

MAJALAH



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

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

EDISI 9

JUNI 2022

MAJALAH

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

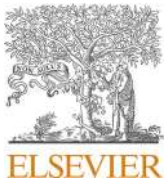
EDISI 9

TAHUN 2022

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

DAFTAR ISI

No.	Judul	Halaman
1	Karakteristik (sensitivitas dan spesifisitas) tes diagnostik tingkat kelompok untuk <i>Mycobacterium avium</i> subspecies <i>paratuberculosis</i> pada ternak – Tinjauan sistematis	1
2	Analisis retrospektif temuan post-mortem pada keturunan asli berusia dari lahir hingga 18 bulan yang disajikan ke laboratorium patologi Inggris	12
3	Ulasan 100 Tahun: Deteksi, manajemen, dan pencegahan mastitis	18
4	Glikokaliks endotel mikrovaskular: Sepotong teka-teki tambahan dalam kedokteran hewan	35
5	Dinamika <i>Mycoplasma bovis</i> di peternakan sapi perah Belanda selama wabah klinis akut	45
6	Pengobatan ovarium Cistik folikel pada sapi perah	52
7	Pembuatan vaksin inaktif untuk patogen unggas <i>Escherichia coli</i> menggunakan microarrays: Pendekatan yang lebih rasional untuk desain vaksin yang tidak aktif	56
	Jurnal Asli	67



Daftar isi tersedia di [SainsLangsung](#)

Jurnal Kedokteran Hewan

beranda jurnal: www.elsevier.com/locate/tvj



Karakteristik (sensitivitas dan spesifisitas) tes diagnostik tingkat kelompok untuk *Mycobacterium avium* subspesies *paratuberculosis* pada ternak — Tinjauan sistematis

Lapangan NL^{a,b,*}, JF Meesebuah, CG McAloon^b

^asebuah: Departemen Penelitian Hewan dan Biosains, Pusat Penelitian Produksi Susu, Teagasc, Moorepark, Fermoy, Co. Dublin, Cork, P61 P302, Irlandia

^bBagian Kesehatan Ternak dan Peternakan, Fakultas Kedokteran Hewan, University College Dublin, D04 W6F6, Irlandia

INFO ARTIKEL

Kata kunci:

Ternak
Tes diagnostik
Sensitivitas kawanan
Spesifisitas kawanan
Paratuberkulosis

ABSTRAK

Tes diagnostik untuk penyakit Johne pada sapi dicirikan oleh sensitivitas yang buruk dan spesifisitas yang sering tidak sempurna pada tingkat hewan. Karena peternak dan dokter hewan memiliki jaminan atau kepercayaan yang terbatas dari hasil pengujian hewan individu untuk *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP), program kontrol berdasarkan pengujian tingkat seluruh kawanan memberikan kerangka kerja terbaik untuk mengklasifikasikan kawanan. Di tingkat kawanan, ada beragam pilihan pengujian untuk MAP berdasarkan pengujian langsung dan tidak langsung dari sampel individu dan kumpulan. Ukuran paling umum dari kinerja uji kawanan, sensitivitas kawanan (HSe) dan spesifisitas kawanan (HSp), penting untuk pengambilan keputusan dalam seleksi uji kawanan, untuk memperkirakan prevalensi dan sebagai masukan untuk studi simulasi. Tinjauan sistematis ini menyelidiki hasil evaluasi uji kawanan untuk MAP pada sapi, melalui pencarian literatur yang komprehensif dan proses penyaringan empat tahap yang sistematis untuk mengidentifikasi publikasi yang relevan.

Empat puluh enam publikasi dengan hasil yang relevan memenuhi syarat untuk dimasukkan dalam tinjauan akhir, yang berisi evaluasi pengujian serologis ELISA seluruh kawanan, ELISA tangki susu curah, kultur, PCR dan pengujian fag, pengujian feses yang dikumpulkan dan pengujian sampel lingkungan. Data yang diambil dari setiap publikasi meliputi populasi sampel, metode analisis, uji referensi, titik potong, HSe dan HSp. Perbandingan langsung antara perkiraan HSe dan HSp yang dilaporkan dari berbagai penelitian merupakan tantangan karena variasi dalam prevalensi kawanan dan protokol uji yang digunakan. Data dalam tinjauan sistematis ini akan bermanfaat bagi para pembuat keputusan dan peneliti dan menyoroti kesenjangan pengetahuan yang membutuhkan penelitian lebih lanjut.

pengantar

Penyakit Johne adalah infeksi bakteri yang menyerang hewan ruminansia dan non-ruminansia yang disebabkan oleh: *Mycobacterium avium* subspesies *paratuberculosis* (PETA). Sapi biasanya terinfeksi sebagai anak sapi dan dapat mengembangkan tanda-tanda klinis sebagai orang dewasa, termasuk diare progresif, penurunan berat badan dan kematian akhirnya (Sayang, 2011). Penyakit Johne menjadi perhatian industri susu di seluruh dunia karena dampaknya terhadap kesehatan hewan dan kerugian ekonomi dari penurunan produktivitas (Ott dkk., 1999; Garcia dan Shaloo, 2015; McAloon et al., 2016b), tetapi juga karena hubungan yang dilaporkan dengan penyakit Crohn pada manusia (Feller et al., 2007; Waddell et al., 2015). Meskipun hubungan penyebab antara MAP dan penyakit Crohn belum ditetapkan, ada bukti bahwa MAP dapat bertahan dari proses pasteurisasi (Grant et al., 2002). Oleh karena itu, industri susu memiliki

menerapkan prinsip kehati-hatian untuk melindungi kesehatan masyarakat dan menjaga kepercayaan konsumen terhadap produk susu, dengan bertindak untuk mengendalikan MAP di tingkat peternakan.

Pengendalian MAP bergantung pada kombinasi pengujian, pemusnahan dan strategi manajemen untuk memutus siklus penularan antara dan di dalam kawanan. Kinerja tes diagnostik untuk MAP pada tingkat hewan individu ditinjau secara komprehensif oleh Nielsen dan Toft (2008), yang menggambarkan perubahan sensitivitas dan spesifisitas tes untuk MAP sebagai penyakit berkembang melalui tahap terinfeksi, menular dan terpengaruh. Dalam tinjauan tersebut, tes ELISA dilaporkan memiliki sensitivitas (Se) dan spesifisitas (Sp) masing-masing 7-22% dan 85-100%, sedangkan kultur feses dilaporkan memiliki Se dan Sp 23-29% dan 98. % masing-masing. Se rendah tes yang tersedia pada hewan individu memberikan jaminan rendah dari ada atau tidak adanya infeksi MAP.

* Penulis yang sesuai.

Alamat email: Niamh.field@teagasc.ie (Bidang NL).

<https://doi.org/10.1016/j.tvj.2022.105786>

Tersedia online 10 Januari 2022

1090-0233/© 2022 Para Penulis. Diterbitkan oleh Elsevier Ltd. Ini adalah artikel akses terbuka di bawah lisensi CC BY (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Oleh karena itu, program pengendalian menekankan pengujian dan klasifikasi pada tingkat kelompok daripada pada tingkat individu, dan sebagian besar program pengendalian nasional telah mengadopsi strategi berdasarkan pengujian kelompok dan pengendalian di lahan untuk mengurangi prevalensi (Geraghty dkk., 2014).

Pengujian MAP di tingkat kawanan penting untuk deteksi kasus (kawanan), jaminan kawanan (atau keyakinan akan kebebasan), dan estimasi prevalensi tingkat kawanan (nasional). Ada berbagai strategi pengujian untuk tujuan ini dan parameter kinerja pengujian utama di tingkat kawanan adalah sensitivitas kawanan (HSe) dan spesifisitas kawanan (HSp). Banyak studi lapangan dan model simulasi telah mengevaluasi metode pengujian yang berbeda untuk MAP di tingkat kawanan. Namun, sepengetahuan penulis belum ada ulasan yang dipublikasikan tentang sintesis hasil dari studi ini. Tinjauan sistematis ini bertujuan untuk meringkas perkiraan HSe dan HSP dari evaluasi uji yang diterbitkan sebelumnya untuk berbagai metode uji tingkat kelompok.

Bahan dan metode

Kriteria inklusi dan eksklusi

Publikasi dari tahun mana pun dimasukkan jika ditulis dalam bahasa Inggris, tersedia dalam teks lengkap atau bentuk abstrak konferensi, memiliki ternak sebagai spesies yang diminati (baik susu atau sapi) dan berisi evaluasi sensitivitas kawanan dan/atau spesifisitas kawanan dari suatu metode uji diagnostik untuk MAP. Jika artikel tidak didasarkan pada data penelitian asli (ulasan dan meta-analisis), artikel tersebut dihapus setelah mencari daftar referensi untuk artikel tambahan yang relevan. Setiap artikel yang diterbitkan setelah menyelesaikan pencarian literatur (31 Juli 2020) tidak termasuk dalam tinjauan sistematis.

Strategi pencarian

Web of Science (WoS) dan Scopus digunakan untuk melakukan pencarian komprehensif secara online. Kata kunci yang sedikit berbeda digunakan untuk setiap mesin pencari, karena relevansi hasil yang berbeda-beda di antara mereka. Istilah pencarian dipilih melalui konsultasi dengan rekan penulis dan dijelaskan sepenuhnya dalam materi Tambahan untuk makalah ini. Prosiding konferensi dari semua tahun International Colloquium on Paratuberculosis (ICP), juga secara manual mencari abstrak dan makalah yang relevan.

Proses seleksi

Hasil dari WoS dan Scopus digabungkan ke dalam proses evaluasi empat tahap:

Tahap 1: Artikel duplikat telah dihapus. Judul semua hasil dipindai. Judul-judul yang jelas-jelas tidak relevan, atau yang merujuk pada spesies selain sapi, dikeluarkan.

Tahap 2: Abstrak dari artikel yang tersisa dibaca. Artikel yang tidak ditulis dalam bahasa Inggris, artikel dengan subjek yang jelas tidak relevan, dan artikel yang merujuk pada spesies selain sapi, dikeluarkan.

Tahap 3: Daftar referensi dari artikel relevan yang tersisa ditambah dan prosiding ICP dicari secara manual untuk mengidentifikasi abstrak dan makalah tambahan yang relevan.

Tahap 4: Artikel dan abstrak konferensi yang tersisa dibaca sepenuhnya. Setiap publikasi yang tidak memiliki hasil evaluasi uji numerik untuk sensitivitas kawanan atau spesifisitas kawanan dikeluarkan. Publikasi yang menggunakan sampel simulasi atau buatan dikeluarkan. Publikasi yang mengevaluasi strategi penyaringan kelompok yang menggabungkan dua metode pengujian yang berbeda dikeluarkan jika hasil tidak dapat diinterpretasikan untuk setiap pengujian secara terpisah. Publikasi yang mengevaluasi metode pengujian yang tidak lagi tersedia, seperti kultur radiometrik juga dikecualikan. Semua simulasi

studi pemodelan dengan hasil yang relevan dimasukkan.

Ekstraksi data

Data berikut dicatat untuk setiap publikasi, jika berlaku: penulis, tahun, negara asal, tes yang sedang dievaluasi, metode analisis, tes referensi, titik batas tes referensi, populasi sampel dan hasil evaluasi (HSe, Hsp). Beberapa artikel berisi lebih dari satu evaluasi tes. Evaluasi uji dalam suatu publikasi dianggap unik jika melibatkan penggunaan metode/kit uji terpisah atau uji referensi yang berbeda. Metode analisis untuk setiap evaluasi tes dibagi menjadi tiga kategori: metode evaluasi tes klasik, analisis kelas laten dan pemodelan simulasi. Banyak penelitian melaporkan beberapa perkiraan untuk HSe dan HSP, sesuai dengan kisaran titik potong atau ambang batas prevalensi infeksi dalam kelompok (WHP). Karena itu, jika perkiraan keseluruhan untuk HSe dan/atau HSP diberikan dalam hasil, ini diekstraksi, jika tidak, perkiraan yang paling relevan diekstraksi dengan catatan kaki yang menentukan alasan untuk ini dalam setiap kasus. Perhitungan HSe dan HSP dilakukan di mana publikasi tidak secara eksplisit melaporkan parameter ini tetapi data dalam hasil diperbolehkan untuk diturunkan, dan ini dicatat dalam catatan kaki jika berlaku.

Hasil

Hasil dari proses evaluasi empat tahap dijelaskan dalam Gambar 1. Secara singkat, pencarian online menggunakan WoS dan Scopus menghasilkan 531 publikasi. Selanjutnya 471 publikasi dikeluarkan (duplikat, judul yang tidak relevan, abstrak yang tidak relevan, spesies yang salah). Lima publikasi relevan tambahan ditambah dari daftar referensi makalah yang tersisa dan delapan publikasi yang relevan diidentifikasi dalam pencarian manual prosiding ICP. Tujuh puluh tiga publikasi kemudian dibaca sepenuhnya dan dinilai kelayakannya, dengan 27 kemudian dikeluarkan. Tinjauan akhir termasuk 46 publikasi, berisi 83 evaluasi tes yang relevan.

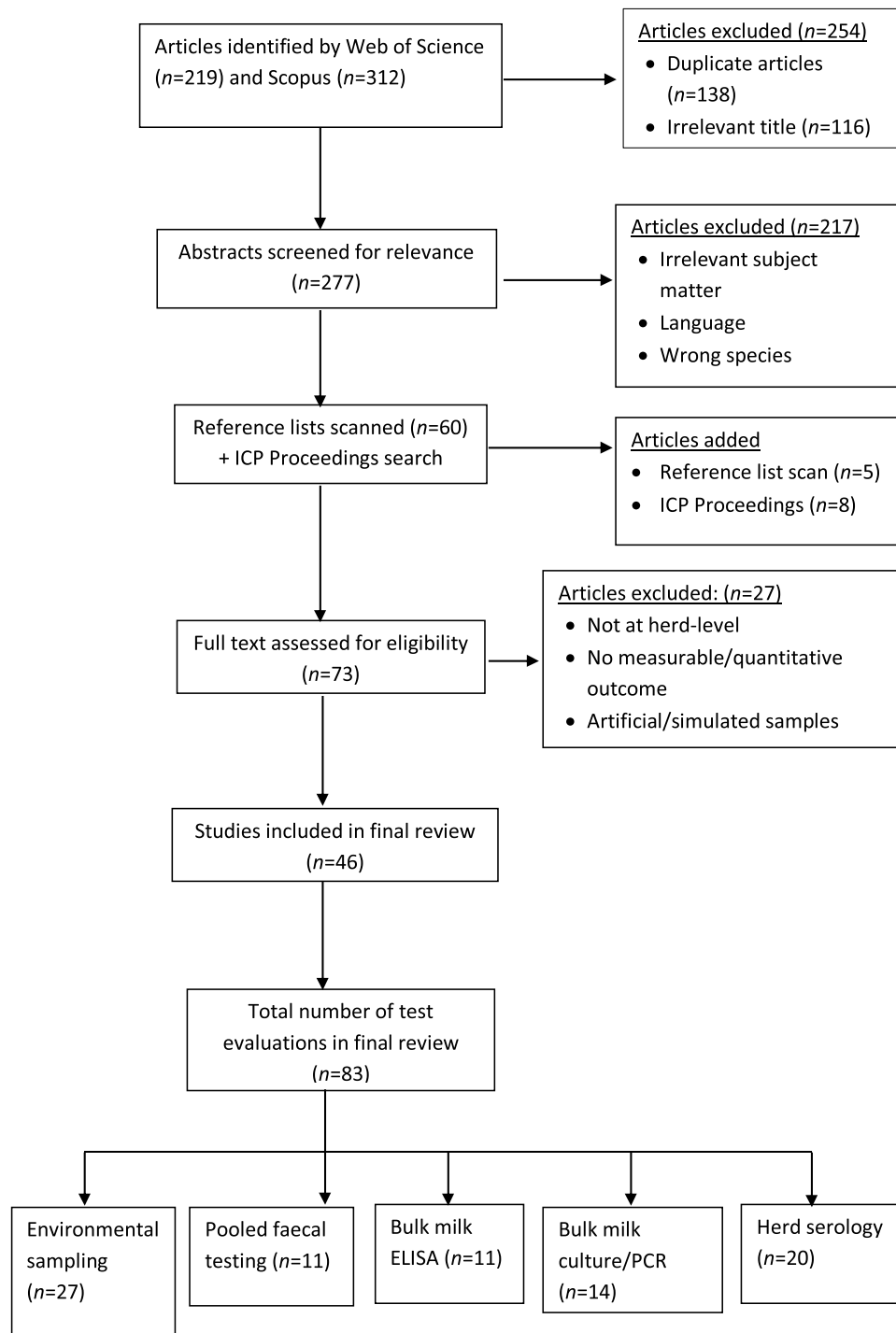
Metode tes berbasis serologi

Pengujian ELISA seluruh kawanan

Perkiraan sensitivitas kawanan (HSe) dan spesifisitas kawanan (HSp) dari studi yang menggunakan pengujian ELISA seluruh kawanan (WHT-ELISA) dirangkum dalam Tabel 1. HSe berkisar antara 40% hingga 100%, dan HSP dari 0 hingga 96%. Studi lapangan menggunakan definisi kasus dari setidaknya satu hewan seropositif untuk mendefinisikan kawanan sebagai perkiraan HSe yang dilaporkan positif antara 83 dan 100% (Tabel 1). Sebuah studi simulasi mengevaluasi WHT-ELISA (Tavorpanich dkk., 2008) melaporkan HSe dan HSP dari dua ELISA serum yang berbeda, bertingkat di berbagai ukuran sampel dan tingkat WHP. Model menentukan bahwa HSe dari WHT-ELISA relatif tinggi dibandingkan dengan strategi pengujian kawanan lainnya, tetapi HSP tidak meningkat di atas 91% dalam skenario apa pun.

