were assessed by real-time RT-PCR using pooled morulae derived from a single cow at a single time point (Figure 5). Genes related to stress response (*HSPA1A*), growth factor signaling and metabolism (*IGF2R*, *SLC2A1*), apoptosis (*BAX*, *BCL2*), and DNA methylation (*DNMT3A*) were analyzed. Bacterial infusion did not significantly alter the expression of any genes related to embryo quality ($P > 0.05$; Figure 5A–F). The expression of *HSPA1A* increased 112% in morulae developed from bacteria-infused cows compared to vehicle-infused cows ($P = 0.08$; Figure 5D). Day of oocyte collection affected expression of *BAX* and *DNMT3A* ($P \leq 0.05$; Figure 5A and C). The expression of *BAX* on days 2 and 24 was different from days 45 and 66. *DNMT3A* expression was different on day 45 compared to days 24 and 66.

The association between morula development of cleaved embryos and endometrial expression of inflammatory mediators on day 6 was evaluated for all cows (Figure 6). There was a negative association between endometrial expression of *IL6* and the capacity of cleaved oocytes to develop to morulae ($P \leq 0.05$, $r^2 = 0.05$; Figure 6C). There was no association between endometrial expression of *CXCL8*, *IL1B*, *PTGES*, *PTGS2*, or *TNF* and the capacity of cleaved oocytes to develop to morulae ($P > 0.05$; Figure 6A, B, and D–F).

Effect of intrauterine infusion on in vivo embryo development

Cows were inseminated on day 130, following estrous synchronization (Figure 1). Sixteen days post-insemination, cows were euthanized, and uterine contents were collected by uterine flushing. Hot hanging carcass weights for vehicle- and bacteria-infused cows were

not different (363.9 ± 6.6 versus 368.9 ± 8.0 kg, respectively; $P > 0.05$), and total reproductive tract weights were not different between treatments (vehicle: 466 ± 16 g, vs. bacteria: 449 ± 17 g; $P > 0.05$). A corpus luteum was present in all cows at euthanasia indicating a positive response to synchronization (corpus luteum diameter was 22.6 ± 0.8 and 22.5 ± 0.5 mm in vehicle- and bacteria-infused cows, respectively, $P > 0.05$). A total of 12 filamentous embryos (vehicle = 6 of 11, bacteria = 6 of 12) were recovered 16 days following insemination (Figure 7A). It was not possible to measure the length of each conceptus due to fragmentation. Interferon tau was measured in all uterine fluid samples and was detected in 17 of 23 samples (vehicle = 8 of 11, bacteria = 9 of 12). Uterine fluid IFNT concentrations ranged from 0.086 to 6858 ng/mL and were not different between bacteria-infused cows and vehicle-infused cows ($P > 0.05$, Figure 7B). There was no effect of infusion on serum progesterone on day 15 post-insemination ($P > 0.05$; Figure 7C), 1 day prior to euthanasia. There was no significant effect of infusion on the serum AMH concentration from –2 to 145 days ($P > 0.05$; Figure 7D). There was no effect of infusion on trophectoderm expression of *CDKN1C*, *IFNT2*, or *PPARG* in day 16 embryos ($P > 0.05$; Figure 8).

Discussion

Infertility persists after resolution of uterine infections [1, 2, 15]. Women and cows previously diagnosed with uterine infection have lower conception rates compared to healthy counterparts [2, 13]. However, the culprit behind uterine infection-associated infertility remains elusive. Uterine infection alters the uterine environment and ovarian function [11, 27]. In order to determine the impact of uterine infection on the oocyte, the present study tested the hypothesis that endometritis reduces the capacity of the oocyte to develop to an embryo independent of a perturbed uterine environment. Our experiment successfully induced endometritis in non-lactating cows, and we found a reduction in the capacity of oocytes to develop to the morula stage during in vitro fertilization and culture. These findings demonstrate that uterine infection leaves a long-term impact on oocytes, even after clearance of infection.

The oocyte has been shown to have a greater influence on future blastocyst development when compared to culture conditions or the contribution of sperm [28]. We successfully collected oocytes

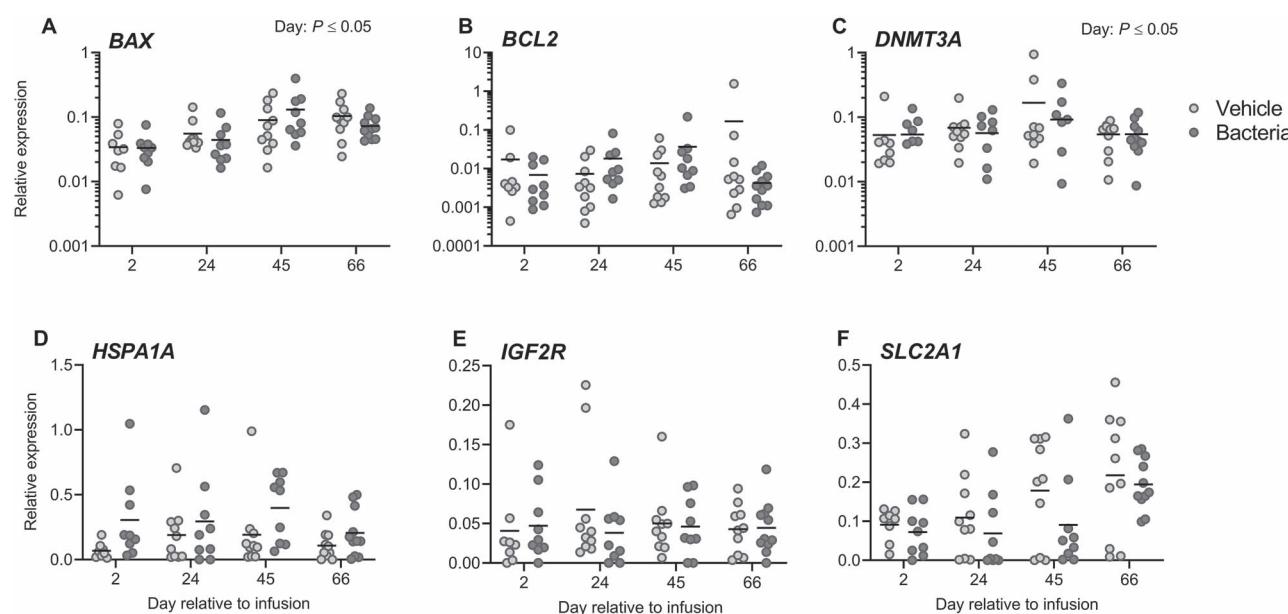


Figure 5. Effect of intrauterine infusion on gene expression of IVF derived morula stage embryos. Morula stage embryos derived by oocyte pickup, in vitro fertilization, and embryo culture from cows receiving intrauterine infusion of either LB broth vehicle medium (vehicle; $n = 11$) or pathogenic *E. coli* and *T. pyogenes* in LB broth (bacteria; $n = 12$) were probed for gene expression of *BAX* (A), *BCL2* (B), *DNMT3A* (C), *HSPA1A* (D), *IGF2R* (E) and *SLC2A1* (F) by real-time RT-PCR. Data are presented as expression relative to the geometric mean of the housekeeping genes *GAPDH*, *SDHA*, and *RLP19*. Each dot represents the average expression for an individual cow, and the solid line represents the mean of the treatment.

from all cows, and there was no impact of uterine infection on the number of oocytes recovered or the fertilization rate; however, there was variability in the number of oocytes collected from each cow, but this was corrected for when assessing developmental competence using our statistical approach. Overall, fewer cleaved putative zygotes developed to morulae when oocytes were collected from bacteria-infused cows. Thus, even though cleavage rates were elevated in oocytes collected from cows 2 days after bacterial infusion, the relative ability to continue development to morulae was reduced compared to vehicle-infused cows. The largest reduction in developmental competence was observed when oocytes were collected 24 days following bacterial infusion, after endometrial inflammation was resolved. Bovine follicular development takes between 120 and 200 days, with approximately 42 days between antrum formation and ovulation [29]. All oocytes collected for in vitro fertilization and embryo culture were collected at the small antral follicle stage (<8 mm), 4 days after dominant follicle ablation, and approximately 20 days prior to potential ovulation. Thus, the timeline of follicular development indicates that small antral follicles aspirated from day 24 onwards would have likely been at the secondary stage of follicle development at the time of intrauterine infusion. Oocytes collected on day 24 were likely in the process of antrum formation at the time of uterine infusion. Oocytes collected on day 45 or 66 would have been earlier secondary stage follicles at the time of uterine infusion. While embryo development was numerically reduced on days 45 and 66, the enhanced reduction of developmental competence on day 24 suggests that specific stages of follicles are more susceptible to damage by uterine infection. Recovery from infertility following endometritis may simply require an extended period to clear negatively affected oocytes/follicles. However, spontaneous metritis causes altered transcription in granulosa cells of dominant follicles 63 days postpartum [17] and thus

may require a longer period to recover oocyte health. The induction of bacterial uterine infection in isolation from other postpartum complications used here potentially underestimates the detrimental impact of spontaneous uterine infection on the oocyte.

In parallel, these studies established endometritis in healthy non-lactating cows. It is unclear if infertility in cows is mediated solely by uterine infection or if the confounding demands of lactation and other postpartum diseases also impact oocyte quality. We have previously established an experimental disease model comparable to clinical endometritis in virgin Holstein heifers by intrauterine infusion of pathogenic *E. coli* and *T. pyogenes* isolated from cows with active metritis [22, 24, 25]. In this model, cattle do not exhibit a systemic response to uterine infection, lacking pyrexia, but do display purulent vaginal discharge [22]. In this experiment, increased endometrial inflammation, characterized by increased expression of pro-inflammatory genes, occurred within 1 week of bacterial infusion and was resolved within 4 weeks. In addition, bacteria-infused cows had elevated vaginal mucus grade compared to vehicle-infused cows. Previous studies have demonstrated that other, nonreproductive diseases are detrimental to dairy cow fertility. Mastitis alters endocrine function and ovarian cyclicity, in addition to increasing the time to conception [30, 31]. Oocytes collected from dairy cows with mastitis are less likely to develop to a blastocyst compared to oocytes isolated from healthy cows [32], whereas lame cows have increased occurrence of ovarian cysts and a decreased ability to conceive compared to non-lame cows [33]. In general, cows diagnosed with one disease in the postpartum period, regardless if it is classified as uterine or non-uterine, have a reduced likelihood to conceive and an increased incidence of abortion [8, 15].