Dalam semua penelitian lain dengan minimal satu hewan seropositif sebagai definisi kasus, perkiraan HSP berkisar antara 0 hingga 65,5% (Tabel 1). Mengubah definisi kasus dari kawanan positif untuk membutuhkan lebih banyak hewan seropositif meningkatkan Hsp, tetapi hanya hingga 96% (Lavers et al., 2014). Lombard dkk. (2006a) dan Laver dkk. (2014) adalah studi serupa dalam hal populasi sampel, dan menggunakan definisi kasus $\geq 2\%$ seroprevalensi dan kultur feses seluruh kawanan sebagai uji referensi standar. HSe yang dilaporkan dari kedua penelitian ini serupa (sekitar 60%). Studi yang memperkirakan HSe dari hasil pengujian ELISA individu seluruh kawanan melaporkan perkiraan HSe yang lebih tinggi daripada yang menggunakan kultur feses sebagai uji referensi (Hendrick dkk., 2005; Chaffer dkk., 2008). Menggunakan analisis kelas laten Bayesian, Masak dkk. (2009) memperkirakan HSe dan HSP masing-masing 95–100% dan 47–53%, untuk WHT-ELISA.

¹Lihat: Asosiasi Internasional untuk Paratuberculosis. www.paratuberculosis.org bersih (Diakses 21 Desember 2021).



Gambar 1. Tampilan diagram alir ng proses penyaringan dan penilaian untuk publikasi yang diidentifikasi dalam pencarian literatur.

Pengujian ELISA seluruh kawanan dengan kultur tinja lanjutan atau PCR hewan seropositif

Untuk mengatasi HSP WHT-ELISA yang tidak sempurna, beberapa penelitian mengevaluasi strategi pengujian seropositif dan hewan secara seri dengan budaya atau PCR feses. Sensitivitas tingkat kultur feses idual fekal (IFC) animasi individu telah dilaporkan menjadi 25 pada % untuk kondisi target "terjangkit" (Nielsen dan Toft, 2009) dan IFC diasumsikan memiliki 100% Hsp. Sensitivitas IFC yang rendah menyebabkan penurunan HSe dibandingkan dengan WHT-ELISA, terutama pada kawanan dengan prevalensi rendah, seperti yang ditunjukkan oleh Tavoranpanich dkk. (2008): pada WHP 5%, HSe berkisar antara 9% hingga 38% tetapi ketika WHP meningkat menjadi 16%, HSe meningkat mulai dari 22% hingga 73%.

Wells dkk. (2002) mengevaluasi strategi ini dalam studi lapangan terhadap 64 ternak sapi perah dan memperkirakan HSe 86%. Ini adalah penurunan kecil pada perkiraan 95% untuk HSe dari WHT-ELISA dalam penelitian itu. Menggunakan model simulasi yang mengevaluasi berbagai strategi penyaringan ternak nasional untuk ternak sapi perah Irlandia, Sersan dkk. (2019) memperkirakan HSe dari ELISA berbasis susu (mELISA) dan ELISA berbasis serum (sELISA) dengan pengujian tinja tindak lanjut menjadi >60% untuk kedua jenis sampel.

Pengambilan sampel serologis yang ditargetkan atau acak

Wells dkk. (2002) mengevaluasi HSe dari ELISA untuk sampel acak dari 30, 40 atau 50 hewan dalam kawanan dengan kultur tinja tindak lanjut dari

Tabel 1

Sensitivitas kawanan yang dipublikasikan (HSe) dan spesifisitas kawanan (HSp) untuk susu MAP ternak utuh (mELISA) dan ELISA serum (sELISA).

Tes dievaluasi	kawanan positif definisi	Jenis analisis	Sampel populasi	Tes Referensi	Tes referensi memotong	Hse (%)	Hsp (%)	Negara	Pengarang
SELISA (HerdChek, IDEXX)	≥ 1 seropositif satwa	Tes klasik evaluasi	64 sapi perah, kenyamanan Sampel	IFC ^{sebuah} (HEYM)	≥ 1 positif budaya tinja	95	Salah-diklasifikasikan semua 8 budaya-negatif kawanan	Amerika Serikat	Wells dkk. (2002)
SELISA (HerdChek, IDEXX)	≥ 1 seropositif satwa	Tes klasik evaluasi	50 sapi perah, bertingkat acak pilihan	SELISA (HerdChek, IDEXX)	≥ 1 seropositif satwa	88.9	42.8	Kanada	Hendrik dkk. (2005)
	≥ 2 seropositif hewan				≥ 2 seropositif hewan	82.8	79.5		
balsem (Antel Biosistem)	≥ 1 seropositif satwa	Tes klasik evaluasi		ELISA (Antel Biosistem)	≥ 1 seropositif satwa	91.9	65.5		
	≥ 2 seropositif hewan				≥ 2 seropositif hewan	86.9	94.4		
SELISA (Bukan ditentukan)	≥ 1 seropositif satwa	Simulasi model	5% WHP 10% WHP 15% WHP			40 48 56	69 69 69	Swiss	Antognoli dkk. (2005)
SELISA (Paracek, CSL)	≥ 1 seropositif satwa	Tes klasik evaluasi	35 sapi perah - bertingkat acak pilihan	IFC (beberapa metode)	≥ 1 positif budaya tinja	83.3			Lombard dkk. (2006a)
	≥ 2% seroprevalensi				≥ 1 positif budaya tinja	61.1	83.3		
balsem (Antel Biosistem)	≥ 1 seropositif satwa	Tes klasik evaluasi	35 sapi perah - bertingkat acak pilihan		≥ 1 positif budaya tinja	83.3			
	≥ 2% seroprevalensi				≥ 1 positif budaya tinja	61.1			
SELISA (HerdChek, IDEXX)	3,16% seroprevalensi (penghentian yang dioptimalkan titik)	Tes klasik evaluasi	74 sapi perah, kenyamanan Sampel	SELISA (HerdChek, IDEXX) + konfirmasi IFC ^{sebuah} (HEYM)	≥ 1 positif budaya tinja	70.4	83.3	Israel	Chaffer dkk. (2008)
SELISA (HerdChek, IDEXX)	≥ 1 seropositif satwa	Simulasi model	19 sapi perah, kenyamanan Sampel			82- 100 ^b	≤ 21	Amerika Serikat	Tavornpanich dkk. (2008)
SELISA (Paracek, CSL)	≥ 1 seropositif satwa					54- 100 ^b	≤ 91		
SELISA (Mengapa)	≥ 1 seropositif satwa	Bayesian analisis	136 sapi perah, kenyamanan Sampel	BMT-PCR (IS900) + PFC ^{sebuah} (Melakukan peptangan ESP)	≥ 1 positif hasil tes	95- 100	47- 53	Serikat Kerajaan	Masak dkk. (2009)
balsem (Paracek2, Prionik)						59	80		Laver dkk. (2014)
balsem (IDEXX)	≥ 2% seroprevalensi	Tes klasik evaluasi	34 sapi perah, kenyamanan Sampel	PFC berulang (ESP Untuk-JEM)	≥ 1 positif budaya tinja	56	96	Kanada	
balsem (IDVet)						63	92		

WHP, prevalensi infeksi dalam kawanan; sELISA, ELISA berbasis serum; mELISA, ELISA berbahan dasar susu; IFC, budaya tinja individu; HEYM, Medium Kuning Telur Herrold; BMT-PCR, PCR tangki susu curah; PFC, kultur feses yang terkumpul.

^{sebuah}Uji konfirmasi tidak digunakan atau tidak ditentukan.

^bRentang hasil dilaporkan untuk tiga tingkat WHP (5%, 16% dan 35%) dan lima ukuran sampel (30, 60, 90, 120 dan 150 hewan).

^cHasil dilaporkan untuk tiga seroprevalensi cut-off (1%, 2% dan 3%) dalam publikasi; 2% cut-off dipilih karena ini adalah cut-off point yang paling umum dilaporkan dalam literatur.

hewan seropositif. HSe untuk pengambilan sampel 30 hewan diperkirakan 61%, meningkat menjadi 68% dan 72% ketika masing-masing 40 dan 50 hewan diambil sampelnya. Sebuah studi simulasi oleh [Antognoli dkk. \(2005\)](#) memperkirakan HSe dan HSP masing-masing 20-32% dan 84%, ketika 50% sapi berusia di atas tiga tahun diuji ELISA per kawanan.

[Tavornpanich dkk. \(2006\)](#) melaporkan probabilitas deteksi 23% untuk kawanan dengan prevalensi sebenarnya 9%, ketika 30 sapi dipilih secara acak untuk ELISA dan kultur tinja lanjutan. Ini meningkat menjadi 47% untuk kawanan dengan 20% prevalensi sebenarnya. Probabilitas deteksi meningkat 1,1- menjadi 1,6 kali lipat ketika melakukan pengambilan sampel yang ditargetkan dari 30 ekor sapi di laktasi ketiga. Penulis penelitian tidak menggunakan istilah "sensitivitas kawanan" karena output dari simulasi berasal dari satu kawanan. Demikian pula, sebuah studi oleh [Hanks dkk. \(2014\)](#) membandingkan pengambilan sampel acak dengan sampel yang ditargetkan untuk serologi susu dan memperkirakan

probabilitas mendeteksi sapi seropositif meningkat dari 84% menjadi 95% saat menggunakan sampel yang ditargetkan berdasarkan data produksi susu.

Pengujian ELISA tangki susu massal

Estimasi HSe dan HSP dari investigasi ELISA tangki susu curah (BMT) dirangkum dalam: [Meja 2](#). Dengan pengecualian satu studi, Hsp dari BMT ELISA untuk MAP dilaporkan antara 95- 100%, bila menggunakan sampel untuk rasio positif (S/P) nilai cut-off yang direkomendasikan oleh produsen. [Pescara dkk. \(2017\)](#) melaporkan perkiraan HSP rendah sebesar 53 dan 71% untuk dua kit ELISA BMT, yang dapat dijelaskan dengan definisi kasus sebagai kawanan dengan >seroprevalensi 0%, dan titik batas didefinisikan sebagai nilai ambang OD terkoreksi yang sesuai dengan kategori seroprevalensi 0%. Sebaliknya, [mobil van](#)

Meja 2

Sensitivitas kewanan (HSe) dan spesifisitas kewanan (HSp) yang dipublikasikan untuk pengujian ELISA tangki susu curah (BMT).

Tes dievaluasi	Batas uji	Jenis analisis	Populasi sampel	Tes referensi	Potongan uji referensi-titik keluar	HSe (%)	Hsp (%)	Negara	Pengarang
BMT ELISA (non-komersial disesuikan ELISA)	ODc: 0,02 ^{sebuah} ODc: 0,08 ^{sebuah}	Tes klasik evaluasi	45 dikonfirmasi-terinfeksi dan 96 diduga non-ternak sapi perah yang terinfeksi	Tidak ada		97	83	Denmark	Nielsen dkk. (2000)
BMT ELISA (Mengapa)	pabrikasi memotong	Tes klasik evaluasi	52 ELISA-positif sapi perah	SELISA (Mengapa)	Tidak ada yang diberikan	30.1		Italia	Arrigoni dkk. (2007)
BMT ELISA (Mengapa)	Batas teoretis: 95% Sp Batas teoretis: 99% Sp	Tes klasik evaluasi	70 yang terinfeksi + 15 produk susu yang tidak terinfeksi kewanan	Tidak ada		13		Australia	Paku dkk. (2007b)
BMT ELISA (Prionik)	Batas teoretis: 99% Sp 30% S/P					8.6			
BMT ELISA (Mengapa)	12,5% S/P	Tes klasik evaluasi	383 sapi perah seleksi acak	balsem (Mengapa)	≥2% seroprevalensi ^b ≥3% seroprevalensi ^b ≥2% seroprevalensi ^b ≥3% seroprevalensi ^b	17	99	Itu Belanda	dari Weering dkk. (2007)
BMT ELISA (Mengapa)	30% S/P 12,5% S/P	Tes klasik evaluasi	110 MAP bersertifikat-peternakan sapi perah gratis	Tidak ada		28	99		
BMT ELISA (Mengapa)	0,1 kepadatan optik	Tes klasik evaluasi	170 sapi perah, sampel kenyamanan	Gabungan BMT ELISA (Penuang) + PCR (TaqMan)	≥1 hasil tes positif untuk BMT	39	96	Amerika Serikat	Wilson dkk. (2010)
BMT ELISA (IDEXX / Bertanya)	Berubah kepadatan optik:>3	Tes klasik evaluasi	203 sapi perah, sampel kenyamanan	SELISA (IDEXX + Parachek 2, Prionik)		85	96		
BMT ELISA (Parachek 2, Prionik)	Berubah kepadatan optik: >(-1.44)					100	100		
BMT ELISA (IDEXX / Bertanya)	20% S/P 10% S/P 5% S/P	Tes klasik evaluasi	189 sapi perah, sampel kenyamanan	SELISA (IDEXX/ Bertanya)	>0% seroprevalensi ^d	76.1	70.5	Spanyol	Penangkapan ikan dkk. (2017)
BMT ELISA (Mengapa)	pabrikasi memotong	Simulasi model	Kewanan susu nasional populasi			78.9	53		
						16	95	Perancis	Delafosse dkk. (2019)
						33	95		
						53	75	Republik Irlandia	Sersan dkk. (2019)
						8			

S/P, sampel terhadap rasio positif; ODc, kerapatan optik terkoreksi; BMT, tangki susu curah; WHP, prevalensi infeksi dalam kewanan; sELISA, ELISA berbasis serum; mELISA, ELISA berbasis dasar susu; Sp, Kekhususan.

^asebuahPublikasi melaporkan kisaran estimasi sensitivitas untuk ODc cut-off yang berbeda; mengekstrak perkiraan untuk ODc yang dioptimalkan (0,02) dan ODc terendah untuk memberikan 100% Sp (0,08).

^bPublikasi melaporkan berbagai perkiraan sensitivitas untuk ambang batas WHP yang berbeda, perkiraan yang dipilih untuk dua yang paling sering dilaporkan: 2% dan 3%.

^cDihitung dariMeja 2publikasi.

^dPublikasi melaporkan kisaran perkiraan sensitivitas untuk rentang WHP yang berbeda, sensitivitas keseluruhan untuk setiap kategori S/P dilaporkan di sini.

Weering dkk. (2007) melaporkan spesifisitas 100% dengan kit ELISA yang sangat mirip yang diuji pada 110 ternak bersertifikat bebas MAP.

Perkiraan sensitivitas kewanan untuk BMT ELISA bervariasi antara 8–30% saat menggunakan rasio S/P yang direkomendasikan pabrik (Tabel 1), dan biasanya dilaporkan relatif terhadap ambang batas WHP. Perkiraan yang berasal dari ambang batas WHP yang lebih tinggi tidak termasuk dalam Tabel 1 tapi HSe adalah >50% pada level WHP >5% dalam dua penelitian menggunakan kit ELISA Pourquier (van Weering dkk., 2007; Delafosse dkk., 2019) yang melaporkan Sp tinggi (≥ 95%). HSe dilaporkan meningkat hingga 85% ketika nilai S/P diturunkan, namun hal ini menurunkan HSP (Nielsen dkk., 2000; van Weering dkk., 2007; Delafosse dkk., 2019). Efek ini tidak seragam di semua evaluasi karena keduanya van Weering dkk (2007) dan Delafosse dkk. (2019) menemukan penurunan nilai batas S/P (menyebabkan peningkatan HSe) tidak terkait dengan penurunan HSP.

Metode uji deteksi organisme

Tes tinja individu

Kultur tinja individu (IFC) atau pengujian PCR untuk MAP sering digunakan sebagai tes referensi untuk mengukur kinerja tes diagnostik lainnya dan beberapa penelitian telah mengukur HSe dari pengujian feses individu. Tavornpanich dkk. (2008) memperkirakan HSe IFC berkisar dari 44 hingga

100%, meningkat seiring dengan bertambahnya ukuran sampel dan WHP. Dalam populasi teoritis ternak sapi perah Swiss yang mengandung 33 sapi, HSe dari seluruh kewanan IFC diperkirakan 50%, 75% dan 87% untuk WHP masing-masing 5%, 10% dan 15% (Antognoli dkk., 2005).

Tes feses yang terkumpul

Estimasi HSe dan HSP dari penelitian menggunakan pooled faecal testing (PFT) dirangkum dalam Tabel 3. Estimasi HSe berkisar antara 26 hingga 100%, dan estimasi HSP berkisar antara 98 hingga 100%. Ukuran kumpulan yang dilaporkan bervariasi tetapi kumpulan dari lima sampel individu adalah yang paling umum (Kalis et al., 2000; Wells et al., 2003; Tavornpanich dkk., 2008; Masak dkk., 2009; Sersan dkk., 2019). Estimasi HSe dari studi lapangan menggunakan IFC sebagai uji referensi relatif tinggi, berkisar antara 50 hingga 100%, dengan rata-rata HSe sebesar > 70% (Kalis et al., 2000; Wells et al., 2003; Tavornpanich dkk., 2004; van Schaik dkk., 2007; Cook dkk., 2009). Hanya satu studi (Keller et al., 2014) membandingkan penggunaan PCR dan kultur untuk menguji feses yang dikumpulkan untuk MAP. Dalam penyelidikan terhadap 23 sapi perah Swiss, 18 di antaranya positif kultur menggunakan sampel feses yang dikumpulkan dan 18/12 juga positif menggunakan PCR feses yang dikumpulkan (sensitivitas relatif 66%). Dalam studi yang membandingkan beberapa tes skrining tingkat kelompok dalam populasi sampel yang sama, pengujian feses yang dikumpulkan memiliki HSe yang dilaporkan tertinggi setelah pengujian feses individu ketika mempertimbangkan tes dengan 100% HSP

Tabel 3

Sensitivitas kewanan yang dipublikasikan (HSe) dan spesifisitas kewanan (Hsp) untuk kultur tinja yang dikumpulkan (PFC) dan PCR tinja yang dikumpulkan (PF-PCR).

Tes dievaluasi	Jenis analisis	Populasi sampel	Tes referensi	Referensi batas uji titik	HSe (%)	Hsp (%)	Negara	Pengarang
PFC (kumpulan 5, dimodifikasi Lowenstein-Jensen)	Tes klasik evaluasi	11 sapi perah, infeksi dikonfirmasi	IFC (dimodifikasi Lowenstein-Jensen)	≥ 1 budaya-positif satwa	73		Itu Belanda	Kalis dkk. (2000)
PFC (berbagai ukuran kolam, Trek ESP ^b)	Simulasi model	≤ 5% WHP (100 sapi) ≤ 5% WHP (250 sapi) ≤ 5% WHP (≥ 500 sapi) > 5% WHP (semua ukuran kewanan):			53 ^{ab} 88 ^{ab} ≥ 90 ^{ab} > 90 ^{ab}		Tidak ditentukan	Van Schaik dkk (2003)
PFC (kolam 5, HEYM ^b) ^c	Tes klasik evaluasi	24 sapi perah, sampel kenyamanan	IFC (HEYM ^b)	≥ 1 budaya-positif satwa	94		Amerika Serikat	Wells dkk. (2003)
PFC kewanan parsial (kumpulan 10, HEYM ^b + ESP Untuk-JEM)	Tes klasik evaluasi	29 sapi perah, sampel kenyamanan, 60 sampel hewan per kewanan	IFC (HEYM ^b + ESP Untuk-JEM)	≥ 1 budaya-positif satwa	81		Amerika Serikat	Tavornpanich dkk. (2004)
PFC (kumpulan 5, jangam tes ditentukan)	Simulasi model	5% WHP 10% WHP 15% WHP			47 71 84		Swiss	Antognoli dkk. (2005)
PFC kewanan parsial (kumpulan 5, HEIM)	Tes klasik evaluasi	12 sapi perah, sampel kenyamanan, 50 sampel hewan per kewanan	IFC (HEYM)	≥ 1 budaya-positif satwa	50 ^d	100	Chili	van Schaik dkk (2007)
PFC kewanan parsial (kumpulan 10, HEIM)	Simulasi model	5% WHP 16% WHP 35% WHP		≥ 1 positif hasil tes	26– 78 ^e 68– 100 ^e 93– 100 ^e		Amerika Serikat	Tavornpanich dkk. (2008)
PFC (kolam 5, Trek ESP ^b)	Bayesian analisis	136 sapi perah, sampel kenyamanan	sELISA (Pourquier) + BMT-PCR (IS900)	≥ 1 positif hasil tes	54– 69	98– 100	Serikat Kerajaan	Masak dkk. (2009)
PF-PCR (berbagai ukuran kolam, f57 berbasis urutan PCR)	Tes klasik evaluasi	23 sapi perah, sampel kenyamanan	PFC (Lowenstein-Jensen + HEIM)	≥ 1 positif hasil PCR	66		Swiss	Keller dkk. (2014)
PFC/PF-PCR (kumpulan 5, tes tidak ditentukan)	Simulasi model	Kewanan susu nasional populasi		≥ 1 positif hasil tes	83	100	Republik Irlandia	Sersan dkk. (2019)

WHP, prevalensi infeksi dalam kewanan; IFC, budaya tinja individu; HEYM, Medium Kuning Telur Herrold; sELISA, ELISA berbasis serum; PFC, kultur feses yang terkumpul; PF-PCR, PCR feses yang dikumpulkan; BMT-PCR, PCR tangki susu curah.

^asebuah Hasil dirangkum dari Meja 2 dari kertas.

^bUji konfirmasi tidak digunakan atau tidak ditentukan.

^cPengambilan sampel feses kelompok sebagian juga dievaluasi dalam penelitian, hasil tidak ditampilkan.

^dMenghitung HSe dari data di Tabel 1 publikasi.

^eRangkuman hasil HSe sebagai rentang pita WHP di berbagai ukuran kewanan yang dilaporkan dalam artikel.

(Tavornpanich dkk., 2008; Sersan dkk., 2019).

Kultur tangki susu massal, PCR, dan pengujian fag

Deteksi langsung MAP dari sampel BMT telah dievaluasi menggunakan kultur, PCR dan pengujian fag, dan hasilnya dirangkum dalam Tabel 4. Estimasi HSe berkisar antara 0 hingga 85%, dan estimasi HSP berkisar antara 50 hingga 100%. Tes ini mendeteksi MAP yang dilepaskan ke dalam susu oleh sapi yang terinfeksi dan dari kontaminasi feses selama proses pemerahan. Dua studi mengevaluasi potensi penggunaan filter susu sebagai sumber untuk mengidentifikasi MAP dan melaporkan perkiraan HSe yang relatif tinggi sebesar 85% menggunakan PCR (Slana dkk., 2012) dan 61,5% menggunakan kultur (Cashman dkk., 2008), meskipun kedua penelitian memiliki ukuran sampel yang kecil. Evaluasi BMT-PCR adalah yang paling umum dan hasil HSe sangat bervariasi, dari 3 hingga 77% di lima studi (Tabel 4). Dalam sebuah studi oleh Stabli dkk. (2002), BMT-PCR dari 61 sapi perah memiliki HSe 77% dengan IFC sebagai uji referensi, dibandingkan dengan kultur BMT yang mengembalikan semua hasil negatif pada kelompok yang sama. Foddai dan Hibah (2017) mengevaluasi kinerja uji tipe fag untuk mendeteksi MAP di tingkat kelompok. Sensitivitas dari tiga metode uji terpisah untuk mendeteksi MAP dalam sampel susu curah (pemisahan magnetik yang dimediasi peptida dengan PCR, kultur dan uji fag) serupa, berkisar antara 45 hingga 59%.

Pengambilan sampel lingkungan

Hasil HSe dan HSP untuk sampling lingkungan (ES) dirangkum dalam: Tabel 5. ES melibatkan pengujian pupuk kandang dan bubur komposit

sampel menggunakan kultur feses atau PCR. Protokol yang paling umum digunakan adalah pengumpulan enam sampel komposit dari kandang sapi utama, penyimpanan kotoran dan area lain seperti tempat pengumpulan dan kandang sapi sakit untuk pengujian oleh budaya. Perkiraan HSe untuk enam protokol sampel komposit ini berkisar antara 24% hingga 79%, dan HSP dalam satu penelitian adalah 99%. Penggunaan penyeka boot telah diselidiki dalam sejumlah penelitian (Eisenberg dkk., 2013; Serigala et al., 2016; Hahn dkk., 2017), dengan perkiraan HSe mulai dari 44 hingga 91%. Tiga studi melaporkan perkiraan untuk HSe dari ES menggunakan PCR dan hasilnya bervariasi. Khol dkk. (2009) melaporkan HSe hanya hingga 18% menggunakan PCR pada sampel lingkungan di 11 kewanan yang terinfeksi. Namun, HSe budaya sampel lingkungan juga sangat rendah dalam penelitian ini dibandingkan dengan yang lain. Hahn dkk. (2017) mengevaluasi dua kit PCR pada sampel swab boot dan sampel kotoran cair dengan HSe berkisar antara 61-68%, dan Hsp antara 88-100%. Delafosse dkk. (2019) dalam sebuah penelitian besar terhadap 192 peternakan sapi perah melaporkan HSe sebesar 44% dan 72% saat menggunakan ambang siklus (Ct) masing-masing 35 dan 45, pada satu sampel lingkungan komposit per kewanan. Hsp relatif rendah pada 90% dan 75%, masing-masing.

Diskusi

Tidak ada tes standar referensi tunggal untuk MAP, dan strategi pengujian kewanan yang dipilih akan tergantung pada tujuan pembuat keputusan (pemilik ternak, praktisi veteriner dan pemangku kepentingan industri) yang terlibat dalam pengendalian penyakit. Estimasi sensitivitas dan

Tabel 4

Sensitivitas kawanan (HSe) dan spesifisitas kawanan (HSp) yang dipublikasikan untuk pengujian langsung MAP dari tangki susu curah (BMT).

Tes dievaluasi	Jenis analisis	Populasi sampel	Tes referensi	Potongan uji referensi-titik keluar	HSe (%)	Hsp (%)	Negara	Pengarang
budaya BMT (HEYM ^{sebuah})	Tes klasik evaluasi	61 produk susu seropositif kawanan	Sebagian kawanan IFC (HEYM ^{sebuah})	≥ 1 kultur feses positif	Tidak positif hasil		Amerika Serikat	Stabil dkk. (2002)
BMT PCR (Bersarang protokol PCR)	Tes klasik evaluasi	29 sapi perah, sampel kenyamanan	IFC (tidak ditentukan)	≥ 1 kultur feses positif	77		Amerika Serikat	Jayaroo dkk. (2004)
BMT PCR (IS900)	Tes klasik evaluasi	70 ternak sapi perah yang terinfeksi, sampel rangkap tiga dari masing-masing	tidak ada	≥ 1 seropositif satwa	21 ^b	50 ^{sebuah}	Amerika Serikat	Jayaroo dkk. (2004)
BMT PCR (IS900)	Tes klasik evaluasi	20 sapi perah, sampel kenyamanan	sELISA (Pourquier)	≥ 1 positif lingkungan Sampel	61.5 ^c		Australia	Gwozdz dkk. (2007a)
Kultur saringan susu (IMS + HEIM)	Tes klasik evaluasi	56 sapi perah, sampel kenyamanan	Budaya ES berulang (HEYM)	≥ 1 tes positif	42		Irlandia	Kasir dkk. (2008)
BMT PCR (IS900)	Bayesian LCA	136 sapi perah sampel kenyamanan	sELISA (Pourquier) + PFC (Trek ESP ^{sebuah})		13– 51	57– 82	Denmark	Herthnek dkk. (2008)
BMT PCR (berbagai kit waktu nyata)	Tes klasik evaluasi	37 seropositif massal sampel susu	BMT ELISA (IDVet)		3		Serikat Kerajaan	Masak dkk. (2009)
BMT PCR (bersarang PCR)	Tes klasik evaluasi	170 sapi perah, sampel kenyamanan	Gabungan BMT ELISA (Mengapa) + PCR (TaqMan)	≥ 1 tes positif pada kedua tes	22		Italia	Ricchi dkk. (2009)
BMT PCR (TaqMan)	Tes klasik evaluasi	15 sapi perah, sampel kenyamanan	IFC (Tidak ditentukan) setiap tahun	≥ 1 hasil positif pada kedua tes	29 ^d		Amerika Serikat	Wilputra dkk. (2010)
Saringan dan saringan susu kerokan PCR (TaqMan)	Tes klasik evaluasi	22 sampel susu curah dari ternak yang terkena dampak JD	tidak ada	≥ 1 kultur feses positif	85.1	100	Ceko Republik	Slana dkk. (2012)
BMT PMS-PCR (ADALAH900+H57)	Tes klasik evaluasi				45.4			
BMT PMS-budaya (MGIT)	Tes klasik evaluasi				50		Serikat Kerajaan	Foddai dan Hibah (2017)
BMT PMS-fag					59.1			

pengujian kadar logam

PMS, pemisahan magnetik yang dimediasi peptida; PCR BMT, PCR tangki susu curah; IMS, Pemisahan imunomagnetik; IFC, budaya tinja individu; HEYM, Medium Kuning Telur Herrold; MGIT, Tabung Indikator Pertumbuhan Mycobacteria; SELISA, ELISA berbasis serum.

sebuah Uji konfirmasi tidak digunakan atau tidak ditentukan.

b Hasil dari Meja 2 publikasi.

c Hasil dihitung dari data yang terdapat pada paragraf “Kesepakatan antara hasil tes”.

d Hasil dihitung dari Meja 2 publikasi.

spesifisitas tes diagnostik MAP membantu dalam proses pengambilan keputusan dan dapat digunakan oleh peneliti sebagai masukan untuk pemodelan simulasi (Nielsen dan Toft, 2008). HSe dan HSP dapat diterapkan pada perkiraan tingkat kepercayaan kebebasan kelompok dan prevalensi tingkat kelompok infeksi MAP dalam suatu populasi. Biaya relatif dan kepraktisan pengujian juga merupakan faktor utama yang mempengaruhi pilihan metode uji kawanan. Sementara budaya dan PCR lebih mahal daripada ELISA pada basis per sampel, metode deteksi langsung seperti sampling lingkungan mungkin lebih hemat biaya daripada skrining serologis dalam program skrining kawanan nasional (Sersan dkk., 2019).