The mechanisms by which uterine infection reduces developmental competence of oocytes are unclear. Transfer of a healthy embryo into a cow with previous uterine infection does not resolve the

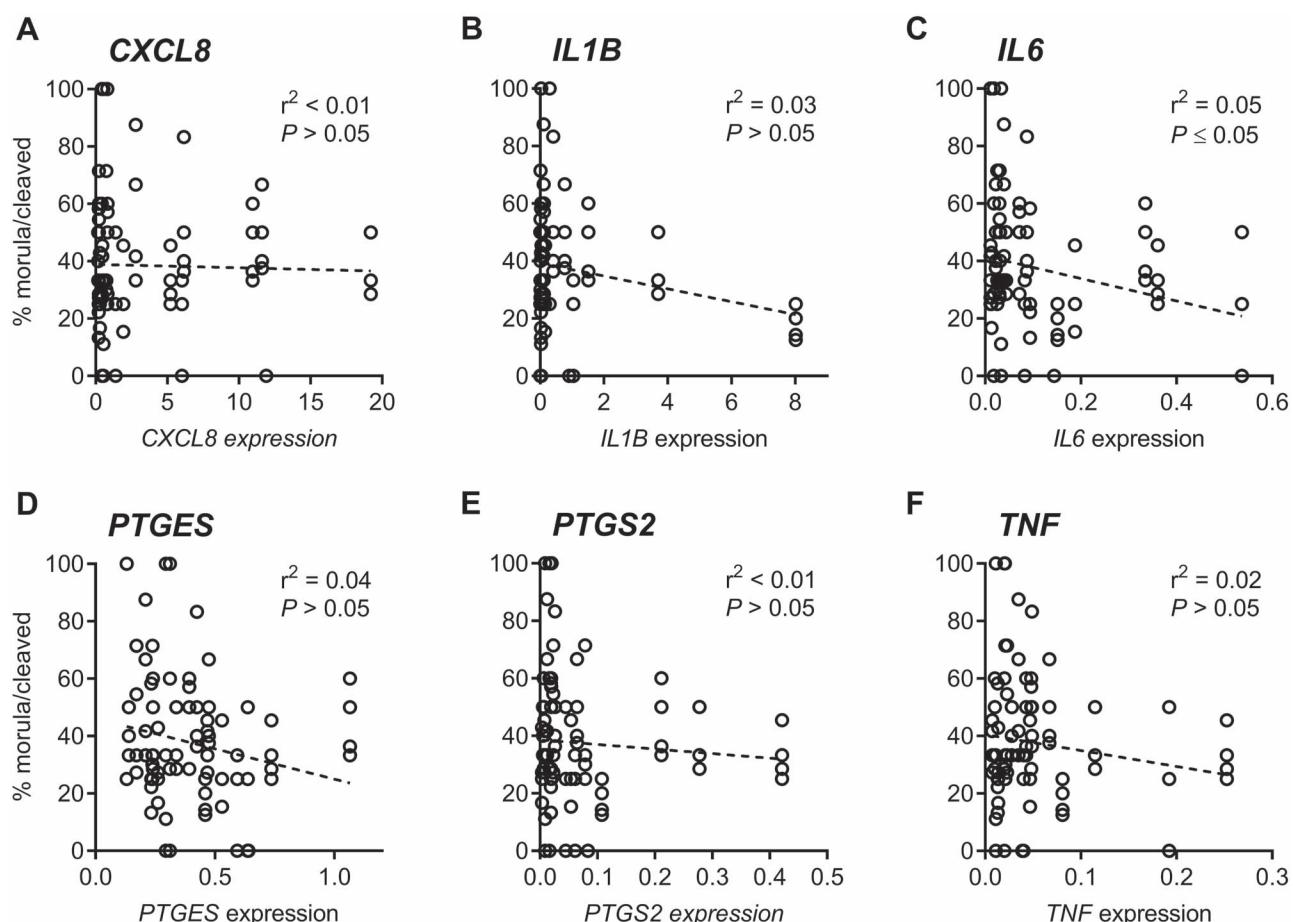


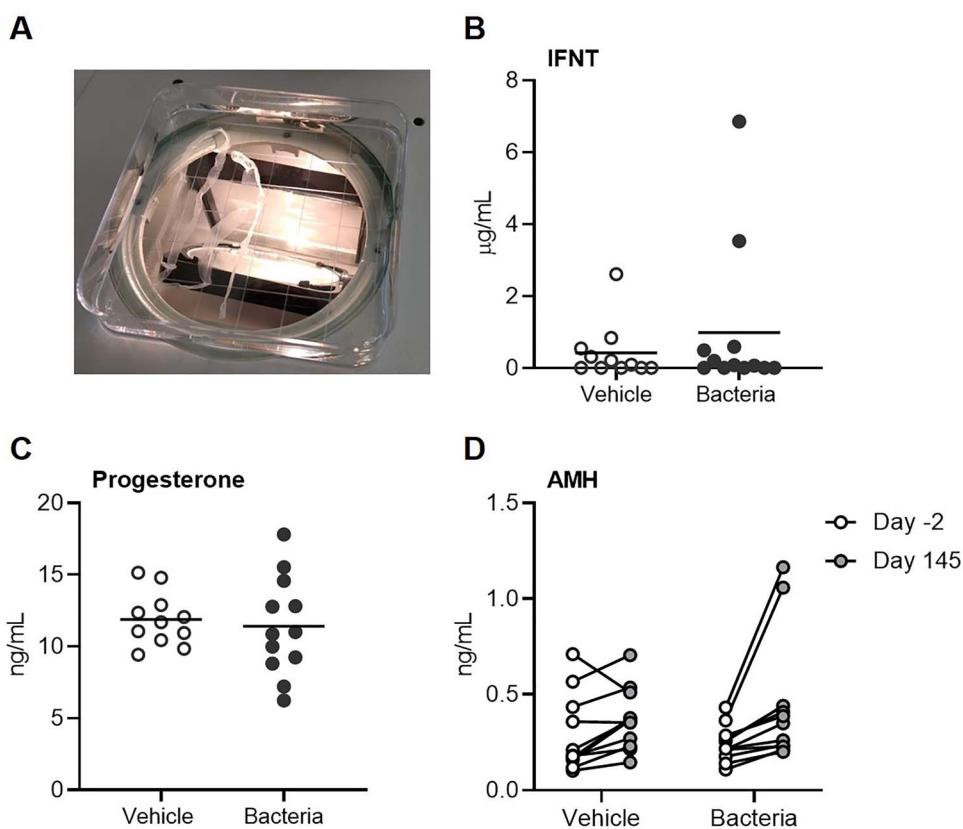
Figure 6. Association between morula development and endometrial inflammation. Endometrial expression of CXCL8 (A), IL1B (B), IL6 (C), PTGES (D), PTGS2 (E), and TNF (F) was determined by real-time RT-PCR on day 6 relative to infusion. Linear correlation was performed using the total proportion of cleaved oocytes to develop to morulae from all cows.

negative impact of disease on fertility [8], suggesting that the uterus is in part responsible for infection-associated infertility. Herein, the inverse association between the degree of endometrial inflammation on day 6 of infection with reduced embryo development may be associated with inflammatory signals from the uterus that alter oocyte developmental competence either directly or by altering endocrine signaling to the ovary [34]. In vitro, bacterial LPS stimulates expression of inflammatory mediators by granulosa cells via the toll-like receptor 4 pathway [19], whereas bacterial LPS accumulates in the follicular fluid of cows with uterine infection and alters the follicular environment up to 63 days postpartum [17]. Similarly, exposure of oocytes to LPS during in vitro maturation reduces meiotic competence, increases reactive oxygen and apoptosis, and alters DNA methylation patterns of oocytes [19, 35]. It is unclear if cell wall components of Gram-positive bacteria are present in follicular fluid of cows with uterine disease or if these components effect oocyte competence. In parallel, uterine infection in these experiments may also disrupt hypothalamic-pituitary axis signaling, reducing GnRH and LH secretion which could negatively impact the growth and development of small follicles [36]; however hormonal signaling was not evaluated in the present study.

Embryo quality in those oocytes that could develop to morulae, as well as the ability of the cows to conceive following insemination, was examined. We selected a specific subset of genes to analyze known to be indicators of embryo quality [37]. Embryo

development was halted at the morula stage in order to sample a homogeneous cell population instead of blastocyst embryos where treatment could affect the allocation of trophectoderm and inner cell mass cells, possibly confounding gene expression. Genes were chosen based on their function, including metabolism, measured by glucose transporter (GLUT1); stress, measured by heat shock protein 70 (HSPA1A); apoptosis, measured by BAX and BCL2; DNA methylation, measured by DNMT3A; and growth factor signaling, measured by insulin-like growth factor 2 receptor (IGF2R). In morulae derived from bacteria-infused cows, HSPA1A expression was elevated. Environmental stressors, such as heat stress, can increase HSPA1A gene expression in bovine embryos, even prior to embryonic genome activation implying altered expression is driven by maternal mRNA present in the oocyte [38]. Additionally, loss of function in the maternally inherited IGF2R gene results in developmental abnormalities, including large offspring syndrome [39, 40]. Conversely, increased IGF-2 signaling increases embryo development in vitro [41, 42]. It is important to note that embryo quality was assessed using a targeted approach with in vitro-produced embryos; thus, we cannot exclude the possibility that other factors important in embryo progression are altered as a result of uterine infection or that the uterine environment may aid in the recovery of perturbed embryos.

Finally, the effect of prior uterine infection on the health of embryos conceived by insemination was assessed. All recovered embryos on day 16 of pregnancy were filamentous. Our sample size



here is small in terms of number of inseminations, and therefore, there is insufficient statistical power to make conclusions regarding the impact of experimental uterine infection on conception rate. Of embryos recovered, we did not observe an effect of infusion on trophectoderm expression of cell cycle regulation (*CDKN1C*), peroxisome proliferator-activated receptor gamma (*PPARG*), or interferon tau (*IFNT2*). The lack of difference in gene expression in recovered embryos is not surprising as these genes are critical to embryogenesis [43–45]; however, our results may be biased as we could only test embryos recovered at flushing which may exclude embryos that failed to develop earlier. Maternal recognition of pregnancy in the cow is driven by trophectoderm secretion of IFNT starting as early as the blastocyst [45, 46]. Here, the number of uterine flush samples with detectable IFNT was greater than the number of cows where an embryo was collected, suggesting that several embryos were not recovered due to technical error or that embryo development failed prior to collection on day 16. Regardless of the discrepancy, the rate at which embryo recovery and IFNT detection differed was similar between treatments based on the number of cows used here. Previous studies have demonstrated that uterine disease reduces IFNT concentration in uterine fluid [8], whereas we did not find any observable effect of bacterial infusion on IFNT concentration in uterine fluid on day 16 of pregnancy. It is important to note however that the method of IFNT quantification and variation of values reported are not consistent between experiments in the literature. Previous studies have used antiviral assays [8], RNA sequencing [47], or the same ELISA used here [48]. It is also unclear as to the minimum concentration of IFNT required for maternal recognition of pregnancy in the cow [49] or the best day or days to test for pregnancy status based on IFNT. However, it is believed that reduced IFNT secretion reflects poorer embryo quality and reduces pregnancy success.

In conclusion, intrauterine infusion of pathogenic bacteria to induce endometritis in dairy cows reduces the capacity of oocytes to develop to morulae. These novel findings demonstrate that uterine infection has a detrimental impact on the oocyte weeks after the occurrence of infection. These data aid in our understanding of the mechanisms of uterine infection-associated infertility in dairy cows and potentially women with reproductive tract infection or pelvic inflammatory disease. Future studies are required to determine the specific mechanism by which uterine disease diminishes oocyte quality.

Supplementary Material

Supplementary Material is available at BIOLRE online.

Acknowledgments

The authors would like to thank Tod Pritchard, Miguel Torrado Vazquez, and the staff of the University of Florida Dairy Research Unit.

Conflict of interest

The authors have declared that no conflict of interest exists.