Sampel susu individu dan sampel serum biasanya digunakan untuk pengujian seluruh kawanan untuk MAP, karena biayanya yang relatif rendah dibandingkan dengan kultur feses atau PCR dan perkiraan HSe yang relatif tinggi. Namun, perkiraan Hsp yang rendah dan akibatnya banyak hasil positif palsu menjadikan ini kurang praktis sebagai pilihan untuk mengidentifikasi kawanan yang terinfeksi (Tabel 1). Pilihan ambang seroprevalensi untuk menentukan kawanan yang terinfeksi dapat berdampak pada HSe dan HSp, dan dalam tinjauan sistematis ini, ambang batas yang dilaporkan bervariasi dari satu hewan seropositif hingga seroprevalensi 3%. Spesifisitas serologi kawanan yang rendah dapat diatasi dengan pengujian feses serial pada hewan seropositif, meskipun opsi ini memiliki kelemahan yaitu memerlukan penanganan dan pengambilan sampel hewan tambahan.

Evaluasi ELISA tangki susu curah sering kali menilai kinerja pengujian menggunakan titik batas rasio S/P yang berbeda. Ketika mempertimbangkan hanya evaluasi yang menggunakan cut-off yang direkomendasikan pabrikan, HSe rendah mulai dari 8% hingga 30% sementara Hsp relatif tinggi (95– 100%) di empat studi (Meja 2). Studi yang meneliti metode uji langsung pada sampel BMT sebagian besar menggunakan metode PCR. Perkiraan HSe untuk pengujian PCR BMT umumnya di bawah 50% dan perkiraan HSP adalah

tiba-tiba rendah pada 50% dan 57– 82% (Jayaroo dkk., 2004; Cook dkk., 2009). HSP yang rendah mungkin karena sensitivitas tes referensi yang rendah, spesifisitas tes PCR yang rendah atau kontaminasi sampel. Hanya satu laporan yang mengevaluasi pengujian fag BMT di tingkat kelompok. Seperti yang diulas oleh Hibah (2021) tes fag memiliki potensi untuk digunakan sebagai tes diagnostik baru, tetapi lebih banyak penelitian yang mengevaluasi sensitivitas dan spesifisitas tes ini pada berbagai matriks sampel diperlukan.

Pengujian feses individu sering digunakan sebagai tes referensi sehingga tidak mengejutkan bahwa pengujian feses yang dikumpulkan memiliki perkiraan tertinggi yang dilaporkan untuk HSe dan HSP, dalam studi simulasi yang membandingkan berbagai metode pengujian (Tabel 3). Protokol yang paling umum untuk pengambilan sampel lingkungan menggunakan kultur feses adalah enam sampel lingkungan komposit dan perkiraan HSe dari studi lapangan berkisar antara 40 hingga 79%. Sebagian besar sampel lingkungan positif ditemukan di area penyimpanan kotoran dan gang-gang utama kandang sapi (Raizman dkk., 2004; Pilar et al., 2009) dan sebagian besar penelitian memasukkan kedua lokasi ini dalam protokol pengambilan sampel mereka. Relatif sedikit penelitian yang menggunakan pengujian PCR ketika mengevaluasi PFT atau ES untuk pengujian tingkat kelompok. Meskipun demikian, pengujian PCR seringkali merupakan metode yang lebih disukai untuk menguji sampel feses daripada kultur. Perlu dicatat juga bahwa hanya ada satu publikasi yang diidentifikasi dalam tinjauan sistematis ini yang menyelidiki kinerja uji tingkat kawanan untuk MAP dalam kawanan sapi (Klawonn et al., 2016).

Sebagian besar publikasi menggunakan asumsi metode referensi standar emas untuk memperkirakan HSe dan HSP, yang dirujuk dalam tinjauan sistematis ini sebagai evaluasi uji klasik. Kerugian dari pendekatan ini dalam penelitian paratuberkulosis telah didokumentasikan dengan baik, dan metode standar non-emas seperti model kelas laten Bayesian menjadi lebih umum untuk memperkirakan sensitivitas, spesifisitas dan

Tabel 5

Sensitivitas kewanan (HSe) dan spesifisitas kewanan (HSp) untuk pengambilan sampel lingkungan (ES) untuk MAP telah dipublikasikan.

Tes dievaluasi	Jenis analisis	Sampel populasi	Tes referensi	Tes referensi titik potong	HSe (%)	Hsp (%)	Negara	Pengarang
ES-budaya (berbagai jumlah sampel per peternakan, HEYM ^{sebuah})	Tes klasik evaluasi	108 sapi perah, kenyamanan Sampel	PFC kewanan parsial (hingga 100 hewan, HEYM ^{sebuah}) Infeksi MAP yang teridentifikasi sebelumnya	≥1 positif PFC	94 78		Amerika Serikat	Raizman dkk. (2004)
ES-budaya (3 sampel per pertanian, HEYM)	Tes klasik evaluasi	23 sapi perah, kenyamanan Sampel	IFC + PFC historis (60 hewan/kewanan, beragam metode budaya) SELISA (≥ 60 hewan per kewanan, HerdCheck, IDEXX)	≥1 positif hasil tes ≥2 seropositif hewan	87,5 ^b 80 ^b		Amerika Serikat	Berghaus dkk. (2006)
ES-budaya (5 sampel per pertanian, berbagai budaya metode)	Tes klasik evaluasi	98 sapi perah, kenyamanan Sampel	IFC (berbagai budaya metode) SELISA (Paracheck) mELISA (Antel Biosystems)	≥1 positif hasil tes	76 76 71		Amerika Serikat	Lombard dkk. (2006b)
ES-budaya (6 sampel per kompor, HEYM):	Simulasi model	5% WHP 16% WHP 35% WHP			24 99 100		Amerika Serikat	Tavornpanich dkk. (2008)
ES-budaya (berbagai jumlah sampel per kewanan, HEYM)					27.3– 45.5			
ES-PCR (berbagai nomor sampel per kewanan, Qiagen)	Tes klasik evaluasi	11 produk susu yang terinfeksi kewanan	Status infeksi sebelumnya		≤18		Austria	Khol dkk. (2009)
ES-budaya (berbagai jumlah sampel per kewanan, berbagai budaya metode)	Tes klasik evaluasi	7 produk susu yang terinfeksi kewanan	IFC diulang (berbagai metode budaya)	≥1 positif hasil IFC	74 ^d		Amerika Serikat	Pillars dkk. (2009)
ES-budaya (2 sampel per kewanan, dimodifikasi Lowenstein-Jensen ^{sebuah})	Tes klasik evaluasi	246 sapi perah, kenyamanan Sampel	mELISA (tes tidak ditentukan) + konfirmasi IFC (diubah Lowenstein-Jensen ^{sebuah})	≥1 positif hasil IFC	95		Itu Belanda	Weber dkk. (2009)
ES-budaya (6 sampel per kewanan, HEYM ^{sebuah})	Tes klasik evaluasi	3 produk susu yang terinfeksi kewanan	IFC berulang (HEYM ^{sebuah})	≥1 positif hasil	40		Amerika Serikat	Smith dkk. (2011)
ES-budaya (berbagai jumlah sampel per kewanan, HEYM)	Tes klasik evaluasi	4 produk susu yang terinfeksi kewanan	Status infeksi sebelumnya berdasarkan IFC		90.8 ^e		Jerman	Eisenberg dkk. (2013)
ES-budaya (6 sampel per kewanan, Trek ESP)	Tes klasik evaluasi	32 sapi perah, kenyamanan Sampel	PFC berulang (Trek ESP)	≥1 positif hasil	71		Kanada	Laver dkk. (2013)
ES-budaya (6 sampel per pertanian, Trek ESP)	Tes klasik evaluasi	82 sapi perah, kenyamanan Sampel	ES diulang (gabungan hasil dari 3 kejadian sampling)	≥1 positif hasil ES			Kanada	Serigala dkk. (2014)
ES-kultur (1– 14 sampel per pertanian, budaya metode tidak ditentukan)	Tes klasik evaluasi	20 ekor sapi, kenyamanan Sampel	IFC (metode kultur tidak ditentukan)	≥1 positif hasil IFC	64.3		Jerman	Klawon dkk. (2016)
ES-budaya (6 sampel per kewanan, Trek ESP)	Bayesian LCA	102 sapi perah, kenyamanan Sampel	ES-culture (penyeka boot, Trek ESP)	≥1 positif hasil ES	79		Kanada	Serigala dkk. (2016)
ES-kultur (2 penyeka boot per kewanan, Trek ESP)			ES-budaya (Trek ESP)	≥1 positif hasil ES	44			
ES-kultur (7 sampel + 2 sampel feses yang terkumpul dari sapi yang sakit/curus, MGIT)	Tes klasik evaluasi	24 sapi perah, kenyamanan Sampel	Semua hasil IFC/ES dari 24 bulan sebelumnya Hanya IFC bersamaan (MGIT)	≥1 positif Hasil IFC/ES ≥1 positif IFC	32 ^f 50 ^f		Kanada	Arango-Sabogal dkk. (2016)
ES-PCR (3 penyeka boot per kewanan, VetMAX)			Status infeksi sebelumnya berdasarkan IFC	≥1 positif IFC	61.4	100		
ES-PCR (3 penyeka boot per kewanan, Adiavet)	Tes klasik evaluasi	58 terinfeksi dan 19 diduga tidak terinfeksi sapi perah	Status infeksi sebelumnya berdasarkan IFC	≥1 positif IFC	65.5	94.4	Jerman	Hahn dkk. (2017)
ES-PCR (1 pupuk cair sampel, VetMAX)			Status infeksi sebelumnya berdasarkan IFC	≥1 positif IFC	62.8	94.1		
ES-PCR (1 pupuk cair sampel, Adivet)			sELISA (Pourquier/IDEXX)		67.9	88.2		
					72	75	Perancis	

(bersambung di halaman berikutnya)

Tabel 5(lanjutan)

Tes dievaluasi	Jenis analisis	Sampel populasi	Tes referensi	Tes referensi titik potong	HSe (%)	Hsp (%)	Negara	Pengarang
ES-PCR (Ambang batas Ct 45) (1 sampel, Adivet)	Tes klasik evaluasi	192 sapi perah, kenyamanan Sampel		≥ 1 seropositif satwa	44	90		Delafosse dkk. (2019)
ES-PCR (ambang Ct 35) (1 sampel, Adivet)	ES-budaya (6 sampel, budaya metode tidak ditentukan)	Simulasi model	Data populasi ternak nasional			68		Republik Irlandia

Sersan dkk. (2019)

ES-budaya, sampling lingkungan dengan budaya; ES-PCR, sampling lingkungan dengan PCR; Ct, ambang siklus; IFC, budaya tinja individu; PFC, kultur feses yang terkumpul; HEYM, Medium Kuning Telur Herrold; MGIT, Tabung Indikator Pertumbuhan Mycobacteria; sELISA, ELISA berbasis serum; mELISA, ELISA berbasis dasar susu.

^aUji konfirmasi tidak digunakan atau tidak ditentukan.

^bMenghitung HSe dari data diMeja 2 dalam publikasi.

^cRentang hasil HSe yang dilaporkan untuk ES, data yang diekstraksi hanya untuk 6 sampel karena ini adalah protokol pengambilan sampel yang paling umum dilaporkan untuk ES.

^dMenghitung HSe dari data diMeja 2; berdasarkan perbandingan cross-sectional dari kejadian pengambilan sampel di semua kelompok.

^eMenghitung HSe dari data diTabel 1, rata-rata persentase swab boot positif per kawanan.

^fMenghitung HSe dari data diMeja 2, berdasarkan perbandingan cross-sectional dari kejadian pengambilan sampel di semua kelompok.

prevalensi. Sementara metode kelas laten memerlukan pendekatan yang berbeda dalam desain studi dari evaluasi tes klasik untuk memastikan asumsi yang mendasari model terpenuhi, mereka dapat memberikan hasil yang lebih andal dan dapat digeneralisasikan. Untuk meningkatkan kegunaan evaluasi uji untuk MAP, metode kelas laten harus dipertimbangkan sebagai pendekatan statistik standar untuk estimasi sensitivitas dan spesifisitas. Pemodelan simulasi jarang digunakan untuk memperkirakan HSe dan HSP, dan kekokohan metode dan input yang digunakan untuk model tersebut dapat mempengaruhi keandalan hasil mereka. Model berdasarkan data populasi yang kuat seperti yang diterbitkan oleh Sersan dkk. (2019) menyediakan data yang dapat diandalkan tanpa adanya studi lapangan yang besar, sedangkan model yang menggunakan sebagian besar data masukan teoritis dapat menghasilkan hasil yang kurang dapat diterapkan untuk suatu populasi.

Perkiraan sensitivitas dan spesifisitas uji dapat bervariasi karena berbagai alasan, termasuk perbedaan antara populasi sampel (Greiner dan Gardner, 2000), prevalensi kelompok (Brenner dan Gefeller, 1997), prevalensi dalam kelompok (Lavers et al., 2014) dan faktor tingkat hewan seperti stadium penyakit (Nielsen dan Toft, 2008) atau tes kulit untuk tuberkulosis sapi (Kennedy dkk., 2014). Tinjauan sistematis ini dengan jelas menunjukkan keragaman besar dalam populasi sampel antar studi. Banyak publikasi hanya memberikan informasi terbatas tentang populasi sampel untuk pengujian atau dilakukan dengan menggunakan sampel ternak yang praktis yang mungkin tidak mencerminkan populasi target untuk pengujian. Hal ini memberikan kontribusi yang signifikan terhadap variabilitas dalam sensitivitas uji dan perkiraan spesifisitas terlihat antara studi dalam tinjauan sistematis ini dan membuat sulit untuk menarik kesimpulan mengenai kinerja tes dalam populasi tertentu dari prevalensi penyakit yang tidak diketahui.

Laver dkk. (2014) menunjukkan perbedaan dalam prevalensi infeksi dalam kawanan juga akan mempengaruhi perkiraan, dengan HSe ELISA susu sapi utuh menurun dengan menurunnya prevalensi dalam kawanan. Ini penting ketika membedakan antara kawanan dengan prevalensi rendah dan kawanan yang tidak terinfeksi, karena kawanan dengan <2% prevalensi nyata pada tes ELISA susu cenderung positif palsu (Lavers et al., 2014). Selain itu, perkiraan HSe dan HSP juga akan dipengaruhi oleh pilihan uji referensi dan protokol pengujian khusus yang digunakan untuk pengujian referensi dan pengujian yang sedang dievaluasi. Misalnya, penelitian yang menggunakan metode kultur feses mungkin memilih media padat atau cair, dengan atau tanpa konfirmasi PCR, dan sayangnya beberapa publikasi tidak memberikan rincian protokol pengujian mereka. Perbandingan langsung antara studi hanya valid jika protokol uji seragam di setiap percobaan.

Ada beberapa keterbatasan dalam metodologi tinjauan sistematis ini. Sejumlah besar artikel unik (n=393) diidentifikasi oleh pencarian kata kunci awal menggunakan dua mesin pencari. Tidak layak untuk memindai abstrak dari semua artikel ini dan judul dipindai untuk mengecualikan yang dianggap tidak relevan (n=116), untuk

contoh studi tingkat hewan atau studi faktor risiko. Ada kemungkinan bahwa beberapa hasil yang relevan mungkin terlewatkan dalam judul-judul yang dicekualikan ini. Kata kunci yang digunakan mungkin terlalu luas tetapi penyertaan istilah spesifik "sensitivitas kawanan" atau "spesifisitas kawanan" dalam pencarian akan menyebabkan publikasi dengan hasil yang relevan terlewatkan. Hanya ada lima makalah relevan tambahan yang ditambahkan setelah memindai daftar referensi, yang menunjukkan bahwa jumlah publikasi relevan yang terlewatkan dalam pencarian kemungkinan kecil.