References

- Sheldon IM, Cronin J, Goetze L, Donofrio G, Schuberth H-J. Defining postpartum uterine disease and the mechanisms of infection and immunity in the female reproductive tract in cattle. *Biol Reprod* 2009; 81:1025–1032.
- Tsevat DG, Wiesenfeld HC, Parks C, Peipert JF. Sexually transmitted diseases and infertility. *Am J Obstet Gynecol* 2017; 216:1–9.
- Centers for Disease Control and Prevention. *Sexually Transmitted Disease Surveillance 2017*. Atlanta: U.S. Department of Health and Human Services; 2018. doi: 10.15620/cdc.59237.
- Kreisel K, Torrone E, Bernstein K, Hong J, Gorwitz R. Prevalence of pelvic inflammatory disease in sexually experienced women of reproductive age — United States, 2013–2014. *Morb Mortal Wkly Rep* 2017; 66: 80–83.
- Deb K, Chaturvedi MM, Jaiswal YK. Comprehending the role of LPS in gram-negative bacterial vaginosis: Oging into the causes of unfulfilled child-wish. *Arch Gynecol Obstet* 2004; 270:133–146.
- Owusu-Edusei K, Chesson HW, Gift TL, Tao G, Mahajan R, Ocfemia MCB, Kent CK. The estimated direct medical cost of selected sexually transmitted infections in the United States, 2008. *Sex Transm Dis* 2013; 40:197–201.
- Dohmen MJW, Joop K, Sturk A, Bols PEJ, Lohuis JACM. Relationship between intra-uterine bacterial contamination, endotoxin levels and the development of endometritis in postpartum cows with dystocia or retained placenta. *Theriogenology* 2000; 54:1019–1032.
- Ribeiro ES, Gomes G, Greco LF, Cerri RLA, Vieira-Neto A, Monteiro PLJ, Lima FS, Bisinotto RS, Thatcher WW, Santos JEP. Carryover effect of postpartum inflammatory diseases on developmental biology and fertility in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 2016; 99:2201–2220.
- Lima FS, Snodgrass JA, De Vries A, Santos JEP. Economic comparison of systemic antimicrobial therapies for metritis in dairy cows. *J Dairy Sci* 2019; 102:7345–7358.
- Opsomer G, Gröhn YT, Hertl J, Coryn M, Deluyker H, De Kruif A. Risk factors for post partum ovarian dysfunction in high producing dairy cows in Belgium: A field study. *Theriogenology* 2000; 53:841–857.
- Sheldon IM, Noakes DE, Rycroft AN, Pfeiffer DU, Dobson H. Influence of uterine bacterial contamination after parturition on ovarian dominant follicle selection and follicle growth and function in cattle. *Reproduction* 2002; 123:837–845.
- Ribeiro ES, Lima FS, Greco LF, Bisinotto RS, Monteiro APA, Favoreto M, Ayres H, Marsola RS. Prevalence of periparturient diseases and effects on fertility of seasonally calving grazing dairy cows supplemented with concentrates. *J Dairy Sci* 2013; 96:5682–5697.
- Borsberry S, Dobson H. Periparturient diseases and their effect on reproductive performance in five dairy herds. *Vet Rec* 1989; 124:217–219.
- LeBlanc SJ, Duffield TF, Leslie KE, Bateman KG, Keefe GP, Walton JS, Johnson WH. Defining and diagnosing postpartum clinical endometritis and its impact on reproductive performance in dairy cows. *J Dairy Sci* 2002; 85:2223–2236.
- Santos JEP, Bisinotto RS, Ribeiro ES, Lima FS, Greco LF, Staples CR, Thatcher WW. Applying nutrition and physiology to improve reproduction in dairy cattle. *Soc Reprod Fertil Suppl* 2010; 67:387–403.
- Sheldon IM, Cronin JG, Bromfield JJ. Tolerance and innate immunity shape the development of postpartum uterine disease and the impact of endometritis in dairy cattle. *Annu Rev Anim Biosci* 2019; 7:361–384.
- Piersanti RL, Horlock AD, Block J, Santos JEP, Sheldon IM, Bromfield JJ. Persistent effects on bovine granulosa cell transcriptome after resolution of uterine disease. *Reproduction* 2019; 158:35–46.
- Herath S, Williams EJ, Lilly ST, Gilbert RO, Dobson H, Bryant CE, Sheldon IM. Ovarian follicular cells have innate immune capabilities that modulate their endocrine function. *Reproduction* 2007; 134:683–693.
- Bromfield JJ, Sheldon IM. Lipopolysaccharide initiates inflammation in bovine granulosa cells via the TLR4 pathway and perturbs oocyte meiotic progression in vitro. *Endocrinology* 2011; 152:5029–5040.
- Britt JH, Cushman RA, Dechow CD, Dobson H, Humblot P, Hutjens MF, Jones GA, Ruegg PS, Sheldon IM, Stevenson JS. Invited review: Learning from the future—A vision for dairy farms and cows in 2067. *J Dairy Sci* 2018; 101:3722–3741.
- Zuckerman S. The number of oocytes in the mature ovary. *Recent Prog Horm Res* 1951; 6:63–109.

22. Piersanti RL, Zimpel R, Molinari PCC, Dickson MJ, Ma Z, Jeong KC, Santos JEP, Sheldon IM, Bromfield JJ. A model of clinical endometritis in Holstein heifers using pathogenic Escherichia coli and Trueperella pyogenes. *J Dairy Sci* 2019; 102:2686–2697.
23. Souza AH, Ayres H, Ferreira RM, Wiltbank MC. A new presynchronization system (double-Ovsynch) increases fertility at first postpartum timed AI in lactating dairy cows. *Theriogenology* 2008; 70:208–215.
24. Goldstone RJ, Amos M, Talbot R, Schuberth H-J, Sandra O, Sheldon IM, Smith DGE. Draft genome sequence of Escherichia coli MS499, isolated from the infected uterus of a postpartum cow with metritis. *Genome Announc* 2014; 2:e00217-e00214.
25. Goldstone RJ, Amos M, Talbot R, Schuberth H-J, Sandra O, Sheldon IM, Smith DGE. Draft genome sequence of Trueperella pyogenes, isolated from the infected uterus of a postpartum cow with metritis. *Genome Announc* 2014; 2:e00194-e00114.
26. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT. The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 2009; 55:611–622.
27. Herath S, Lilly ST, Fischer DP, Williams EJ, Dobson H, Bryant CE, Sheldon IM. Bacterial lipopolysaccharide induces an endocrine switch from prostaglandin F2 α to prostaglandin E2 in bovine endometrium. *Endocrinology* 2009; 150:1912–1920.
28. Rizos D, Ward F, Duffy P, Boland MP, Lonergan P. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: Implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Mol Reprod Dev* 2002; 61:234–248.
29. Lussier JG, Matton P, Dufour JJ. Growth rates of follicles in the ovary of the cow. *J Reprod Fertil* 1987; 81:301–307.
30. Moore DA, Cullor JS, Bondurant RH, Sischo WM. Preliminary field evidence for the association of clinical mastitis with altered interestrus intervals in dairy cattle. *Theriogenology* 1991; 36:257–265.
31. Santos JEP, Cerri RL, Ballou MA, Higginbotham GE, Kirk JH. Effect of timing of first clinical mastitis occurrence on lactational and reproductive performance of Holstein dairy cows. *Anim Reprod Sci* 2004; 80:31–45.
32. Roth Z, Dvir A, Kalo D, Lavon Y, Krifucks O, Wolfenson D, Leitner G. Naturally occurring mastitis disrupts developmental competence of bovine oocytes. *J Dairy Sci* 2013; 96:6499–6505.
33. Melendez P, Bartolome J, Archbald LF, Donovan A. The association between lameness, ovarian cysts and fertility in lactating dairy cows. *Theriogenology* 2003; 59:927–937.
34. Herath S, Fischer DP, Werling D, Williams EJ, Lilly ST, Dobson H, Bryant CE, Sheldon IM. Expression and function of toll-like receptor 4 in the endometrial cells of the uterus. *Endocrinology* 2006; 147:562–570.
35. Zhao SJ, Pang YW, Zhao XM, Du WH, Hao HS, Zhu HB. Effects of lipopolysaccharide on maturation of bovine oocyte in vitro and its possible mechanisms. *Oncotarget* 2017; 8:4656–4667.
36. Haziak K, Herman AP, Tomaszewska-Zaremba D. Effects of central injection of anti-LPS antibody and blockade of TLR4 on GnRH/LH secretion during immunological stress in anestrous ewes. *Mediators Inflamm* 2014; 2014:1–10.
37. Sagirkaya H, Misirlioglu M, Kaya A, First NL, Parrish JJ, Memili E. Developmental and molecular correlates of bovine preimplantation embryos. *Reproduction* 2006; 131:895–904.
38. Edwards JL, Ealy AD, Monterroso VH, Hansen PJ. Ontogeny of temperature-regulated heat shock protein 70 synthesis in preimplantation bovine embryos. *Mol Reprod Dev* 1997; 48:25–33.
39. Barlow DP, Stoger R, Herrmann BG, Saitot K, Schweifer N. The mouse insulin-like growth factor type-2 receptor is imprinted and closely linked to the Tme locus. *Nature* 1991; 349:84–87.
40. Young LE, Fernandes K, McEvoy TG, Butterwith SC, Gutierrez CG, Carolan C, Broadbent PJ, Robinson JJ, Wilmut I, Sinclair KD. Epigenetic change in IGF2R is associated with fetal overgrowth after sheep embryo culture. *Nat Genet* 2001; 27:153–154.
41. Gicquel C, Le Bouc Y. Hormonal regulation of fetal growth. *Horm Res* 2006; 65:28–33.
42. DeChiara TM, Efstratiadis A, Roberts EJ. A growth-deficiency phenotype in heterozygous mice carrying an insulin-like growth factor II gene disrupted by targeting. *Nature* 1990; 345:78–80.
43. Zhang P, Liégeois NJ, Wong C, Finegold M, Hou H, Thompson JC, Silverman A, Harper JW, DePinho RA, Elledge SJ. Altered cell differentiation and proliferation in mice lacking p57(KIP2) indicates a role in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Nature* 1997; 387: 151–158.
44. Ribeiro ES, Greco LF, Bisinotto RS, Lima FS, Thatcher WW, Santos JE. Biology of preimplantation conceptus at the onset of elongation in dairy cows. *Biol Reprod* 2016; 94:1–18.
45. Thatcher WW, Hansen PJ, Gross TS, Helmer SD, Plante C, Bazer FW. Antiluteolytic effects of bovine trophoblast protein-1. *J Reprod Fertil Suppl* 1989; 37:91–99.
46. Hernandez-Ledezma JJ, Sikes JD, Murphy CN, Watson AJ, Schultz GA, Roberts RM. Expression of bovine trophoblast interferon in conceptuses derived by in vitro techniques. *Biol Reprod* 1992; 47: 374–380.
47. Mamo S, Mehta JP, Forde N, McGettigan P, Lonergan P. Conceptus-endometrium crosstalk during maternal recognition of pregnancy in cattle. *Biol Reprod* 2012; 87:1–9.
48. Tríbulo P, Rabaglino MB, Bo MB, Carvalheira L D R, Bishop JV, Hansen TR, Hansen PJ. Dickkopf-related protein 1 is a progesteromedin acting on the bovine embryo during the morula-to-blastocyst transition to program trophoblast elongation. *Sci Rep* 2019; 9: 11816.
49. Hansen TR, Sinedino LDP, Spencer TE. Paracrine and endocrine actions of interferon tau (IFNT). *Reproduction* 2017; 154:F45–F59.

Effect of porcine reproductive and respiratory syndrome virus 2 on angiogenesis and cell proliferation at the maternal-fetal interface

Veterinary Pathology

2022, Vol. 59(6) 940–949

© The Author(s) 2022



Article reuse guidelines:

sagepub.com/journals-permissions

DOI: 10.1177/0300985821105053

journals.sagepub.com/home/vet

Javier A. Barrera-Zarate¹, Susan E. Detmer¹, J. Alex Pasternak², Glenn Hamonic¹, Daniel J. MacPhee¹, and John C. S. Harding¹

Abstract

Angiogenesis and cell proliferation in reproductive tissues are essential events for the maintenance of pregnancy, and alterations can lead to compromised fetal development and survival. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus 2 (PRRSV-2) induces reproductive disease with negative financial and production impact on the swine industry. PRRSV-2 infection alters placental physiology through inflammatory and apoptotic pathways, yet fetal susceptibility varies. This study aimed to evaluate angiogenesis and cell proliferation in the porcine maternal-fetal interface (MFI) and determine if these physiological processes were altered by PRRSV-2 infection. Thirty-one pregnant gilts were inoculated with PRRSV-2 at gestation day 86 ± 0.4 (mean \pm SD). Seven control gilts were sham-inoculated. All gilts were euthanized at 12 days postinoculation. Angiogenesis and cell proliferation were determined through the detection of vascular endothelial growth factor (VEGF) and Ki-67, respectively, using immunofluorescence of the MFI from 4 fetal resilience groups: uninfected (UNIF), high viral load–viable (HVL-VIA), and HVL-meconium-stained (MEC) from PRRSV-infected gilts, as well from sham-inoculated (CON) gilts. VEGF immunolabeling in the uterine submucosa was significantly lower in MEC compared with UNIF and HVL-VIA groups. Significantly greater Ki67 immunolabeling was detected in the trophoblasts of CON fetuses versus all other groups, and in uterine epithelium of CON and UNIF fetuses versus HVL-VIA and MEC. These results suggest that fetal resilience may be related to greater cell proliferation in uterine epithelium, and fetal compromise with reduced uterine submucosal angiogenesis, except fetuses with intrauterine growth restriction, in which inherently lower submucosal angiogenesis may be protective against PRRSV infection.

Keywords

angiogenesis, PRRSV, maternal-fetal interface, fetomaternal junction, swine, fetus, disease resilience, intrauterine growth restriction

Porcine reproductive and respiratory syndrome virus 2 (PRRSV-2) (*Betaarterivirus suis 2*) causes disease characterized by reproductive failure and interstitial pneumonia in growing pigs and is considered one of the most significant viral pathogens in pig production due to economic and production losses in breeding and feeding herds.^{17,29,44} Reproductive losses are primarily due to late-term abortions and fetal death, but also include birth of stillborn and weak congenitally infected piglets, as well as infertility.^{22,27,43} The growing pig losses are primarily associated with the role that PRRSV-2 plays in the porcine respiratory disease complex that leads to increased nursery mortality and morbidity.²⁹ Moreover, PRRSV-2 is a profoundly immunosuppressive virus, exerting effects on both the innate and adaptive responses.²⁴

Despite the severe reproductive disease caused by many PRRSV-2 strains, the cellular mechanisms used by the virus to compromise fetal survival during the last third of gestation have not been determined. Within days of maternal infection, the virus may cross the maternal-fetal interface (MFI; that is, the adherent uterine and fetal chorioallantois-allantochorion) to

infect fetuses by way of the umbilical circulation,^{26,42} but the timing of infection varies among fetuses within a litter, and some fetuses escape infection. Different phenotypic fetal categories related to preservation states and viral load have been established to investigate factors associated with fetal resilience. Fetal preservation is based on the viability and gross lesions of the fetus at the time of necropsy and classified as viable, meconium-stained (MEC), decomposed (recent death), and autolyzed (early death).^{22,26} PRRSV RNA concentration in fetal thymus, serum, and placenta varies between states of fetal preservation.²² Fetuses may be classified as high viral load

¹University of Saskatchewan, Saskatoon, SK, Canada

²Purdue University, West Lafayette, IN

Supplemental material for this article is available online.

Corresponding Author:

Susan E. Detmer, Department of Veterinary Pathology, Western College of Veterinary Medicine, University of Saskatchewan, 52 Campus Drive, Saskatoon, SK S7N 5B4, Canada.
Email: susan.detmer@usask.ca

(HVL), low viral load (LVL), or uninfected (UNIF). UNIF are fetuses from infected dams where viral RNA is not detected in serum or thymus of the fetus, which are therefore considered relatively resistant compared with their HVL cohorts.

Fetal compromise is likely associated with PRRSV-related events occurring at the MFI, within the fetus or a combination of the two. While critical physiological changes in the fetus including hypothyroidism,³⁴ cytokine expression,^{33,47} hypoxia and apoptosis,²⁵ and endocrine disruption are related to fetal compromise, the lesions in endometrium and placenta associated with PRRSV-2 infection may alter the normal transplacental nutritive and physiological processes essential for fetal growth and survival. The most consistent microscopic lesions in reproductive tissues associated with PRRSV-2 infection are inflammation and vasculitis in the endometrium^{30,32} as well as apoptosis in placental endothelial cells, uterine epithelial cells (UECs), and trophoblasts^{19,30,31} that historically have been considered important maternal factors contributing to reproductive failure.

The porcine fetomaternal junction (FMJ; including the interdigitating trophoblastic epithelium and uterine epithelium) continually remodels throughout pregnancy through processes of apoptosis, cell proliferation, and angiogenesis to maintain and support fetal development and survival.^{39,41,46} Given the extensive lesions in the MFI following PRRSV infection and the wide variation in fetal outcome, it is possible that alterations in angiogenesis and cell proliferation at the MFI also contribute to fetal outcome. This study aimed to evaluate angiogenesis and cell proliferation in the porcine MFI following maternal PRRSV-2 infection and to determine whether alterations in these processes were associated with variation in fetal resilience.

Materials and Methods

Animal Experimental and Sample Collection

Thirty-one pregnant purebred Landrace gilts were intramuscularly and intranasally inoculated with PRRSV-2 (NVSL 97-7895 propagated on MARC-145 cells; 1×10^5 TCID₅₀ total dose) on gestation day 86 ± 0.4 (mean \pm SD). At the same gestational stage, 7 pregnant control gilts (CON) were similarly sham-inoculated with sterile minimum essential media. All the gilts were euthanized by intravenous barbiturate overdose (Euthanyl Forte, 19,200 mg/gilt) and cranial captive bolt at 12 days postinfection. The study protocols have been described in detail,^{25,34} adhered to guidelines established by the Canadian Council on Animal Care, and were reviewed and approved by the University of Saskatchewan Animal Research Ethics Board (permit #20160023).

At necropsy, the gravid uterus was removed and fetuses counted sequentially based on their position in each horn (starting with L1/R1 at the tip of the left and right horns, respectively). The external fetal preservation status was assessed as viable (VIA; live with normal skin color), MEC (live and MEC on head and/or body), or decomposed (DEC; dead with pale skin \pm edema) as previously described.^{22,30} Fetuses were

subsequently weighed, sexed, and dissected. The weights of key organs including brain and liver were recorded and used to assess the proportionate growth of brain compared with liver as a proxy measure for intrauterine growth restriction (IUGR; high brain: liver weight ratio).^{2,22}

Sampling of the MFI was performed by cutting the uterine wall (full thickness) into rectangular samples (approximately 3×20 cm²). From the MFI associated with each fetus ($n = 516$), 3 samples were collected: centered on the umbilical stump (sample 1), 10 to 15 cm distant from the umbilical stump toward the ovary (sample 2), and 0 to 15 cm distant from the umbilical stump along the anti-mesometrial border (sample 3).²⁵ All samples were fixed in 10% buffered formalin, trimmed to 1-cm squares and processed routinely for hematoxylin and eosin staining. Histological analyses of these sections evaluating the severity of inflammation in the endometrium, placenta, and blood vessels was performed as previously described.³² Briefly, the inflammation scores in the endometrium and placenta were categorized as, score 0 for no inflammatory cell infiltrate in the tissues; score 1 for less than 10% of tissue section with inflammatory cell infiltrate; score 2 for 10% to 25% of tissue section; score 3 for 25% to 50% of tissue section; and score 4 for greater than 50% of tissue section with inflammatory cell infiltrate. Scores for inflammation within the vascular walls (vasculitis) in the endometrium and placenta were classified as score 0 for no vasculitis; score 1 for vasculitis in less than 30% of blood vessels; score 2 for 30% to 70%; and score 3 for greater than 70% of inflamed blood vessels in the tissue sections.

Assessment of Fetal Viral Load

Fetal viral load was evaluated by RT-qPCR as previously described in detail.^{22,25} Briefly, RNA was extracted from 140 µL of fetal sera using QIAamp Viral RNA mini kit and from 10 to 20 mg tissue (allantochorion and fetal thymus) using RNeasy extraction kit (Qiagen). A strain-specific probe-based protocol targeting open reading frame 7 (ORF7) with a 5-point standard curve ($10^7, 10^5, 10^3, 10^2, 10^1$) run in triplicate on each plate was used for quantification. Samples were run in duplicate in 96-well plates using corresponding positive controls. Viral concentration was reported as log₁₀ target copies per mg/µL tissue/sera. The limits of quantification were defined by the least and most concentrated standards, the lower limit being 2.2 log₁₀ per µL sera or mg tissue.

Fetal Classification

A classification system representative of disease progression³⁴ was used to select a subset of fetuses for further analysis. First, control fetuses were randomly selected from 7 CON gilts. From PRRSV-2-infected gilts, groups were selected as follows (Table 1): UNIF (live fetuses with nondetectable/negative PRRSV RT-qPCR [reverse transcriptase quantitative polymerase chain reaction] in fetal placenta, sera, and thymus), high viral load–viable (HVL-VIA: live fetus with >4.4 log₁₀ genome copies per mg/µL in placenta, sera, and thymus), and

Table I. Summary of median histologic lesion severity scores and PRRS viral load by fetal group.

Group	PRRS histological lesion scores (minimum/maximum)				PRRSV RNA concentration		
	Endometritis	Vasculitis endometrium	Placentitis	Vasculitis placenta	Placenta	Serum	Thymus
CON (n = 12)	0 ^a (0/0)	0 ^a (0/0.3)	0 ^a (0/0)	0 (0/0)	NA	NA	NA
UNIF (n = 10)	3.0 ^b (1.6/3.6)	2.6 ^b (1/3)	0 ^b (0/1.3)	0 (0/0)	0.0 ^a (0/0)	0.0 ^a (0/0)	0 ^a (0/1.3)
HVL-VIA (n = 10)	2.6 ^b (2/4)	1.8 ^b (1/3)	0.1 ^b (0/0.6)	0 (0/0)	6.8 ^b (4.4/9.1)	7.4 ^b (5.8/8.3)	5.6 ^b (4.8/6.6)
MEC (n = 13)	2.6 ^b (2/4)	2.1 ^b (0.3/3)	0.1 ^b (0/1.3)	0 (0/0)	7.1 ^b (6.0/8.5)	8.0 ^b (6.4/9.6)	5.8 ^b (3.6/6.2)
P value*	<.001	<.001	.04		<.001	<.001	<.001

Abbreviations: PRRSV, porcine reproductive and respiratory syndrome virus; CON, control; UNIF, uninfected fetuses from inoculated dams; HVL-VIA, high viral load–viable fetuses; MEC, high viral load–meconium-stained fetuses. Fetuses used for VEGF and Ki67 labeling were similar but not identical. NA—viral load not assessed CON fetuses. PRRSV RNA concentration in copies per μ L sera or mg tissue.