Karena banyaknya publikasi yang ditinjau, penilaian kualitas tidak dilakukan. Ini adalah kelemahan tinjauan sistematis kami, mengingat keragaman dalam desain penelitian dan metode antara berbagai evaluasi tes. Untuk mengimbangi ini, semua evaluasi tes dalam tinjauan sistematis memiliki informasi terkait yang berkaitan dengan metode studi dan analisis yang terkandung dalam tabel hasil, yang memungkinkan pembaca untuk membuat penilaian mereka sendiri tentang kualitas studi dan keandalan hasil.

Kesimpulan

Metode uji tingkat kawanan yang tersedia untuk infeksi MAP pada sapi memiliki sensitivitas dan spesifisitas yang sama tidak sepenuhnya dengan pengujian pada tingkat individu hewan. Pemilihan metode uji kawanan yang cocok tergantung pada tujuan pembuat keputusan, sumber daya yang tersedia, dan pertimbangan karakteristik pengujian masing-masing metode. Tinjauan sistematis ini menyoroti kesenjangan pengetahuan termasuk sensitivitas kawanan pengujian PCR sampel lingkungan dan sampel feses yang dikumpulkan, nilai uji fag untuk pengujian tingkat kawanan dan kinerja uji tingkat kawanan dalam kawanan sapi.

Pernyataan konflik kepentingan

Tak satu pun dari penulis makalah ini memiliki hubungan keuangan atau pribadi dengan orang atau organisasi lain yang dapat mempengaruhi atau membiaskan isi makalah secara tidak tepat.

Ucapan Terima Kasih

Kami ingin mengucapkan terima kasih atas dukungan finansial dari Irish Dairy Levy Trust untuk penelitian ini melalui pendanaan yang disediakan untuk proyek Teagasc MKAB1170.

Lampiran A. Data tambahan

Materi pelengkap yang terkait dengan artikel ini dapat ditemukan, dalam versi online, di doi:<https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2022.105786>.

Referensi

- Antognoli, MC, Jemmi, T., Hill, AE, Ochs, H., Salman, MD, 2005. Evaluasi strategi intervensi untuk pengendalian Penyakit Johne di Swiss. Dalam: Proceedings of the 8th International Colloquium on Paratuberculosis. Copenhagen, Denmark, 14-17 Agustus 2005, hlm. 9-14.
- Arango-Sabogal, JC, Côte, G, Pare, J, Labrecque, O, Roy, JP, Buczinski, S, Doré, E, Fairbrother, JH, Bissonnette, N., Wellemans, V., Fecteau, G., 2016. Deteksi *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* dalam peternakan sapi perah dengan menggunakan teknik sampling lingkungan standar dan sampel yang dikumpulkan. *Jurnal Penelitian Veteriner Kanada* 80, 175-182.
- Arrigoni, N., Cammi, G., Losini, I., Taddei, R., Tamba, M., Belletti, GL, 2007. Diagnosis paratuberculosis sapi: sensitivitas uji ELISA komersial pada susu curah sapi. Dalam: Proceedings of the 9th International Colloquium on Paratuberculosis. Tsukuba, Jepang, 28 Oktober-2 November 2007, hlm. 89-90. Berghaus, RD, Farver, TB, Anderson, RJ, Jaravata, CC, Gardner, IA, 2006. Pengambilan sampel lingkungan untuk mendeteksi *Mycobacterium avium* ssp *paratuberculosis* pada perusahaan susu California besar. *Jurnal Ilmu Susu* 89, 963-970.
- Brenner, H., Gefeller, O., 1997. Variasi sensitivitas, spesifisitas, rasio kemungkinan dan nilai prediktif dengan prevalensi penyakit. *Statistik dalam Kedokteran* 16, 981-991.
- Cashman, W., Buckley, J., Quigley, T., Fanning, S., More, S., Egan, J., Berry, D., Grant, I., O'Farrell, K., 2008. Faktor risiko untuk pengenalan dan transmisi dalam kawanan *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) infeksi pada 59 ternak sapi perah Irlandia. *Jurnal Kedokteran Hewan Irlandia* 61, 464-467.
- Chaffer, M., Rivas, AL, Elad, D., Koren, O., Garazi, S., Chowell, G., Schwager, SJ, 2008. Penilaian berbasis karakteristik operasi pemerama dari tes serologis yang digunakan untuk mendeteksi penyakit Johne pada peternakan sapi perah Israel. *Jurnal Penelitian Veteriner Kanada* 72, 18-26.
- Cook, A., Vidal-Diez, A., Arnold, M., Sayers, R., Caldwell, G., McGoldrick, A., Donaghy, J., Strain, S., Gardner, I., 2009. Penggunaan beberapa tes untuk menentukan status peternakan sapi perah Inggris sehubungan dengan *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Dalam: Proceedings of the 10th International Colloquium on Paratuberculosis. Minneapolis, Minnesota, 9-14 Agustus 2009, hlm. 160.
- Delafosse, A., Meens, E., Rambaud, T., Hanoy, F., Achour, H., 2011. ELISA susu tangki curah dan qPCR tinja komposit untuk mendeteksi berbagai tingkat seroprevalensi paratuberculosis pada kawanan sapi di Normandia, Prancis. *Jurnal Kedokteran Hewan Kanada* 60, 275-281.
- Eisenberg, T., Wolter, W., Lenz, M., Schlez, K., Zschock, M., 2013. Penyeka boot untuk dikumpulkan sampel lingkungan dari lokasi umum di peternakan sapi perah untuk *Mycobacterium avium* ssp *paratuberculosis* (deteksi PETA). *Jurnal Penelitian Susu* 80, 485-489. Feller, M., Huwiler, KMD, Stephan, RDVM, Altpeter, EMD, Shang, AMD, Furrer, HMD, Pfyffer, GEP, Jemmi, TDVM, Baumgartner, AP, Egger, MP, 2007. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* dan penyakit Crohn: tinjauan sistematis dan meta-analisis. *Penyakit Menular Lancet* 7, 607-613. Foddai, ACG, Grant, IR, 2017. Deteksi yang sensitif dan spesifik dari viabel *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* dalam susu mentah dengan uji pemisahan-fag magnetik yang dimediasi peptida. *Jurnal Mikrobiologi Terapan* 122, 1357-1367. Garcia, AB, Shalloo, L., 2015. Tinjauan yang diundang: dampak ekonomi dan pengendalian paratuberculosis pada sapi. *Jurnal Ilmu Susu* 98, 5019-5039.
- Geraghty, T., Graham, DA, Mallowney, P., More, SJ, 2014. Tinjauan tentang sapi Johne's kegiatan pengendalian penyakit di 6 negara endemik terinfeksi. *Kedokteran Hewan Pencegahan* 116, 1-11.
- Grant, IR, 2021. Metode berbasis bakteriofag untuk mendeteksi spesies yang layak *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* dan potensi mereka untuk diagnosis penyakit Johne. *Perbatasan Ilmu Kedokteran Hewan* 8, 632498.
- Grant, IR, Bola, HJ, Rowe, MT, 2002. Insiden *Mycobacterium paratuberculosis* di susu sapi mentah dan dipasteurisasi komersial dalam jumlah besar dari perusahaan pengolahan susu yang disetujui di Inggris. *Mikrobiologi Terapan dan Lingkungan* 68, 2428-2435.
- Greiner, M., Gardner, IA, 2000. Isu epidemiologi dalam validasi veteriner tes diagnostik. *Kedokteran Hewan Pencegahan* 45, 3-22.
- Gwozd, JM, Carajias, M., Mohammad, I., Ridge, S., Condrón, R., 2007a. Aplikasi dari kultur dan PCR pada susu curah untuk deteksi paratuberculosis pada ternak sapi perah. Dalam: Proceedings of the 9th International Colloquium on Paratuberculosis. Tsukuba, Jepang, 28 Oktober-2 November 2007, hal. 165.
- Gwozd, JM, Carajias, M., Mohammad, I., Ridge, S., Condrón, R., 2007b. Aplikasi dari tiga kit ELISA untuk susu curah untuk mendeteksi paratuberculosis pada kawanan sapi perah. Dalam: Proceedings of the 9th International Colloquium on Paratuberculosis. Tsukuba, Jepang, 28 Oktober-2 November 2007, hal. 167.
- Hahn, N., Gagál, K., Eisenberg, T., Schlez, K., Zschock, PM, Donat, K., Einax, E., Köhler, H., 2017. Evaluasi metode diagnostik yang berbeda untuk mendeteksi *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* dalam sampel swab boot dan sampel kotoran cair. *Penelitian Kedokteran Hewan BMC* 13.
- Hanks, JD, Taylor, NM, Kossabati, MA, 2014. Apakah pengambilan sampel susu yang ditargetkan efektif? cara mendeteksi penyakit Johne pada peternakan sapi perah? *Latihan Sapi* 22, 26-34. Hendrick, SH, Duffield, TF, Kelton, DF, Leslie, KE, Lissemore, KD, Archambault, M., 2005. Evaluasi uji immunosorben terkait-enzim yang dilakukan pada sampel susu dan serum untuk mendeteksi paratuberculosis pada sapi perah laktasi. *Jurnal Asosiasi Medis Hewan Amerika* 226, 424-428. Herthnek, D., Nielsen, SS, Lindberg, A., Bolske, G., 2008. Metode yang kuat untuk bakteri lisis dan pemurnian DNA untuk digunakan dengan PCR waktu nyata untuk mendeteksi *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* dalam susu. *Jurnal Metode Mikrobiologi* 75, 335-340.
- Jayara, BM, Pillai, SR, Wolfgang, DR, Griswold, DR, Rossiter, CA, Tewari, D., Laka bakar, CM, Hutchinson, LJ, 2004. Evaluasi IS900-PCR assay untuk mendeteksi *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infeksi pada sapi menggunakan sampel susu seperempat dan susu tangki curah. *Patogen dan Penyakit Bawaan Makanan* 1, 17-26. Kallis, CHJ, Hesselink, JW, Barkema, HW, Collins, MT, 2000. Budaya sampel tinja sapi yang dikumpulkan secara strategis sebagai metode untuk menyaring kawanan untuk paratuberculosis. *Jurnal Investigasi Diagnostik Hewan* 12, 547-551. Keller, SM, Stephan, R., Kuenzler, R., Meylan, M., Wittenbrink, MM, 2014. Perbandingan kultur tinja dan reaksi berantai polimerase F57 real-time untuk mendeteksi *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* pada kawanan sapi Swiss dengan riwayat paratuberculosis. *Acta Veterinaria Scandinavica* 56, 68.
- Kennedy, AE, Da Silva, AT, Byrne, N., Govender, R., MacSharry, J., O'Mahony, J., Sayers, RG, 2014. Tes komparatif serviks intradermal tunggal mengganggu diagnostik ELISA penyakit Johne. *Perbatasan dalam Imunologi* 5, 564. Khol, JL, Vill, M., Dunser, M., Geisbauer, E., Tichy, A., Baumgartner, W., 2009. Pengambilan sampel tinja lingkungan, pendekatan baru dalam diagnosis dan pengawasan paratuberculosis pada kawanan sapi Austria. *Wiener Tierärztliche Monatsschrift* 96, 279-285.
- Klawonn, W., Einax, E., Putzschel, R., Schmidt, M., Donat, K., 2016. Penyakit Johne: keandalan pengambilan sampel lingkungan untuk mengkaraktirisasi *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) infeksi pada ternak sapi-sapi. *Epidemiologi dan Infeksi* 144, 2392-2400.
- Lavers, CJ, McKenna, SLB, Dohoo, IR, Barkema, HW, Keefe, GP, 2013. Evaluasi budaya tinja lingkungan untuk *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* deteksi dalam kawanan sapi perah dan asosiasi dengan prevalensi dalam kawanan yang jelas. *Jurnal Kedokteran Hewan Kanada* 54, 1053-1060.
- Lavers, CJ, Barkema, HW, Dohoo, IR, McKenna, SLB, Keefe, GP, 2014. Evaluasi ELISA susu untuk mendeteksi *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* dalam kawanan sapi perah dan hubungannya dengan prevalensi dalam kawanan. *Jurnal Ilmu Susu* 97, 299-309.
- Lombard, JE, Byrem, TM, Wagner, BA, McCluskey, BJ, 2006a. Perbandingan susu dan tes immunosorben terkait-enzim serum untuk diagnosis *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infeksi pada sapi perah. *Jurnal Investigasi Diagnostik Hewan* 18, 448-458.
- Lombard, JE, Wagner, BA, Smith, RL, McCluskey, BJ, Harris, BN, Pembayar, JB, Garry, FB, Salman, MD, 2006b. Evaluasi pengambilan sampel lingkungan dan budaya untuk menentukan *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* distribusi dan status infeksi kawanan pada operasi susu AS. *Jurnal Ilmu Susu* 89, 4163-4171.
- McAloon, CG, Whyte, P., Lainnya, SJ, Hijau, MJ, O'Grady, L., Garcia, A., Doherty, ML, 2016b. Pengaruh paratuberculosis pada produksi susu—tinjauan sistematis dan meta-analisis. *Jurnal Ilmu Susu* 99, 1449-1460.
- Nielsen, SS, Toft, N., 2008. Diagnosis ante mortem paratuberculosis: tinjauan akurasi ELISA, uji interferon- γ dan teknik kultur feses. *Mikrobiologi Veteriner* 129, 217-235.
- Nielsen, SS, Toft, N., 2009. Sebuah tinjauan prevalensi paratuberculosis di peternakan hewan di Eropa. *Kedokteran Hewan Pencegahan* 88, 1-14.
- Nielsen, SS, Thamsborg, SM, Houe, H., Bitsch, V., 2000. Susu tangki curah ELISA antibodi untuk memperkirakan prevalensi paratuberculosis di peternakan sapi perah Denmark. *Kedokteran Hewan Pencegahan* 44, 1-7.
- Ott, SL, Wells, SJ, Wagner, BA, 1999. Kerugian ekonomi tingkat kawanan terkait dengan Penyakit Johne pada operasi susu AS. *Kedokteran Hewan Pencegahan* 40, 179-192.
- Pesqueira, MN, Yus, E, Faktor, C, Mato, I, Sanjuan, ML, Eiras, C, Arnaiz, I, Dieguez, FJ, 2017. Komunikasi singkat: korelasi antara prevalensi antibodi dalam kawanan dan tingkat antibodi susu tangki curah terhadap *Mycobacterium avium* ssp *paratuberculosis* menggunakan dua immunoassay komersial. *Jurnal Ilmu Susu* 100, 7544-7548.
- Pilar, RB, Grooms, DL, Kaneene, JB, 2009. Studi longitudinal distribusi *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infeksi peternakan sapi perah di proyek peternakan demonstrasi pengendalian penyakit Michigan Johne. *Jurnal Kedokteran Hewan Kanada* 50, 1039-1046.
- Raizman, EA, Wells, SJ, Godden, SM, Bey, RF, Oakes, MJ, Bentley, DC, Olsen, K, E., 2004. Distribusi *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* di lingkungan sekitar peternakan sapi perah Minnesota. *Jurnal Ilmu Susu* 87, 2959-2966.
- Ricchi, M., Manini, F., Cammi, G., Donaghy, J., Arrigoni, N., 2009. metode PCR yang berbeda untuk mendeteksi *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* dalam susu. Dalam: Proceedings of the 10th International Colloquium on Paratuberculosis. Minneapolis, Minnesota, 9-14 Agustus, hlm. 56-59. Sersan, ESG, McAloon, CG, Tratalos, JA, Citer, LR, Graham, DA, More, SJ, 2019. Evaluasi metode surveilans nasional untuk mendeteksi peternakan sapi perah Irlandia yang terinfeksi *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*. *Jurnal Ilmu Susu* 102, 2525-2538.
- Slana, I., Kralik, P., Kralova, A., Babak, V., Pavlik, I., 2012. Komunikasi singkat: Pemeriksaan filter susu dengan PCR real-time sebagai indikator tingkat kawanan keberadaan *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* di peternakan sapi perah. *Jurnal Ilmu Susu* 95, 1162-1165.
- Smith, RL, Schukken, YH, Pradhan, AK, Smith, JM, Whitlock, RH, Van Kessel, JS, Wolfgang, DR, Grohn, YT, 2011. Pencemaran lingkungan dengan *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* pada ternak sapi perah yang terinfeksi endemik. *Kedokteran Hewan Pencegahan* 102, 1-9.
- Stabel, JR, Wells, SJ, Wagner, BA, 2002. Hubungan antara kultur tinja, ELISA, dan hasil tes susu tangki curah untuk penyakit Johne pada peternakan sapi perah AS. *Jurnal Ilmu Susu* 85, 525-531.
- Sweeney, RW, 2011. Patogenesis paratuberculosis. *Klinik Hewan Utara Amerika: Praktik Makanan Hewan* 27, 537-546.
- Tavornpanich, S., Gardner, IA, Anderson, RJ, Shin, S., Whitlock, RH, Fyock, T., Adaska, JM, Walker, RL, Hietala, SK, 2004. Evaluasi kultur mikroba