*Within each column, different superscripts indicate statistical group differences ($P < .05$) among fetal groups (Kruskal-Wallis with post hoc Dunn's test).

MEC (live fetus with $>3.6 \log_{10}$ genome copies per mg/ μ L in placenta, sera, and thymus and meconium staining of skin). All fetuses were spatially selected while considering their position in the uterine horns to obtain an equal distribution among and within litters (Supplemental Figures S1–S2).

Immunofluorescence

Assessment of angiogenesis in MFI tissues was determined through the detection of vascular endothelial growth factor (VEGF) using an anti-VEGFA rabbit polyclonal antibody (ab39250; 1:50 dilution; Abcam) and immunofluorescence. The antibody was raised against amino acids 1 to 100 of human VEGFA. Thus, to validate use of the antisera against VEGFA, a protein BLAST was conducted of *homo sapiens* (P15692.2) and *Sus scrofa* (P49151.1) VEGFA amino acid sequences. They were found to be 95% identical in the first 100 amino acids. Serially sectioned paraffin tissue blocks from CON ($n = 9$), UNIF ($n = 9$), HVL-VIA ($n = 10$), and MEC ($n = 8$) fetuses (Supplemental Figure S1) were labeled. While the objective was to include 10 fetuses per group, the distribution was not equal because the immunolabeling was of poor quality in some of the 3 samples of MFI within each paraffin block. To delineate cell borders and facilitate the identification of each cell type, sections were colabeled with tight junction protein-1 antibody (TJP-1; also known as zonula occludens-1; anti-ZO-1 rat monoclonal antibody IgG_{2a}; clone R40.76, sc-33725; 1:100 dilution; Santa Cruz Biotechnology), which identifies tight junctions to distinguish trophoblastic epithelium from uterine epithelium of the FMJ.¹ This antibody had been previously used in the pig to detect TJP-1.^{14,16,28} A negative control was also labeled for each fetus by replacing the VEGF antibody with normal rabbit serum (ab7487; 1:10 dilution).

After deparaffinization and rehydration, 5- μ m thick tissue sections on glass slides underwent antigen retrieval using Tris-EDTA (pH 9) for 30 minutes at 95°C. Primary antibodies were

incubated on the slides overnight at 4°C. The respective secondary antibodies, donkey anti-rabbit-IgG (CyTM 5, Jackson Immuno Research; 711545152; 1:200 dilution), and donkey anti-rat-IgG (Fluorescein [FITC], Jackson Immuno Research; 712095153; 1:200 dilution) were incubated for 4 h at room temperature. Counterstaining with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) was used to visualize cell nuclei. The slides were processed in 2 batches and nonspecific rabbit IgG was used at the same concentration as the primary antibody as a negative control.

Serial sections of paraffin tissues from the same fetuses, with 5 substitutions, that were used for VEGF labeling (Supplemental Figure S2), were immunolabeled for Ki-67 (anti-human Ki-67 mouse monoclonal; clone MIB-1 [Dako Omnis]; 1:100 dilution; Agilent Technologies), a proliferation marker expressed in the nuclei of proliferating cells.⁴⁰ This antibody has been previously used to evaluate porcine stem cell proliferation in jejunal crypts of intestinal samples.⁸ Normal mouse serum (ab7486; 1:10 dilution) replaced the Ki-67 to demonstrate a lack of nonspecific binding for quality control purposes on the negative control slides. As described above, slides were also labeled for TJP-1 and DAPI. The secondary antibody used for the detection of Ki-67 was donkey anti-mouse-IgG (Rhodamine Red; Jackson Immuno Research; 711545152; 1:200 dilution). The same 4 fetal groups were assessed ($n = 10$ fetuses/group). The slides were processed in 2 batches and nonspecific mouse IgG was used with the same concentration as the primary antibody as a negative control. Immunolabeling details are outlined in Supplementary Tables S1 and S2.

Image Analysis

All sections and images were obtained and analyzed using an Olympus IX83 microscope system equipped with an Andor Zyla 4.2 sCMOS camera (2048 \times 2048 pixel array; Andor USA, Concord, MA) and CellSens imaging software. In all

analyses, placental areolae and areas of detachment in the MFI were excluded. Evaluation and quantification of both placental angiogenesis and cell proliferation were performed with ImageJ using a series of semiautomated macros. For angiogenesis (detection of VEGF antibody), the ImageJ macro evaluated the median labeling intensity in each region (FMJ, submucosa, and myometrium). For this analysis, each region was analyzed in its entirety, and the median intensity values for each of the 3 samples (when suitable for analysis) were averaged to calculate a composite score for each region of each fetus.

For cell proliferation (detection of Ki-67 antibody), another ImageJ macro was developed to semiautomate the manual counting of positive cell nuclei per mm² of tissue independently in the uterine and trophoblast epithelium. For this analysis, representative sections of MFI were chosen by placing 3 identical rectangles (307,265 um²) along the total length of the MFI of each of the 3 samples from each fetus. All measurements and imaging protocols were custom-developed for this study.

Statistical Analysis

All statistical analyses were performed using Stata 15.1 (Stata-Corp LP, TX, USA). Group differences in histological scores and PRRSV concentration were assessed using a Kruskal-Wallis with post hoc Dunn's test and Benjamin-Hochberg adjustment. The Ki67 and VEGF data were natural log-transformed to obtain a normal distribution. Differences in median VEGF pixel intensity (per mm²) and counts of Ki67-positive labeled nuclei (per mm) among fetal classification groups were assessed using linear regression, followed by a pairwise comparison with Tukey multiple comparison adjustments. Full regression models were built that included other biologically relevant predictor variables (sex, within litter Z-score of brain: liver ratio [proxy for IUGR], and labeling batch) potentially associated with fetal PRRS severity, angiogenesis, and cell proliferation. A backward stepwise elimination was performed by removing nonsignificant variables until a parsimonious final model was achieved. For angiogenesis, separate models were created for each region investigated (FMJ, submucosa, and myometrium). For cell proliferation, separate models were created to assess labeling in the uterine and trophoblastic epithelium. For all analyses, $P < 0.05$ was considered statistically significant. All models were assessed for linearity and homoskedasticity of residuals using appropriate QQ and scatter plots.

Results

Histopathology and Viral Load

In the endometrial area of the MFI corresponding to infected fetuses, there was an accumulation of inflammatory cells (endometritis) characterized by lymphocytes, macrophages, and some plasma cells. An inflammatory reaction was also

observed in the placental area (placentitis) associated with infected fetuses, with less severity than the endometrium, and characterized mainly by the accumulation of macrophages. In the endometrium associated with infected fetuses, there was accumulation of lymphocytes and occasional macrophages within vascular walls (vasculitis). Vasculitis was not observed in the placental area. In the CON fetuses, a few randomly distributed inflammatory cells were observed, without any vasculitis.

Among the samples from PRRSV-inoculated gilts, the severity of endometritis, placentitis, and endometrial vasculitis did not differ among the UNIF, HVL-VIA, and MEC groups. However, all PRRSV-inoculated groups had greater lesion scores ($P < .04$ for all) than the CON group, which had no inflammation in any of the 3 areas evaluated (Table 1).

Regarding PRRSV RNA concentration in the placenta, sera, and thymus, by experimental design, there were no statistical differences between the HVL-VIA and MEC fetal groups, but both groups had greater viral load than CON and UNIF fetuses ($P < .001$).

Localization of VEGF in the MFI

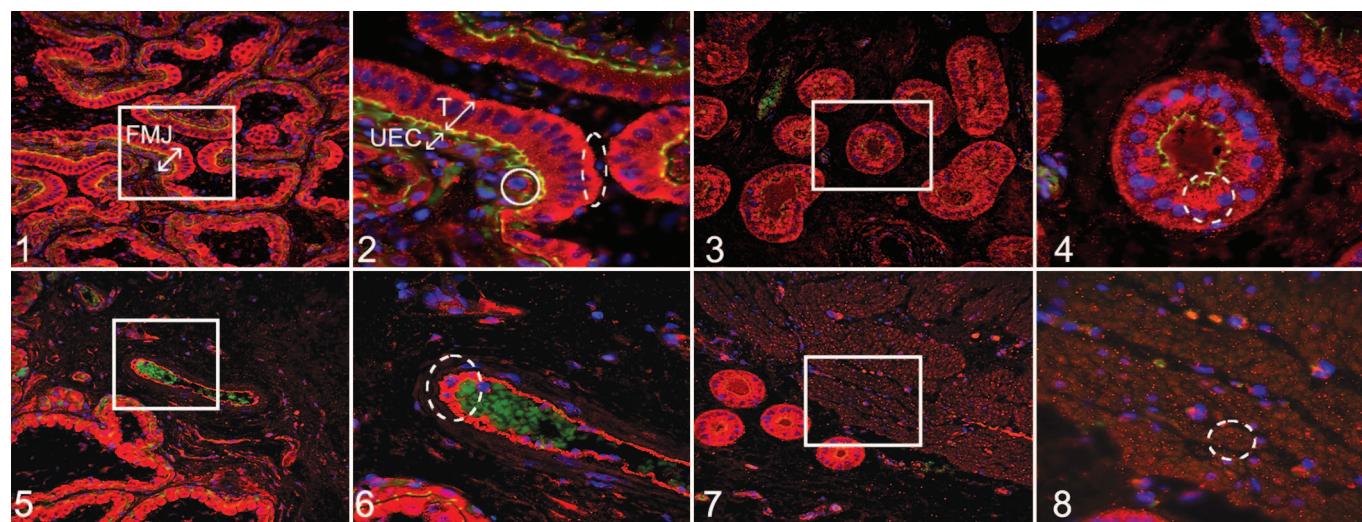
Immunolocalization of VEGF within the FMJ (Fig. 1) was more intense in the cytoplasm of trophoblastic epithelial cells compared with the cytoplasm of UEC (Fig. 2). In trophoblasts, the expression of VEGF appeared vesicular and with a tendency toward accumulation in the basolateral surface of the cell (Fig. 2). There was lower intensity of VEGF expression in UEC compared with trophoblasts, but it was possible to observe VEGF expression in the form of vesicles located mostly around the nucleus of UEC (Fig. 2).

In the endometrial submucosa, VEGF-positive immunolabeling was demonstrated in the cytoplasm of uterine glands (Fig. 3) with a spatial bias toward the apical part of the glandular cell (Fig. 4; suggesting the potential for diffuse release of VEGF into the glandular lumen). Also in endometrial submucosa, positive labeling for VEGF was detected through the entire cytoplasm of endothelial cells (Figs. 5, 6).