- sampel tinja yang dikumpulkan untuk mendeteksi *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* dalam peternakan sapi perah besar. *American Journal of Veterinary Research* 65, 1061–1070. Tavoranpanich, S., Gardner, IA, Carpenter, TE, Johnson, WO, Anderson, RJ, 2006. Evaluasi efektivitas biaya metode pengambilan sampel yang ditargetkan untuk mendeteksi *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infeksi pada peternakan sapi perah. *American Journal of Veterinary Research* 67, 821–828.
- Tavoranpanich, S., Muñoz-Zanzi, CA, Wells, SJ, Raizman, EA, Carpenter, TE, Johnson, WO, Gardner, IA, 2008. Model simulasi untuk evaluasi strategi pengujian untuk mendeteksi paratuberculosis pada ternak sapi perah AS Midwestern. *Kedokteran Hewan Pencegahan* 83, 65–82.
- van Schaik, G., Pradenas F, M., Mella N, A., Kruze V, J., 2007. Validitas diagnostik dan biaya sampel tinja yang dikumpulkan dan sampel darah atau tinja individu untuk menentukan status sapi dan kawanan untuk *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Kedokteran Hewan Pencegahan* 82, 159–165.
- Van Schaik, G., Stehman, SM, Rossiter, CR, Shin, SJ, Schukken, YH, 2003. Model simulasi untuk menentukan ukuran kolam yang optimal untuk dideteksi *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* dengan kultur tinja. *Jurnal Investigasi Diagnostik Hewan* 15, 233–241.
- van Weering, H., van Schaik, G., van der Meulen, A., Waal, M., Franken, P., van Maanen, K., 2007. Kinerja diagnostik dari Pourquier ELISA untuk mendeteksi antibodi terhadap *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* dalam susu individu dan sampel susu curah dari ternak sapi perah. *Mikrobiologi Veteriner* 125, 49–58. Waddell, LA, Raji, A., StÅrk, KDC, McEwen, SA, 2015. Potensi zoonosis dari *Mycobacterium avium* sp. *paratuberculosis*: tinjauan sistematis dan meta-analisis dari bukti. *Epidemiologi dan Infeksi* 143, 3135–3157.
- Weber, MF, van Maanen, C., von Banniseht-Wijsmuller, T., Lam, TJGM, 2009. Sensitivitas pengambilan sampel lingkungan untuk paratuberculosis. Dalam: *Proceedings of the 10th International Colloquium on Paratuberculosis*. Minneapolis, Minnesota, 9-14 Agustus, hlm. 23–24.
- Wells, SJ, Whitlock, RH, Wagner, BA, Collins, J., Garry, F., Hirst, H., Lawrence, J., Saville, WJA, Larew Naugle, AL, 2002. Sensitivitas strategi uji yang digunakan dalam Program Status Kawanan Penyakit Johne Sukarela untuk mendeteksi *Mycobacterium paratuberculosis* infeksi pada ternak sapi perah. *Jurnal Asosiasi Medis Hewan Amerika* 220, 1053–1057.
- Wells, SJ, Godden, SM, Lindeman, CJ, Collins, JE, 2003. Evaluasi bakteriologis budaya sampel tinja individu dan dikumpulkan untuk mendeteksi *Mycobacterium paratuberculosis* dalam kawanan sapi perah. *Jurnal Asosiasi Medis Hewan Amerika* 223, 1022–1025.
- Wilson, DJ, Rood, K., Biswas, P., Byrem, TM, 2010. Prevalensi tingkat kawanan Johne's penyakit di Utah dan daerah yang berdekatan dari Intermountain West seperti yang terdeteksi oleh proyek pengawasan susu bulk tank. *Jurnal Ilmu Susu* 93, 5792–5797. Wolf, R., Barkema, HW, De Buck, J., Slomp, M., Flaig, J., Haupstein, D., Pickel, C., Orsel, K., 2014. Prevalensi tingkat kawanan yang tinggi dari *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* di peternakan sapi perah Kanada Barat, berdasarkan sampling lingkungan. *Jurnal Ilmu Susu* 97, 6250–6259.
- Wolf, R., Orsel, K., De Buck, J., Kanevets, U., Barkema, HW, 2016. Pendek komunikasi: evaluasi kaus kaki sampel untuk mendeteksi *Mycobacterium avium* sp. *paratuberculosis* di peternakan sapi perah. *Jurnal Ilmu Susu* 99, 2950–2955.



Daftar isi tersedia di [SainsLangsung](#)

Jurnal Kedokteran Hewan

beranda jurnal: www.elsevier.com/locate/tvj



Analisis retrospektif temuan post-mortem pada keturunan asli berusia dari lahir hingga 18 bulan yang disajikan ke laboratorium patologi Inggris

R. Mouncey^a, J.C. Arango-Saboga^b, AM de Mestre^b, AK Foote^c, KL Verheyen^a

^aDepartemen Patobiologi dan Ilmu Kependudukan, Royal Veterinary College, Hawkshead Lane, Hatfield AL9 7TA, Inggris

^bDepartemen Ilmu Biomedis Komparatif, Royal Veterinary College, Hawkshead Lane, Hatfield AL9 7TA, Inggris

^cLaboratorium Rossdales, High Street, Pasar Baru CB8 8JS, Inggris

INFO ARTIKEL

Kata kunci:

Penyakit
Kuda
Kematian
Patologi
Berdarah murni

ABSTRAK

Peningkatan pemahaman tentang alasan, dan waktu, kematian pada ras sebelum memasuki pelatihan ras diperlukan untuk memberikan wawasan tentang status kesehatan populasi ini. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendeskripsikan patologi yang terdiagnosis pada pemeriksaan post-mortem (PM) pada ras murni berusia dari lahir sampai 18 bulan dan menyelidiki hubungan antara usia dan patologi. Laporan dari laboratorium patologi di Newmarket, Inggris, digunakan untuk mengidentifikasi kasus yang memenuhi syarat yang diperiksa antara Januari 2006 dan Desember 2020. Patologi yang dilaporkan diekstraksi dan dikategorikan jika sesuai. Komorbiditas dan patogen yang diidentifikasi dilaporkan jika tersedia. Asosiasi antara usia dan patologi yang dipilih dinilai menggunakan regresi logistik. Dari 144 Thoroughbred yang memenuhi syarat yang disajikan untuk PM, 137 memiliki laporan yang tersedia dan diagnosis ahli patologi. $n=28/137$; 95% CI 15-29), 69% di antaranya ($n=19/28$; 95% CI 49-82) adalah manifestasi konformasi penyakit ortopedi perkembangan (DOD). Pneumonia merupakan patologi penting (14%; $n=20/137$; 95% CI 36-53) selama periode pra-sapah, di mana *Rhodococcus equi* diidentifikasi pada 50% ($n=20/10$; 95% CI 29-70) kasus. Kemungkinan cacat bawaan (OR 56,6; 95% CI 7,0-460,0; $P < 0,001$) secara signifikan lebih besar pada kuda berusia 0-2 hari dibandingkan dengan 4-18 bulan pada PM. Kemungkinan pneumonia (OR 4,3; 95% CI 1.1-1.7; $P=0,04$) secara signifikan lebih besar pada kuda usia 1-4 bulan dibandingkan dengan 0-2 hari di PM. Studi ini menunjukkan bahwa manifestasi konformasi DOD merupakan kontributor penting untuk kematian perinatal, dan patologi yang dilaporkan pada PM bervariasi dengan usia pada ras muda.

1. Perkenalan

Prioritas industri saat ini termasuk meningkatkan transparansi dan ketertelusuran Thoroughbreds sebelum memasuki pelatihan, tetapi ada kekurangan informasi terkini yang menjelaskan penyebab dan waktu kehilangan, khususnya di luar periode neonatal, di Inggris. Analisis hasil otoritas buku pejantan dari tanaman anak kuda Thoroughbred Inggris dan Irlandia (IRE) 2014 dan 2015 (Arango-Saboga dkk., 2021) memperkirakan bahwa 2,1% kuda telah mati pada usia 1 tahun dan selanjutnya 0,7% antara usia 1 dan 2 tahun. Namun, dari 53% kuda yang dilaporkan tidak mengikuti pelatihan pada usia 3 tahun, proporsi yang signifikan (35%; $n=5049/11.403$) tidak tercatat nasibnya (kematian, ekspor atau transaksi penjualan). Sebuah survei Australia terhadap breeder kuda asli yang gagal mengikuti pelatihan menemukan bahwa breeder melaporkan tingkat kematian 38% ($n=$

239/633) (Flash dkk., 2020), menunjukkan potensi rendahnya pelaporan kematian dalam perkiraan tingkat industri.

Analisis retrospektif dari laporan post-mortem (PM) dari Thoroughbreds telah digunakan untuk meningkatkan pemahaman tentang alasan kerugian yang terjadi di arena pacuan kuda (Lyle dkk., 2011; Keterlambatan, 2017) dan untuk memahami penyebab aborsi, lahir mati dan kematian neonatus (Smith dkk., 2003; Roach dkk., 2020). Analisis retrospektif serupa dari data PM telah digunakan untuk menggambarkan penyebab kematian pada populasi setara lainnya (Baker dan Ellis, 1981; Morrow et al., 2011). Analisis data tersebut dapat memberikan wawasan tentang distribusi relatif penyakit dan alasan eutanasia dalam suatu populasi.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendeskripsikan patologi yang terdiagnosis pada pemeriksaan PM pada Thoroughbreds berusia dari lahir sampai 18 bulan dan menyelidiki hubungan antara usia dan patologi yang dilaporkan. Pekerjaan ini

* Penulis yang sesuai.

Alamat email: rmouncey18@rvc.ac.uk (R.Mouncey).

¹ Kehidupan yang dijalani dengan baik: Rencana strategis baru untuk kesejahteraan kuda yang dibiakkan untuk balap, 2020-2024. http://media.britishhorseracing.com/bha/Welfare/HWB/WELFARE_STRATEGY.pdf (Diakses 23 Juli 2020)

<https://doi.org/10.1016/j.tvj.2022.105813>

Diterima 15 Juni 2021; Diterima dalam bentuk revisi 25 Januari 2022; Diterima 3 Maret 2022

Tersedia online 5 Maret 2022

1090-0233/© 2022 Para Penulis. Diterbitkan oleh Elsevier Ltd. Ini adalah artikel akses terbuka di bawah lisensi CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

akan memperbarui pemahaman tentang waktu dan penyebab kerugian di industri pemuliaan Thoroughbred Inggris untuk menginformasikan prioritas penelitian di masa depan.

2. Bahan-bahan dan metode-metode

2.1. Persetujuan etis

Persetujuan etis diberikan oleh Dewan Peninjau Etis Penelitian Klinis Royal Veterinary College (URN: 2018 1843-2; Tanggal persetujuan: 29 Oktober 2019).

2.2. Desain dan periode studi

Sebuah studi cross-sectional retrospektif dilakukan, menggunakan catatan PM dari Thoroughbreds diperiksa antara Januari 2006 dan Desember 2020, di laboratorium patologi di Newmarket, Inggris.

2.3. Pemilihan kasus

Kasus diidentifikasi dari perangkat lunak manajemen praktik laboratorium (Eclipse PMS, Eclipse Veterinary Software Ltd) dengan mencari kode prosedur PM dan pencarian manual dari semua pengiriman yang tercatat berdasarkan tahun. Semua catatan yang memenuhi syarat dibaca oleh satu penulis (RM) untuk mengidentifikasi kasus yang memenuhi kriteria inklusi (i) keturunan murni dan (ii) berusia antara kelahiran dan 18 bulan di PM, untuk menangkap kasus yang terjadi antara kelahiran dan perkiraan usia untuk memasuki pelatihan untuk balap datar di Inggris.

2.4. Pengumpulan data

Nomor referensi kasus, tanggal lahir, tanggal kematian, tanggal pemeriksaan PM dan jenis kelamin diambil, dimasukkan dan disimpan secara anonim dalam database yang dirancang khusus (Access, Microsoft). Laporan post-mortem, mulai dari laporan lengkap ahli patologi hingga surat dokter hingga pemilik yang menjelaskan patologi yang mengakibatkan kematian atau eutanasia, seperti yang dilaporkan oleh ahli patologi yang memeriksa, diambil secara manual. Kasus di mana tidak ada laporan yang tersedia dikeluarkan dari analisis lebih lanjut.

Rincian ahli patologi/pelaporan klinis yang memeriksa, dan apakah hewan itu di-eutanasia, mati (kematian mendadak/tidak terduga) atau mati dalam perawatan hewan dikumpulkan jika tersedia. Temuan patologis yang mengakibatkan kematian atau euthanasia, seperti yang dilaporkan oleh ahli patologi/dokter, dicatat bersama dengan rincian lebih lanjut dari komorbiditas, agen infeksi, lokasi anatomi dan deskripsi lesi patologis. Kasus lahir mati dan kasus di mana kelainan tidak terdeteksi pada pemeriksaan dikeluarkan dari analisis lebih lanjut.

2.5. Pengolahan data

Data yang menjelaskan patologi/patologi yang dilaporkan awalnya diurutkan berdasarkan sistem tubuh yang terpengaruh. Dimana nomor kasus diperbolehkan ($n \geq 3$), kategori patologi dibuat menggunakan definisi dan istilah deskriptif utama dari literatur yang tersedia (lihat Lampiran A: Tabel Tambahan 1). Kasus yang muncul pada bulan pertama kehidupan, dengan patologi multisistemik yang dilaporkan terjadi sebagai akibat dari sepsis dan/atau hipoksia, diklasifikasikan sebagai 'sepsis/ketidaksesuaian neonatus'. Agen infeksi, jika diidentifikasi, dideskripsikan berdasarkan genus dan spesies jika tersedia. Jika sesuai, misalnya untuk menggambarkan patah tulang atau kelainan kongenital, lokasi anatomi ditentukan. Setiap komorbiditas yang dilaporkan juga dijelaskan.

2.6. Analisis statistik

Analisis dilakukan dengan menggunakan Stata (Rilis 16, StataCorp LP). Usia saat PM dihitung menggunakan tanggal lahir dan tanggal pemeriksaan PM. Waktu dari kematian hingga pemeriksaan PM dihitung di mana data

tersedia. Frekuensi deskriptif dari karakteristik populasi penelitian dihitung. Histogram diperiksa secara visual untuk normalitas dan median dan rentang interkuartil (IQR) yang dilaporkan untuk data yang tidak terdistribusi secara normal. Proporsi dan interval kepercayaan 95% (CI) dihitung untuk kategori patologi yang dilaporkan. Statistik deskriptif berdasarkan patogen dan lokasi anatomi diturunkan jika sesuai.

Tes Kruskal-Wallis digunakan untuk mengidentifikasi perbedaan distribusi usia pada PM (sebagai variabel kontinu) antar kelompok. Usia di PM dibagi menjadi kuartil, di mana proporsi dan 95% CI kategori patologi dihitung. Regresi logistik univariat digunakan untuk mengukur kekuatan hubungan antara kelompok usia dan hasil 'pneumonia' dan 'deformitas kongenital', masing-masing. Signifikansi statistik ditetapkan pada $P < 0,05$.