While the detection of VEGF was observed mainly in vesicular form in the cytoplasm of MFI cells mentioned above, the presence of positively immunolabeled vesicle-like structures were also detected in the extracellular spaces throughout the different regions evaluated. VEGF was also detected in myometrial cells (Fig. 7) in vesicle-like structures with random distribution in the cytoplasm (Fig. 8). These areas previously described as positive for VEGF labeling were identified in all fetuses evaluated without obvious visual difference between the groups.

Evaluation of VEGF Labeling Intensity by Fetal Group

Given the complex and diffuse labeling pattern described above, the analyses comparing differences in the intensity of VEGF labeling by fetal group were conducted on a whole-region basis (FMJ, uterine submucosa, and myometrium) rather



Figures 1–8. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus 2 (PRRSV-2) at 12 days after maternal infection, uterus and placenta, pigs. Immunofluorescence for vascular endothelial growth factor (VEGF; red); 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; blue; nuclear counterstaining); tight junction protein-1 (TJP-1; green; for identifying cell borders). **Figure 1.** Fetomaternal junction (FMJ) with diffusely positive immunolabeling for VEGF in all trophoblastic cells and with a higher intensity compared with uterine epithelial cells (UECs). **Figure 2.** Higher magnification of the white box in Figure 1. Trophoblasts (T) with diffuse VEGF expression in the cytoplasm and a tendency toward accumulation in the basolateral part of the cell (oval with dashed line). UECs have lower VEGF expression that is mostly observed around the nucleus (circle). **Figure 3.** Uterine glands have diffuse cytoplasmic labeling for VEGF. **Figure 4.** Higher magnification of the white box in Figure 3. There is diffuse VEGF immunolabeling with a tendency toward the apical part of the cell (oval with dashed line). **Figure 5.** Endothelial cells have diffuse cytoplasmic immunolabeling for VEGF. **Figure 6.** Higher magnification of the white box in Figure 5. There is diffuse immunolabeling through the cytoplasm (oval with dashed line). Autofluorescence of erythrocytes (green). **Figures 7, 8.** Myometrial cells showing random foci of cytoplasmic immunolabeling for VEGF. Figure 8 is a higher magnification of the white box in Figure 7.

than by tissue type or element within region. The resulting analysis (Figs. 9–11) showed that group differences were only significant ($P = .05$) in the submucosa, with greater expression of VEGF observed in endometrium associated with UNIF and HVL-VIA fetuses compared with MEC, with CON being intermediary (Fig. 10). Regarding the potential effects of sex and IUGR on VEGF labeling intensity, a significant association was only demonstrated in the submucosa where intensity was greater for female versus male ($P = .027$) fetuses, and inversely related to brain: liver weight ratio (lower intensity in IUGR vs non-IUGR fetuses; $P = .013$; Fig. 12). Labeling batch was also significantly associated with intensity in the submucosa ($P = .003$) and myometrial ($P = .02$) regions, but not in FMJ.

Localization of Ki-67 in the MFI

Immunolocalization of Ki-67 was randomly detected throughout the MFI in both trophoblastic epithelium and UEC (Fig. 13) and as expected was exclusively found in the nucleus (Fig. 14). Ki-67 protein was granular to condensed and observed scattered throughout the nuclei.

Evaluation of Positive Ki-67 Labeling by Fetal Group

In the maternal epithelium, the number of Ki-67 labeled cells differed across fetal classification groups ($P < .001$) with CON and UNIF groups having greater Ki-67 counts (indicative of

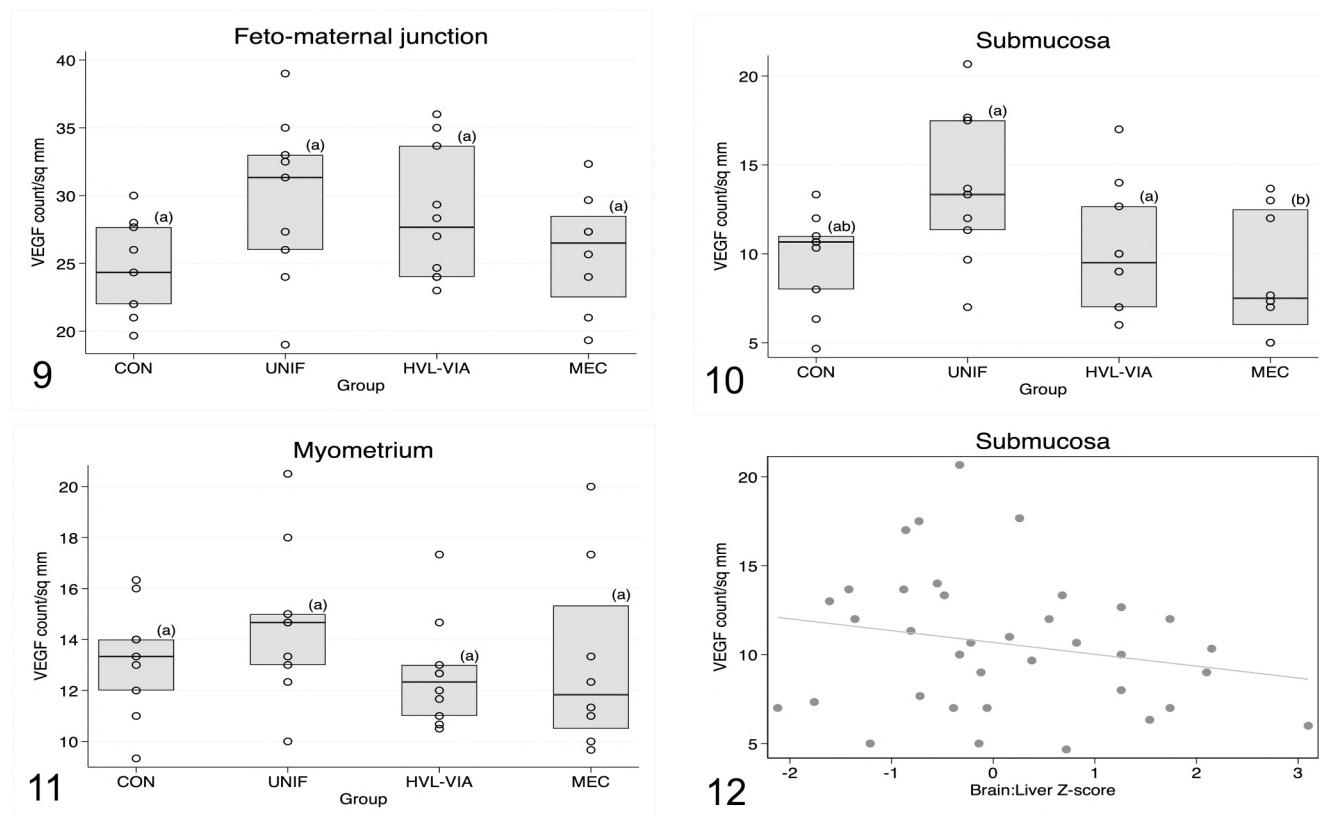
greater proliferation) in UEC compared with the VIA and MEC groups (Fig. 15). Significant group differences were also observed among the fetal disease progression groups with respect to the number of Ki-67 positive trophoblastic epithelial cells ($P = .001$). Greater trophoblastic cell proliferation was evident in the CON group compared with all infected groups (Fig. 16).

Neither sex nor brain: liver ratio was associated with Ki67 labeling in the maternal and fetal epithelium. However, labeling batch was significant ($P < .001$) for both types of cells, with greater labeling intensity in the second versus the first batch.

Discussion

The objective of this study was to evaluate angiogenesis and cell proliferation in the porcine MFI to determine if these processes were altered by PRRSV-2 infection. Examining VEGF immunofluorescence labeling intensity and count of nuclei immunopositive for Ki67 in MFI tissues across fetal phenotypic groups representing a range of disease progression from noninfected to high viral load-MEC, provided insight into the possible mechanisms of fetal compromise.

With regard to reproductive PRRS, it has been shown that the infection of uterine tissues and transplacental transmission of PRRSV-2 to the fetus occurs rapidly. After intramuscular/intranasal viral inoculation in the gilts, viral replication in uterine

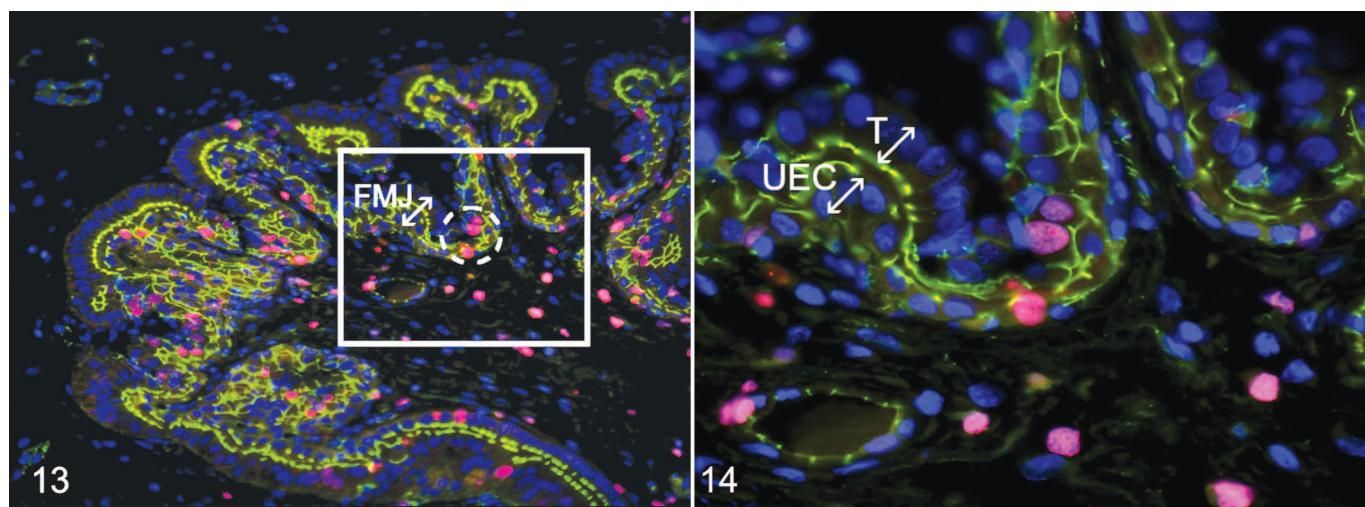


Figures 9–12. Box plots comparing vascular endothelial growth factor (VEGF) immunolabeling counts per mm^2 among fetal porcine reproductive and respiratory syndrome virus 2 (PRRSV-2) resilience groups: control (CON), uninfected (UNIF), high viral load-viable (HVL-VIA), and meconium-stained (MEC). Each datapoint represents the average of 3 different regions of the maternal-fetal interface (MFI), for each fetus. Different superscripts indicate significant group differences based on Tukey-adjusted post hoc pairwise comparisons from linear regression modeling of ln-transformed data. **Figure 9.** Feto-maternal junction. No significant differences are observed ($P = .08$). **Figure 10.** Submucosa. VEGF immunolabeling intensity is significantly lower in MEC versus UNIF and HVL-VIA groups ($P = .0001$). **Figure 11.** Myometrium. No significant differences among groups are observed ($P = .09$). **Figure 12.** Submucosa, showing the relationship between VEGF labeling and brain: liver weight ratio, a proxy measure for intrauterine growth restriction. Fetuses with intrauterine growth restriction (IUGR; those with greater brain: liver ratios) have lower VEGF labeling ($P = .013$).