3. Hasil

3.1. Kasus-kasus yang diajukan untuk pemeriksaan post-mortem

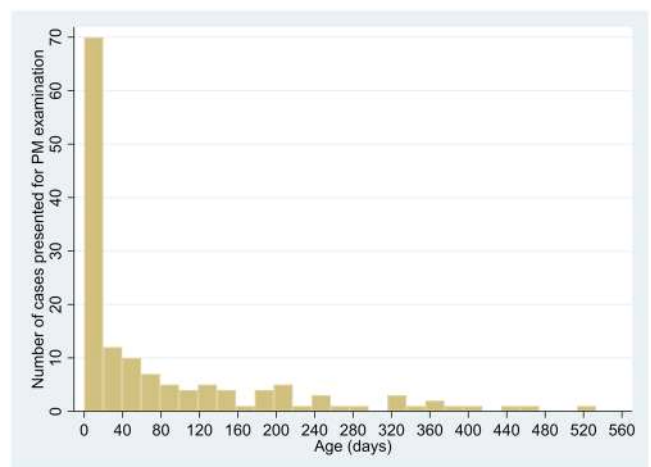
Secara keseluruhan, 144 kuda memenuhi kriteria inklusi kasus; 85 (59%) colts, 55 (38%) fillies dan empat (2%) tanpa jenis kelamin yang tercatat. Usia rata-rata pada pemeriksaan PM adalah 21 hari (IQR 2-118 hari; kisaran 0-533 hari; $n=144$). Gambar 1 menampilkan distribusi usia pada pemeriksaan PM. Waktu rata-rata dari kematian hingga pemeriksaan PM adalah 0 hari (IQR 0-0 hari; kisaran 0-2 hari; $n=143$).

Lima kuda (3%; $n=5/144$) tidak memiliki laporan PM dan dikeluarkan dari analisis lebih lanjut. Enam puluh tiga (45%; $n=63/139$) kuda menjalani pemeriksaan PM penuh dan 74 (55%; $n=74/139$) tercatat telah menjalani pemeriksaan PM terbatas, kotor atau 'untuk tujuan kepentingan'. Enam puluh persen kuda ($n=83/139$; 95% CI 51-67) dilaporkan telah di-eutanasia, 20% ($n=28/139$; 95%CI 14-27) meninggal dan 20% ($n=28/139$; 95% CI 14-27) meninggal dalam perawatan dokter hewan.

3.2. Patologi yang dilaporkan

Dalam dua kasus, ahli patologi yang memeriksa melaporkan bahwa tidak ada kelainan yang dapat dideteksi pada PM, menghasilkan 137 kasus untuk analisis lebih lanjut. Tabel 1 memberikan ringkasan patologi yang dilaporkan.

Cacat bawaan adalah temuan patologis yang paling umum dilaporkan pada pemeriksaan PM yang mengakibatkan kematian atau eutanasia pada populasi penelitian (37%; $n=28/76$; 95% CI 27-48). Kasus terutama dilaporkan telah di-eutanasia (82%; $n=23/28$; 95% CI 64-92), dengan mayoritas (86%; $n=24/28$; 95% CI 68-94) muncul selama



Gambar 1. Distribusi kasus yang diajukan untuk pemeriksaan post-mortem (PM) berdasarkan usia (hari) pada saat pemeriksaan, dari 144 ras yang dibawa ke laboratorium patologi di Newmarket, Inggris, antara tahun 2006 dan 2020.

Tabel 1

Patologi yang dilaporkan, agen infeksi yang teridentifikasi dan komorbiditas terkait di antara 137 keturunan asli yang disajikan untuk pemeriksaan post-mortem antara kelahiran dan usia 18 bulan ke laboratorium patologi di Newmarket, Inggris, antara 2006 dan 2020. Proporsi dan 95% CI diberikan dari populasi secara keseluruhan.

Patologi	Komorbiditas/Patogen ^{sebuah}	n	%	95% CI	
Cacat bawaan	Semua	28	20.4	14,5–27,9	
	muskuloskeletal	Hipoksia (n=3)	21	15.3	10.2–22.3
	Paru-paru/diafragma		2	1.5	0,4–5,2
	meningen		1	0,7	0,1–4,0
	Jantung		1	0,7	0,1–4,0
	jejunum	Pecahnya jejunum	1	0,7	0,1–4,0
	Mata		1	0,7	0,1–4,0
Radang paru-paru	Semua	20	14.6	9.6–21.5	
		<i>Rhodococcus equi</i>	10	7.3	4.0–12.9
		<i>Streptokokussp.</i>	4	2.9	1.1–7.3
		<i>Escherichia coli</i>	2	1.5	0,4–5,2
		Virus Herpes Kuda 4	1	0,7	0,1–4,0
		<i>Actinobacillus equuli</i>	1	0,7	0,1–4,0
Sepsis neonatus/ketidaksuaian	Semua	17	12.4	8.0–19.0	
		Hipoksia	10	7.3	4.0–12.9
		<i>Streptokokussp.</i>	2	1.5	0,4–5,2
		Virus Herpes Kuda 1	2	1.5	0,4–5,2
		<i>Escherichia coli</i>	1	0,7	0,1–4,0
Enteritis/kolitis	Semua	15	10.9	6,7–17,3	
		<i>Clostridium perfringens</i>	2	1.5	0,4–5,2
		<i>Escherichia coli</i>	1	0,7	0,1–4,0
		<i>Lawsonia intraselularis</i>	1	0,7	0,1–4,0
		<i>Salmonellasp.</i>	1	0,7	0,1–4,0
Ruptur/obstruksi GI	Semua	12	8.8	5.1–14.7	
	jejunum	Ascarid (n=1)	5	3.6	1.6–8.2
	ileum	Cacing Pita (n=2)	3	2.2	0,7–6,2
	Perut	Ulserasi (n=1)	2	1.5	0,4–5,2
	Usus duabelas jari	Ulserasi	1	0,7	0,1–4,0
	Dubur	Impaksi	1	0,7	0,1–4,0
Patah	Semua	9	6.7	3.5–12.2	
	Iga	Perdarahan internal	4	2.9	1.1–7.3
	Tengkorak		2	1.5	0,4–5,2
	Panggul		1	0,7	0,1–4,0
	Tulang pergelangan tangan		1	0,7	0,1–4,0
	Fetlock		1	0,7	0,1–4,0
	humerus		1	0,7	0,1–4,0
omphalitis	Semua	4	2.9	1.1–7.3	
DOD	Semua	3	2.2	0,7–6,2	
	OCD		1	0,7	0,1–4,0
	CVM		1	0,7	0,1–4,0
	Kista Subkondral		1	0,7	0,1–4,0
Abses perut	Semua	3	2.2	0,7–6,2	
Hepatitis	Semua	3	2.2	0,7–6,2	
		<i>Listeria monocytogenes</i>	1	0,7	0,1–4,0
Osteomielitis	Semua	3	2.2	0,7–6,2	
		<i>Rhodococcus equi</i>	1	0,7	0,1–4,0
		<i>Stafilokokus aureus</i>	1	0,7	0,1–4,0
Radang sendi	Semua	3	2.2	0,7–6,2	
		<i>Stafilokokus aureus</i>	1	0,7	0,1–4,0
Lainnya ^b	Semua	17	12.4	8.0–19.0	
		Beta hemolitik <i>Streptokokussp.</i>	1	0,7	0,1–4,0

95% CI, interval kepercayaan 95%; GI, Gastrointestinal; DOD, Penyakit ortopedi perkembangan; OCD, Osteochondrosis dissecans; CVM, Malformasi vertebra serviks.

^a Semua patogen yang dilaporkan oleh laboratorium dijelaskan, spesies diberikan jika informasi tersedia jika tidak dijelaskan genus. Patogen yang dijelaskan mungkin bukan penyebab utama kematian dalam semua kasus.

^b Patologi lain dilaporkan sebagai nefritis, miositis, vaskulitis, isoeritrolisis neonatal (n=2), hepatopati (n=2), iskemia/infark (serebrum) n=1, kondilus femoralis n=1, edema paru, megaesophagus didapat, pneumonia aspirasi (tenggelam), sinovitis yang dimediasi imun, neoplasia, trombus ethmoidal, ruptur trakea dan trauma serebral.

periode perinatal (usia rata-rata pada PM 0 hari; IQR 0-1 hari; kisaran 0-187 hari). Sistem muskuloskeletal paling sering terkena (75%; n=21/28; 95% CI 57-87), khususnya oleh deformitas lentur karpi dan fetlocks (71%; n=15/21; 95% CI 50-86). Meja 2 menyajikan ringkasan cacat bawaan yang mempengaruhi sistem muskuloskeletal.

Pneumonia adalah patologi kedua yang paling sering dilaporkan, di mana kasus disajikan pada usia rata-rata 53 hari (IQR 10-117 hari;

berkisar 2–453 hari) dengan mayoritas (85%; n=17/20; 95% CI 64-95) dilaporkan telah di-eutanasia (n=11) atau meninggal dalam perawatan dokter hewan (n=6). Agen diidentifikasi pada 90% (n=18/20; 95% CI 70-97) dari kasus pneumonia, 50% di antaranya adalah *Rhodococcus equi* (n=20/10; 95% CI 29-70).

Tujuh belas kasus sepsis neonatus / maladjustment diidentifikasi, dengan usia rata-rata pada pemeriksaan 3 hari (IQR 1-3 hari, kisaran 0-31

Meja 2

Cacat bawaan yang mempengaruhi sistem muskuloskeletal, di antara 137 keturunan asli berusia antara lahir dan 18 bulan disajikan untuk pemeriksaan post-mortem ke laboratorium patologi di Newmarket, Inggris, antara 2006 dan 2020. Proporsi dan 95% CI diberikan dari total kasus di mana cacat bawaan dilaporkan sebagai kasus kematian.

Cacat bawaan	Lokasi anatomis	n	%	95% CI
Semua				
Kontraktur	Semua	11	52.4	32.4-71.7
	Tulang pergelangan tangan	7	33.3	17.2-54.6
	Carpus dan Fetlock	4	19.0	7.7-40.0
Kontraktur dan skoliosis	Semua	3	14.3	5.0-34.6
	Vertebra dan karpus	2	9.5	2.6-28.9
	Vertebra dan fetlock	1	4.8	0.01-22.7
Deformitas sudut	Semua	3	14.3	5.0-34.6
	Tulang pergelangan tangan	2	9.5	2.6-28.9
	Tarsus	1	4.8	0.01-22.7
Hiperekstensi	Fetlock	1	4.8	0.01-22.7
Skoliosis	Tulang belakang	1	4.8	0.01-22.7
Kifosis	Tulang belakang	1	4.8	0.01-22.7
Osifikasi tidak lengkap	Tarsus	1	4.8	0.01-22.7

hari). Sebagian besar kasus ini dilaporkan telah di-eutanasia ($n=15/17$; 88%; 95% CI 66-97), sementara beberapa meninggal dalam perawatan hewan ($n=17/2$; 12%; 95%CI 2-34). Agen infeksi diidentifikasi pada 35% ($n=17/6$; 95% CI 17-59) dari kasus sepsis / maladjustment neonatus. Semua kasus di mana patologi dilaporkan disebabkan oleh hipoksia ($n=10$) meninggal atau di-eutanasia dalam 4 hari pertama kehidupan (usia rata-rata pada PM 2 hari; SD 1,4 hari; kisaran 0-4 hari). Data riwayat yang tersedia untuk dua kasus ini, di mana baik distosia atau pemisahan plasenta prematur dilaporkan.

Kasus enteritis/kolitis ($n=15$) disajikan pada usia rata-rata 91 hari (IQR 66-201 hari; kisaran 2-470 hari), dengan mayoritas (93%; $n=14/15$; 95%CI 70-99) telah di-eutanasia ($n=6$) atau meninggal dalam perawatan dokter hewan ($n=8$). Dua kasus dilaporkan sebagai 'induksi obat'. Agen infeksi diidentifikasi pada 40% kasus ($n=6/15$; 95%CI 20-64), dengan *Clostridium perfringens* sering dilaporkan (33%; $n=2/6$; 95%CI 10-70).

Kasus ruptur gastrointestinal ($n=7$) atau obstruksi ($n=5$) memiliki usia rata-rata pada PM 95 hari (IQR 11-266 hari; kisaran 3-397 hari), dengan 67% kasus ($n=8/12$; 95% CI 39-86) dilaporkan telah di-eutanasia atau meninggal dalam perawatan dokter hewan dan 33% sisanya meninggal ($n=4/12$; 95%CI 14-61). Parasit (cacing pita atau ascarids) diidentifikasi pada 25% ($n=3/12$; 95% CI 9-53) kasus.

Kasus patah tulang ($n=9$) disajikan pada usia rata-rata 37 hari (IQR 10-108 hari; kisaran 1-364 hari), dengan 56% kasus ($n=5/9$; 95% CI 27-81) dilaporkan telah di-eutanasia, lokasi anatomi yang dilaporkan diberikan dalam Tabel 1. Sisanya 44% kasus ($n=4/9$; 95% CI 19-73) dilaporkan sebagai patah tulang rusuk, yang baik meninggal ($n=3$) atau meninggal dalam perawatan ($n=1$) sebagai akibat laserasi sekunder pada paru-paru, limpa dan jantung, 75% ($n=3/4$; 95% CI 30-95) yang terjadi selama periode perinatal (rentang usia pada PM 1-10 hari).

Secara keseluruhan, agen infeksi diidentifikasi pada 33% ($n=46/137$; 95% CI 26-42 kasus, 85% ($n=39/46$; 95%CI 72-92) menjadi bakteri; 9% ($n=4/46$; 95% CI 3-20) parasit dan 6% ($n=3/46$; 95% CI 2-17) virus. *Rhodococcus equi* adalah agen yang paling sering dilaporkan (30%; $n=14/46$; 95% CI 19-45), dengan patologi terkait dilaporkan sebagai pneumonia (72%; $n=10/14$; 95% CI 45-88), abses perut (21%; $n=14/3$; 95%CI 8-48) atau osteomielitis (7%; $n=14/1$; 95% CI 1-31) dan usia rata-rata 61 hari (IQR 43-120 hari; kisaran 10-137 hari).

3.3. Patologi yang dilaporkan berdasarkan kategori usia pada pemeriksaan PM

Patologi yang paling sering dilaporkan, berdasarkan kelompok usia pada pemeriksaan PM, disajikan dalam: Tabel 3. Distribusi usia pada PM bervariasi antara kategori patologi. Cacat bawaan lebih banyak

Tabel 3

Patologi yang paling sering dilaporkan menurut kategori (kuartil) usia saat pemeriksaan untuk 137 keturunan asli berusia antara lahir dan 18 bulan yang dibawa untuk pemeriksaan post-mortem (PM) ke laboratorium patologi di Newmarket, Inggris, antara tahun 2006 dan 2020. Proporsi dan 95% CI diberikan dari total jumlah kasus (n) pada setiap kelompok umur.

Usia saat PM (hari)	Patologi	n	%	95% CI
0-2 ($n=38$)	Cacat bawaan	24	63.1	47.3-76.2
	Lengan kontraktur	14	36.8	23.4-52.7
3-22 ($n=31$)	NSM	9	23.7	13.0-39.2
	NSM	8	25.8	13.7-43.2
	GI pecah/halangan	5	16.1	7.1-32.6
23-115 ($n=34$)	Radang paru-paru	9	26.5	14.6-43.1
	<i>Rhodococcus sama</i>	7	20.6	10.3-36.8
116-540 ($n=34$)	Enteritis/kolitis	6	17.6	8.3-33.5
	Enteritis/kolitis	6	17.6	8.3-33.5
	GI pecah/halangan	6	17.6	8.3-33.5

NSM, Sepsis/ketidaksesuaian neonatus; GI, Gastrointestinal.

mungkin dilaporkan pada neonatus (2 hari pertama kehidupan) dibandingkan pada mereka yang berusia antara 4 dan 18 bulan pada pemeriksaan PM (OR 56,6, 95% CI 7,0-460,0, $P < 0,001$). Pneumonia lebih mungkin dilaporkan pada kuda berusia antara 1 dan 4 bulan pada pemeriksaan (23-115 hari) kemudian neonatus (OR 4.2; 95% CI 1.1-1.7; $P=0,04$). Jumlah kasus tidak cukup besar untuk memungkinkan perbandingan serupa dalam kategori patologi lainnya.