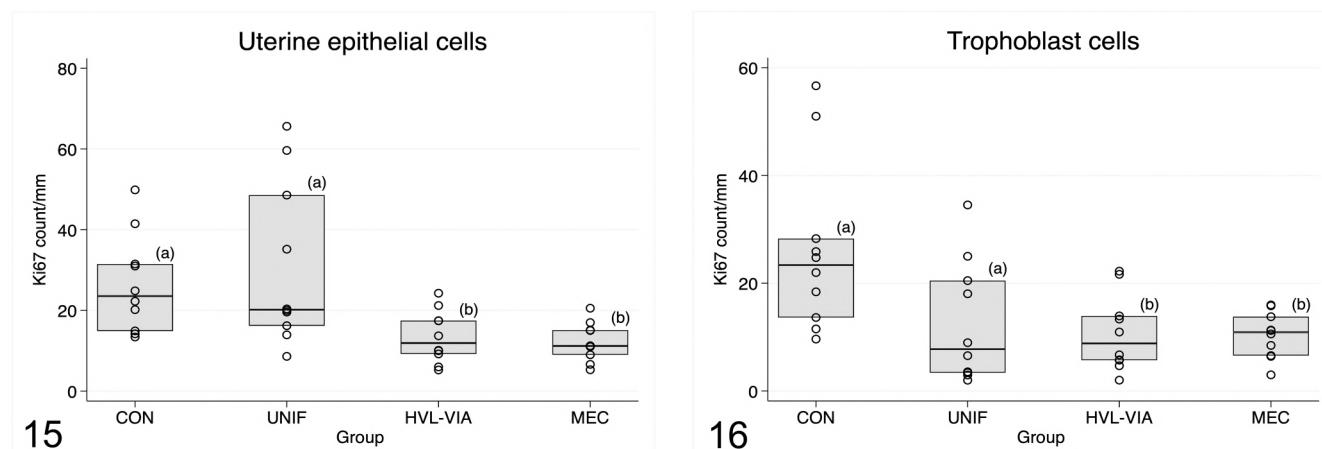
tissues occurs within 2 days and transplacental transmission of the virus to fetuses is evident within 5 days.²⁶ The virus has been demonstrated in different fetal organs including thymus, tonsils, lymph nodes, lungs, liver, spleen, heart, and kidneys following infection.^{26,27,38} Classification of fetuses along a spectrum of relative fetal resilience based on fetal preservation and viral load is highly desirable to study PRRSV-2 pathogenesis. UNIF fetuses are classified as more resistant to the virus than the HVL groups because viral replication is suppressed or prevented in fetal tissues. The UNIF fetuses were purposely selected for this study based on absence of virus in placenta, sera, and fetal thymus. By contrast, HVL-VIA and MEC fetuses had high levels of virus in all 3 tissues tested. Previous research has proposed that viable fetuses with HVLs are more tolerant than their MEC cohorts that show early to advanced signs of fetal compromise preceding death.^{22,26,33,47} The relationship between viral infection and fetal death has been difficult to understand in part because microscopic lesions are limited in the fetus in both research and

diagnostic specimens.^{9,23,32,37} On the other hand, another fundamental organ during pig pregnancy that has been widely evaluated during PRRSV infections is the placenta. Frequent inflammatory lesions associated with PRRSV infection are observed in the endometrium, placenta, myometrium, and blood vessels, along with hemorrhagic areas, apoptotic cell death in MFI cells, and areas of separation between trophoblasts and UEC.^{18,19,30,31} These PRRSV-related lesions in the MFI have historically been considered important in terms of the possible mechanisms of fetal death.

Angiogenesis is a process involving the formation and development of new blood vessels from the existing vasculature¹² and is an essential physiological component of placental development during pregnancy to enhance the exchange of gases and nutrients between the dam and litter.⁵ While contributing to placental development,³ the importance of angiogenesis in placental tissues during pregnancy is highlighted best by the alterations in angiogenesis that can compromise pregnancies in animals



Figures 13, 14. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus 2 (PRRSV-2) at 12 days after maternal infection, fetomaternal junction (FMJ), pigs. Immunofluorescence for Ki67 (pink); 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; blue; nuclear counterstaining); tight junction protein-1 (TJP-1; green; for identifying cell borders). **Figure 13.** Trophoblast and uterine epithelial cells (UECs) showing positive labeling for Ki67 expressed randomly throughout the FMJ (ovals with dashed line). **Figure 14.** Higher magnification of the white box in Figure 13. There is positive labeling for Ki67 in the nucleus of trophoblastic (T) cells and nucleus of UECs.



Figures 15, 16. Box plots comparing Ki67 immunolabeling counts per mm among fetal porcine reproductive and respiratory syndrome virus 2 (PRRSV-2) resilience groups: control (CON), uninfected (UNIF), high viral load-viable (HVL-VIA), and meconium-stained (MEC). Each datapoint represents values for epithelial layers of the fetomaternal junction associated with each individual fetus. Different superscripts indicate significant group differences based on Tukey-adjusted post hoc pairwise comparisons from linear regression modeling of ln-transformed data.

Figure 15. Uterine epithelial cells. There is significantly decreased Ki-67 immunolabeling (lower cell proliferation) in HVL-VIA and MEC groups ($P < .001$). **Figure 16.** Trophoblast cells. There is significantly decreased Ki-67 immunolabeling in all fetal groups from infected gilts compared with non-inoculated control gilts ($P = .001$).

and women.^{10,20,35,36} VEGF is one of several angiogenic factors that participate in the formation and development of new blood vessels in the placenta^{4,11} through its involvement in stimulating mitosis and proliferation of endothelial cells. While intuitive that VEGF immunolabeling should be localized around endothelial cells, in the present study, VEGF immunolabeling was also localized in uterine and trophoblastic epithelium, uterine gland cells, and myometrial cells. These results are consistent with previous investigations where VEGF was detected in different types of porcine placental cells.^{6,15,48,49} It has been

proposed that extra-endothelial localization of VEGF in cells, such as the uterine or trophoblastic epithelium, might be related to the differentiation and cell maturation functions that VEGF produces in these cells.^{49,50} Similarly, the expression of VEGF in the uterine glandular epithelium might be associated with the differentiation, development, and secretory functions that VEGF promotes in the glandular cells.⁴⁹

Despite the similarity in the area of MFI among the fetal groups in our study, MEC fetuses presented a lower expression of VEGF in the endometrial submucosa where abundant

uterine glands and blood vessels are located. Considering the numerous functions that VEGF has on these cellular structures, low expression of VEGF in the submucosa associated with MEC fetuses may negatively affect cellular transport capacities in placental cells, mitosis, development, and differentiation of uterine glands and endothelial cells compromising normal fetal development and survival of these fetuses, thereby resulting in fetal compromise and meconium staining following PRRSV infection. Another possible reason for the decreased expression of VEGF in MEC fetuses may be related to the other pathological processes induced by PRRSV.

The VEGF immunolabeling in the cytoplasm of MFI cells and in extracellular areas suggests that the cellular storage and release of this glycoprotein to the extracellular medium may be carried via vesicles. This vesicular form could lead to signaling between cells and the resulting angiogenic effects of VEGF between neighboring or distant cells.^{13,45}

In the present study, female fetuses presented with significantly greater levels of VEGF immunolabeling in the submucosa associated with male fetuses and trended similarly in the MFI. Finding sex differences was not entirely unexpected as these were reported for angiogenic signaling in tissue of the porcine MFI.⁴¹ Although these previous differences were detected *in vitro*, it suggests that male and female fetuses communicate differently during different periods of gestation (pre-implantation, migrating around the uterus, and implantation). Based on the present results, it is also plausible that male and female fetuses might have differing angiogenic responses when infected by PRRSV.

The angiogenic response in IUGR fetuses in this study are partially consistent with other investigations that suggest that VEGF may be an important growth factor associated with fetal development, and alterations in placental angiogenesis may predispose to compromised nutrient transport due to alterations in the development of new placental blood vessels^{15,36}. While the reduction in VEGF immunolabeling in IUGR fetuses in this study was only noted in the submucosa and its effect was variable, IUGR fetuses that have lower viral loads are at greater odds of being UNIF compared with non-IUGR littermates.²¹ It is possible that the lower vascularization in IUGR fetuses could reduce the opportunity for transplacental infection because of fewer vessels or increase the distance separating maternal and fetal circulation at the FMJ.

Ki-67 was used to evaluate cell proliferation because the protein is expressed in the nucleus of cells in a state of proliferation, and its immunoreactivity is detected at all stages of the cell cycle except G₀ or resting phase.⁴⁰ In this study, Ki-67 was detected in both endometrial cells and trophoblastic epithelium indicating proliferation of these cell types during pregnancy. The labeling differentiated cells in a state of proliferation (pink label—Ki-67) and quiescent cells (blue labeling—DAPI) along the FMJ.

In the UEC, Ki-67 immunoreactivity was statistically different among fetal classification groups, with CON and UNIF fetuses having greater cell proliferation than the infected HVL-VIA and MEC groups. This suggests that proliferation of uterine

epithelium is reduced following PRRSV infection, but only after the fetus is infected. This is noteworthy because the severity of endometritis and vasculitis in UNIF fetuses was similar to the other infected groups (Table 1) suggesting endometrial disease is not underlying proliferation of UEC. By contrast, Ki-67 immunoreactivity in trophoblastic epithelial cells was decreased in all fetal groups from inoculated gilts (UNIF, VIA, and MEC) compared with CON fetuses. This suggests the continuous remodeling of trophoblast cells that normally occurs during porcine gestation is adversely affected as soon as the endometrium is PRRSV-infected, independent of fetal infection. This may be due to apoptotic cell death in placental cells of the MFI.^{19,31} Arrested cell cycle was confirmed during PRRSV-2 infection of cultured porcine trophoblast cells at the G2/M phase.⁴²

These results also support the concept of cross-talk between the fetus and MFI whereby some host responses in MFI are only induced after fetal infection is established. For example, a core set of interferon-induced genes were upregulated in fetal placenta and thymus of LVL and HVL fetuses, but only after the fetal thymus became infected.⁴⁷ These genes were not upregulated in UNIF fetuses, or in fetuses with infected placenta but UNIF thymus.⁴⁷ Our results indicate that the cell cycle is downregulated in trophoblasts prior to fetal infection and in the opposing uterine epithelium after fetal infection.

It was previously demonstrated that the decrease in cell proliferation factors in placental tissues was associated with the lightest fetuses and IUGR during different periods of gestation, potentially affecting cell proliferation or remodeling and the exchange of nutrients between the dam and the fetus during development.^{7,41} While our results demonstrate that VEGF labeling was decreased in the submucosa associated with IUGR fetuses, no such relationship was found to be associated with the amount of Ki67 immunoreactivity.

Conclusion

Angiogenesis and proliferation of maternal and placental cells are indispensable physiological processes during pregnancy that ensure adequate development and maintenance of MFI tissues while also ensuring the proper development and survival of the fetus. PRRSV has direct and indirect effects on different types of reproductive tissues through inflammatory processes, apoptosis, and cell cycle arrest. Fetuses classified as resistant to PRRSV infection due to lack of virus detected in fetal tissues (UNIF) demonstrated levels of angiogenesis in the submucosa and cell proliferation in UEC similar to those of CON fetuses. Thus, the homeostasis of angiogenesis in the endometrium of UNIF fetuses could be described as a characteristic of resistance to PRRSV infection. By contrast, decreased angiogenesis was observed in the submucosa of the most susceptible fetuses (MEC) and may underlie an important mechanism associated with fetal demise. Furthermore, decreased angiogenesis in the submucosa of IUGR fetuses may help to prevent PRRSV infection, explaining the relative resilience of this phenotype. While trophoblast cell proliferation decreased in all fetuses postinfection, similar changes in the UEC appear to be dependent on

infection of the fetus. None of these changes, however, were related to severity of endometritis, placentitis, or endometrial vasculitis. In addition to the pathological effects that PRRSV produced in endometrial and placental tissues reported in other investigations, we confirm that PRRSV infection of reproductive tissues also decreases VEGF immunolabeling intensity which plausibly alters angiogenesis in the submucosa and cell proliferation in MFI cells and thereby adversely affects fetal viability.

Acknowledgments

The authors acknowledge the Prairie Diagnostic Services Inc. and many technicians and students who assisted with the animal experiment. Special thanks to Larhonda Sobchishin and Eiko Kawamura for their assistance with the microscopy work and to the PGM team members who provided positive suggestions.

Author Contributions

All authors participated in experiment design and sample collection. Staining and microscopy was performed by JAB-Z with technical assistance from DJM, JAP, and GH. Statistical analysis was completed by JAB-Z and JCSH. Pathological oversight was provided by SED. JAB-Z, SED, and JCSH drafted the manuscript. All authors contributed to and approved the final version.

Declaration of Conflicting Interests

The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

Funding

The author(s) disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship, and/or publication of this article: Funding was generously provided by Genome Canada (Project 2014LSARP_8202) and Genome Prairie (Saskatchewan Ministry of Agriculture, Project #346143) with administrative support provided by Genome Alberta.

ORCID iD

Susan E. Detmer  <https://orcid.org/0000-0002-4064-3460>

References

- Anderson JM, Stevenson BR, Jesaitis LA, et al. Characterization of ZO-1, a protein component of the tight junction from mouse liver and Madin-Darby canine kidney cells. *J Cell Biol.* 1988;106:1141–1149.
- Bauer R, Walter B, Hoppe A, et al. Body weight distribution and organ size in newborn swine (*sus scrofa domestica*)—a study describing an animal model for asymmetrical intrauterine growth retardation. *Exp Toxicol Pathol.* 1998;50:59–65.
- Burton G, Charnock-Jones D, Jauniaux E. Regulation of vascular growth and function in the human placenta. *Reproduction.* 2009;138:895–902.
- Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med.* 2000;6:389–395.
- Carter AM. Evolution of placental function in mammals: the molecular basis of gas and nutrient transfer, hormone secretion, and immune responses. *Physiol Rev.* 2012;92:1543–1576.
- Charnock-Jones DS, Clark DE, Licence D, et al. Distribution of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its binding sites at the maternal-fetal interface during gestation in pigs. *Reproduction.* 2001;122:753–760.
- Chen F, Wang T, Feng C, et al. Proteome differences in placenta and endometrium between normal and intrauterine growth restricted pig fetuses. *PLoS ONE.* 2015;10:e0142396.
- Chen Y-M, Helm ET, Groeltz-Thrush JM, et al. Epithelial-mesenchymal transition of absorptive enterocytes and depletion of Peyer's patch M cells after PEDV infection. *Virology.* 2021;552:43–51.
- Cheon D-S, Chae C. Distribution of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in stillborn and liveborn piglets from experimentally infected sows. *J Comp Pathol.* 2001;124:231–237.
- Conroy A, Sergides L, Finney C, et al. C5a enhances dysregulated inflammatory and angiogenic responses to malaria in vitro: potential implications for placental malaria. *PLoS ONE.* 2009;4:e4953.
- Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2001;280:C1358–C1366.
- Folkman J. Angiogenesis. *Biol Endo Cells.* 1984;27:412–428.
- Gai C, Carpanetto A, Dereggibus MC, Camussi G. Extracellular vesicle-mediated modulation of angiogenesis. *Histol Histop.* 2016;31:379–391.
- Guidoni PB, Pasternak JA, Hamonic G, et al. Decreased tight junction protein intensity in the placenta of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-2 infected fetuses. *Placenta.* 2021;112:153–161.
- Guimarães GC, Alves LA, Betarelli RP, et al. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and factor VIII in the gilt placenta and its relation to fetal development. *Theriogenology.* 2017;92:63–68.
- Hamonic G, Pasternak JA, Forsberg NM, et al. Expression of pattern recognition receptors in porcine uterine epithelial cells in vivo and in culture. *Vet Immunol Immunopathol.* 2018;202:1–10.
- Holtkamp DJ, Kliebenstein JB, Neumann EJ, et al. Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on United States pork producers. *J Swine Heal Prod.* 2013;21:72–84.
- Karniychuk UU, Nauwynck HJ. Pathogenesis and prevention of placental and transplacental porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Veter Res.* 2013;44:1–14.
- Karniychuk UU, Saha D, Geldhof M, et al. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) causes apoptosis during its replication in fetal implantation sites. *Microb Path.* 2011;51:194–202.
- Lacko LA, Hurtado R, Hinds S, et al. Altered feto-placental vascularization, feto-placental malperfusion and fetal growth restriction in mice with Egfl7 loss of function. *Development.* 2017;144:2469–2479.
- Ladinig A, Foxcroft G, Ashley C, et al. Birth weight, intrauterine growth retardation and fetal susceptibility to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *PLoS ONE.* 2014;9:e109541.
- Ladinig A, Wilkinson J, Ashley C, et al. Variation in fetal outcome, viral load and ORF5 sequence mutations in a large scale study of phenotypic responses to late gestation exposure to type 2 porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *PLoS ONE.* 2014;9:e96104.
- Lager KM, Halbur PG. Gross and microscopic lesions in porcine fetuses infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Vet Diagn Invest.* 1996;8:275–282.
- Loving CL, Osorio FA, Murtaugh MP, Zuckermann FA. Innate and adaptive immunity against porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Immunol Immunopathol.* 2015;167:1–14.
- Malgarini CM, Moser F, Pasternak JA, et al. Fetal hypoxia and apoptosis following maternal porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection. *BMC Vet Res.* 2021;17:1–14.
- Malgarini CM, Nosach R, Novakovic P, et al. Classification of fetal resilience to porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) based on temporal viral load in late gestation maternal tissues and fetuses. *Virus Res.* 2019;260:151–162.
- Mengeling WL, Lager K, Vorwald A. Temporal characterization of transplacental infection of porcine fetuses with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Am J Vet Res.* 1994;55:1391–1398.
- Miller AL, Pasternak JA, Medeiros NJ, et al. In vivo synthesis of bacterial amyloid curli contributes to joint inflammation during *S. Typhimurium* Infection. *PLoS Pathog.* 2020;16:e1008591.

29. Moura CAA, Johnson C, Baker SR, et al. Assessment of immediate production impact following attenuated PRRS type 2 virus vaccination in swine breeding herds. *Porcine Heal Manage.* 2019;5:13.
30. Novakovic P, Detmer SE, Suleman M, et al. Histologic changes associated with placental separation in gilts infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Pathol.* 2018;55:521–530.
31. Novakovic P, Harding JC, Al-Dissi AN, Detmer SE. Type 2 porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection increases apoptosis at the maternal-fetal interface in late gestation pregnant gilts. *PLoS ONE.* 2017;12:e0173360.
32. Novakovic P, Harding JC, Al-Dissi AN, et al. Pathologic evaluation of type 2 porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection at the maternal-fetal interface of late gestation pregnant gilts. *PLoS ONE.* 2016;11:e0151198.
33. Pasternak JA, MacPhee DJ, Harding JC. Fetal cytokine response to porcine reproductive and respiratory syndrome virus-2 infection. *Cytokine.* 2020;126:154883.
34. Pasternak JA, MacPhee DJ, Harding JC. Maternal and fetal thyroid dysfunction following porcine reproductive and respiratory syndrome virus2 infection. *Vet Res.* 2020;51:1–14.
35. Redman CW, Sargent IL. Latest advances in understanding preeclampsia. *Science.* 2005;308:1592–1594.
36. Reynolds LP, Caton JS, Redmer DA, et al. Evidence for altered placental blood flow and vascularity in compromised pregnancies. *J Physiol.* 2006;572:51–58.
37. Rossow K, Laube K, Goyal S, Collins J. Fetal microscopic lesions in porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced abortion. *Veter Pathol.* 1996;33:95–99.
38. Rowland RR. The interaction between PRRSV and the late gestation pig fetus. *Virus Res.* 2010;154:114–122.
39. Sanchis EG, Cristofolini AL, Fiorimanti MR, et al. Apoptosis and cell proliferation in porcine placental vascularization. *Animal Reprod Sci.* 2017;184:20–28.
40. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *Cell Physiol.* 2000;182:311–322.
41. Stenhouse C, Hogg CO, Ashworth CJ. Associations between fetal size, sex and both proliferation and apoptosis at the porcine feto-maternal interface. *Placenta.* 2018;70:15–24.
42. Suleman M, Novakovic P, Malgarin C, et al. Spatiotemporal immunofluorescent evaluation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus transmission across the maternal-fetal interface. *Path Dis.* 2018;76:fty060.
43. Terpstra C, Wensvoort G, Pol J. Experimental reproduction of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (mystery swine disease) by infection with Lelystad virus: Koch's postulates fulfilled. *Veter Quart.* 1991;13:131–136.
44. Thomann B, Rushton J, Schuepbach-Regula G, Nathues H. Modeling economic effects of vaccination against porcine reproductive and respiratory syndrome: impact of vaccination effectiveness, vaccine price, and vaccination coverage. *Front Vet Sci.* 2020;7:500.
45. Todorova D, Simoncini S, Lacroix R, et al. Extracellular vesicles in angiogenesis. *Circ Res.* 2017;120:1658–1673.
46. Vallet J, Freking B. Differences in placental structure during gestation associated with large and small pig fetuses. *J Anim Sci.* 2007;85:3267–3275.
47. Van Goor A, Pasternak A, Walker K, et al. Differential responses in placenta and fetal thymus at 12 days post infection elucidate mechanisms of viral level and fetal compromise following PRRSV2 infection. *BMC Genomics.* 2020;21:1–20.
48. Vonnahme KA, Ford SP. Placental vascular endothelial growth factor receptor system mRNA expression in pigs selected for placental efficiency. *J Physiol.* 2004;554:194–201.
49. Winther H, Ahmed A, Dantzer V. Immunohistochemical localization of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its two specific receptors, Flt-1 and KDR, in the porcine placenta and non-pregnant uterus. *Placenta.* 1999;20:35–43.
50. Zhou Y, McMaster M, Woo K, et al. Vascular endothelial growth factor ligands and receptors that regulate human cytotrophoblast survival are dysregulated in severe preeclampsia and hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets syndrome. *Am J Pathol.* 2002;160:1405–1423.