4. Diskusi

Studi yang dilaporkan di sini memberikan wawasan tentang distribusi relatif penyebab patologi yang dilaporkan di Inggris Raya yang berusia dari lahir hingga 18 bulan yang disajikan untuk pemeriksaan PM. Beberapa patologi dilaporkan bervariasi secara signifikan berdasarkan usia saat presentasi. Deformitas kongenital, khususnya manifestasi konformasi penyakit ortopedi perkembangan (DOD), sering dilaporkan pada periode neonatal dan *Rhodococcus equi* merupakan patogen penting, diisolasi pada separuh kasus pneumonia yang terjadi pada periode sebelum penyapihan.

Risiko kematian pada populasi ras murni secara konsisten dilaporkan tertinggi pada periode neonatal, menurun setelahnya. Galvin dan Corley (2010) melaporkan bahwa 67% dari 17 kematian yang diamati dalam kohort 338 anak kuda yang lahir di IRE antara kelahiran dan usia 1 tahun terjadi pada 30 hari dan 82% pada usia 6 bulan. Pola distribusi usia yang serupa diamati dalam survei oleh Morley dan Townsend (1997) dari hasil 805 anak kuda dari tanaman anak kuda Kanada 1989, di mana 45% dari 87 kematian dilaporkan terjadi dalam 14 hari pertama kehidupan. Distribusi usia saat pemeriksaan PM dalam penelitian ini (50% pada 21 hari) serupa dengan yang dijelaskan di atas dalam studi tingkat populasi yang menunjukkan bahwa kasus yang disajikan untuk pemeriksaan PM mewakili populasi sumber dalam hal distribusi usia.

Secara keseluruhan, kelainan bawaan adalah patologi yang paling sering dilaporkan dalam penelitian ini (20% semua kasus), terutama selama periode perinatal (63% kasus berusia 0-2 hari pada PM). Mayoritas deformitas dilaporkan mempengaruhi sistem muskuloskeletal, khususnya deformitas lentur yang mengakibatkan kontraktur sendi tungkai depan. Temuan ini sesuai dengan studi tingkat populasi sebelumnya. Galvin dan Corley (2010) menunjukkan bahwa kelainan kongenital, termasuk deformitas lentur, menyumbang 45% ($n=5/11$) dari semua kasus kematian pada usia 30 hari. Morley dan Townsend (1997) melaporkan tingkat kematian kasus 25% pada anak kuda antara lahir dan 14 hari karena tendon dikontrak. Dalam survei terhadap 2209 kelahiran selama lima musim kawin di peternakan Inggris Raya, Platt (1973), menggambarkan kelainan kongenital untuk mencapai 68% dari 66 kasus kematian hingga usia 8 minggu.

Thoroughbred terutama dibiakkan untuk tujuan balap dan atletik (Parkin dan Rossdale, 2006). Ada kemungkinan bahwa cacat bawaan muskuloskeletal dapat membuat individu tidak cocok untuk kinerja atletik, mengakibatkan eutanasia bahkan ketika cacat mungkin tidak sesuai dengan kelangsungan hidup, yang dapat menjelaskan mengapa lesi tersebut sangat lazim pada populasi penelitian saat ini.

Deformitas lentur adalah salah satu manifestasi DOD, istilah yang digunakan untuk menggambarkan berbagai kondisi yang mempengaruhi sistem muskuloskeletal kuda yang sedang tumbuh (McIlwraith, 2004). Masuk akal untuk mengasumsikan bahwa kasus yang disajikan pada pemeriksaan PM mewakili presentasi sindrom yang paling ekstrem (Adams dan Santschi, 2000) dan karena itu bisa menjadi 'puncak gunung es' dalam hal penyakit di tingkat populasi. O'Donohue dkk. (1992) mendeteksi tanda-tanda DOD pada 68% dari 248 anak kuda antara kelahiran dan usia 18 bulan di 17 peternakan di IRE dan memperkirakan bahwa hingga 10% dari anakan tahunan yang diproduksi setiap tahun tidak cocok untuk dijual karena kondisi tersebut. Morley dan Townsend (1997) menggambarkan manifestasi DOD tidak hanya sebagai penyebab kematian yang signifikan dalam presentasi mereka yang paling parah, tetapi juga alasan paling umum untuk kuda yang tidak cocok untuk balap pada usia 1 tahun. Cacat muskuloskeletal konformasi dilaporkan telah mempengaruhi 18% dari 399 anak kuda, di satu peternakan selama tiga musim di Inggris, dalam 30 hari pertama kehidupan (Whittaker et al., 2012).

Meskipun menjadi penyebab signifikan morbiditas dan mortalitas, etiologi yang tepat dari banyak manifestasi DOD masih belum jelas. Olstad dkk. (2007) menunjukkan adanya lesi osteokondral pada anak kuda berumur 12 hari, dan studi eksperimental mendukung bukti yang berkembang bahwa DOD dapat dikaitkan dengan paparan in utero seperti status gizi kuda betina dan pembatasan pertumbuhan intra-uterin (Allen dkk., 2004; Peugnet dkk., 2016). Prevalensi dalam penelitian saat ini mendukung kebutuhan untuk penelitian lebih lanjut untuk menyelidiki penyebab potensial dan hubungannya dengan pajanan di dalam rahim.

Rhodococcus equi adalah agen infeksi yang paling umum dalam penelitian ini, diidentifikasi pada sepertiga dari semua patologi infeksi yang dilaporkan dan setengah dari semua kasus pneumonia. *R. equi* dianggap sebagai salah satu patogen paling signifikan dalam industri pemuliaan kuda dan memiliki distribusi di seluruh dunia (Takai, 1997). Ini muncul terutama sebagai bronkopneumonia kronis dengan abses pada anak kuda antara usia satu dan enam bulan. Muscatello et al., (2007). Lebih jarang, enteritis, radang sendi, osteomielitis dan abses telah dilaporkan pada anak kuda dengan dan tanpa penyakit pernapasan bersamaan. Muscatello et al., (2007). Dalam penelitian ini, bersama dengan pneumonia, *R. equi* juga diisolasi dari kasus abses abdomen dan osteomielitis. Saat ini tidak ada pencegahan yang efektif untuk *R. equi* (Arnold-Lehna dkk., 2020) dan penelitian ini menyoroti pentingnya agen ini sebagai kontributor kematian dalam industri pemuliaan Inggris.

Keputusan untuk menghadirkan hewan untuk pemeriksaan PM akan didasarkan pada berbagai faktor, dan kemungkinan berbeda antara peternakan dan antara kuda di dalam peternakan. Dengan demikian, kohort yang disajikan untuk pemeriksaan PM mungkin tidak sepenuhnya mewakili populasi secara keseluruhan dan harus dipertimbangkan saat menginterpretasikan hasil. Informasi klinis tidak tersedia untuk semua kuda dalam penelitian ini dan ada kemungkinan bahwa pengobatan hewan dan pengelolaan beberapa kasus memungkinkan mereka untuk bertahan hidup untuk jangka waktu tertentu sebelum menyerah pada penyakit, khususnya dengan patologi infeksi. Ini juga berarti bahwa usia saat kematian atau PM tidak selalu merupakan proksi ketika seseorang pertama kali terpengaruh oleh kondisi tertentu.

Ada variasi yang cukup besar dalam jenis, luas dan detail dari kedua pemeriksaan PM yang dilakukan dan laporan yang digunakan dalam penelitian ini, yang merupakan batasan penting. Oleh karena itu, fokus penelitian ini adalah untuk menggambarkan kategori patologi yang lebih luas yang dilaporkan daripada memberikan deskripsi atau detail patologis, karena ini tidak tersedia untuk sebagian besar kasus. Di mana pemeriksaan terbatas atau kasar dilakukan, seperti dalam sejumlah besar kasus (55%) dalam penelitian ini, ada potensi patologi yang dapat berkontribusi pada alasan eutanasia dan/atau kematian, yang terlewatkan. Kasus-kasus seperti itu mungkin salah diklasifikasikan, khususnya ketika kuda dipilih secara selektif

eutanasia, karena titik di mana keputusan itu dibuat dapat mempengaruhi temuan pada pemeriksaan PM, dan karenanya patologi yang dilaporkan. Namun, mengingat klasifikasi luas kami berdasarkan temuan patologis primer seperti yang dilaporkan oleh ahli patologi, tingkat bias kesalahan klasifikasi dalam penelitian ini cenderung rendah.

Kematian dalam industri pemuliaan murni merupakan masalah ekonomi dan kesejahteraan (Parkin dan Rossdale, 2006). Dengan upaya memprioritaskan industri untuk lebih memahami kesehatan dan nasib Thoroughbred baik sebelum dan sesudah karir balap mereka, pekerjaan seperti ini untuk menggambarkan waktu dan laporan patologi pada pemeriksaan PM, dapat membantu dalam mengarahkan strategi masa depan dan intervensi.

5. Kesimpulan

Studi ini memberikan pengetahuan terkini tentang waktu dan alasan eutanasia dan/atau kematian di industri pemuliaan Thoroughbred Inggris. Deformitas kongenital, khususnya manifestasi konformasi DOD, merupakan kontributor penting untuk kematian perinatal, menyoroti kebutuhan untuk pemahaman lebih lanjut tentang paparan in utero yang mungkin terlibat dalam etiologi mereka. *Rhodococcus equi*, terutama bermanifestasi sebagai pneumonia, merupakan patogen penting, menegaskan perlunya upaya pengendalian dan pencegahan.

Pernyataan Benturan Kepentingan

Para penulis menyatakan tidak ada kepentingan yang bersaing. Tak satu pun dari penulis memiliki hubungan keuangan atau pribadi yang dapat mempengaruhi atau membiaskan isi makalah secara tidak tepat.

Ucapan Terima Kasih

Pendanaan untuk penelitian ini disediakan oleh The Racing Foundation, Horserace Betting Levy Board dan Mellon Fund for Equine Research dari Royal Veterinary College.

Kami ingin berterima kasih kepada staf di Rosdsales Laboratories, Newmarket atas bantuan teknis mereka.

Hasil awal dari pekerjaan ini dipresentasikan pada kongres tahunan British Equine Veterinary Associations pada September 2021.

Lampiran A. Informasi pendukung

Data tambahan yang terkait dengan artikel ini dapat ditemukan dalam versi online di [doi:10.1016/j.tvjl.2022.105813](https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2022.105813).

Referensi

- Adams, SB, Santschi, EM, 2000. Manajemen tungkai lentur bawaan dan didapat kelainan bentuk. *Prok. annu. Konv. Saya. Asosiasi Praktek Kuda*. 46, 117-125.
- Allen, WR, Wilsher, S., Tiplady, C., Butterfield, RM, 2004. Pengaruh ibu ukuran pada pertumbuhan pra dan pascakelahiran pada kuda: III Pertumbuhan pascakelahiran. *Reproduksi* 127, 67-77.
- Arango-Sabogal, JC, Mouncey, R., de Mestre, AM, Verheyen, KL, 2021. Retrospektif analisis dinamika populasi dan hasil balap tanaman anak kuda Thoroughbred Inggris dan Irlandia 2014 dan 2015. *Dokter hewan*. Rekam e298, 1-9.
- Arnold-Lehna, D., Venner, M., Berghaus, LJ, Berghaus, R., Gigure, S., 2020. Mengubah Kebijakan untuk mengobati anak kuda dengan *Rhodococcus equi* pneumonia pada perjalanan penyakit selanjutnya mengurangi penggunaan antimikroba tanpa meningkatkan angka kematian. *dokter hewan kuda*. J.52, 531-537.
- Baker, JR, Ellis, CE, 1981. Sebuah survei temuan post mortem pada 480 kuda tahun 1958 sampai 1980; (1) penyebab kematian. *dokter hewan kuda*. J.13, 43-46.
- DeLay, J., 2017. Temuan postmortem di kuda pacu Ontario, 2003-2015. *J. Dokter hewan. Diagnosa Selidiki*. 29, 457-464.
- Flash, ML, Wong, ASM, Stevenson, MA, Gilkerson, JR, 2020. Hambatan untuk masuk pelatihan balapan sebelum usia 4 tahun untuk kuda ras murni yang lahir di tanaman anak kuda Australia 2014. *Perpustakaan Umum. Sci. Satu* 15, 1-15.
- Galvin, N., Corley, K., 2010. Penyebab penyakit dan kematian sejak lahir hingga usia 12 bulan di kuda Thoroughbred di Irlandia. *Dokter hewan Irlandia*. J.63, 37-43.
- Lyle, CH, Uzal, FA, McGorum, BC, Aida, H., Blisset, KJ, Kasus, JT, Charles, JT, Gardener, I., Horadagoda, N., Kusano, K., et al., 2011. Kematian mendadak dalam pacuan kuda ras: Sebuah studi multisenter internasional tentang temuan post mortem. *dokter hewan kuda*. J.43, 324-331.

- McIlwraith, CW, 2004. Penyakit ortopedi perkembangan: masalah tungkai pada anak muda kuda. *J. Dokter Hewan Equine. Sci.* 24, 475-479.
- Morley, PS, Townsend, HG, 1997. Sebuah survei kinerja reproduksi di Kuda-kuda murni dan morbiditas, mortalitas dan potensi atletik anak kuda mereka. *dokter hewan kuda. J.*29, 290-297.
- Morrow, LD, Smith, KC, Piercy, RJ, du Toit, N., Beban, FA, Olmos, G., Gregory, N. G., Verheyen, KLP, 2011. Analisis Retrospektif Temuan Post-Mortem di 1.444 Keledai Berumur. *J.Kom. Patol.* 144, 145-156.
- Muscatello, G., Leadon, DP, Klayt, M., Ocampo-Sosa, A., Lewis, DA, Fogarty, U., Buckley, T., Gilkerson, JR, Meijer, WG, Vazquez-Boland, JA, 2007. Infeksi *Rhodococcus equi* pada anak kuda: ilmu 'kerincingan'. *dokter hewan kuda. J.*39, 470-478.
- O'Donohue, DD, Smith, FH, Strickland, KL, 1992. Insiden ekstremitas abnormal perkembangan di Irlandia keturunan asli dari lahir sampai 18 bulan. *dokter hewan kuda. J.*24, 305-309.
- Olstad, K., Ytrehus, B., Ekman, S., S. Carlson, C., Dolvik, NI, 2007. Lesi awal osteochondrosis di tibia distal anak kuda. *J.Ortop. Res.* 25, 1094-1105. Parkin, TD, Rosedale, PD, 2006. Epidemiologi pemborosan kinerja kuda: pentingnya menganalisis fakta dan menerapkan pesan mereka dalam manajemen. *dokter hewan kuda. J.*38, 98-100.
- Peugnet, P., Mendoza, L., Wimel, L., Duchamp, G., Dubois, C., Reigner, F., Caudron, I., Deliège, B., Toquet, M.-P., Richard, E., et al., 2016. Studi Longitudinal Pertumbuhan dan Status Osteoarticular di Foals Lahir Antar-Breed Embrio Transfer. *J. Dokter Hewan Equine. Sci.* 37, 24-38.
- Platt, H., 1973. Aspek etiologi kematian perinatal pada keturunan asli. Kuda *Dokter hewan. J.*5, 116-120.
- Roach, JM, Foote, AK, Smith, KC, Verheyen, KL, de Mestre, AM, 2020. Insiden dan penyebab keguguran setelah hari ke-70 kehamilan di Thoroughbreds. *dokter hewan kuda. J.* 00, 1-8.
- Smith, KC, Blunden, AS, Whitwell, KE, Dunn, KA, Wales, AD, 2003. Sebuah survei aborsi kuda, lahir mati dan kematian neonatus di Inggris dari tahun 1988 hingga 1997. *Dokter Hewan Equine. J.*35, 496-501.
- Takai, S., 1997. Epidemiologi infeksi *Rhodococcus equi*: tinjauan. *Dokter hewan. Mikrobiol.* 56, 167-176.
- Whittaker, S., Sullivan, S., Auen, S., Parkin, TDH, Marr, CM, 2012. Dampak dari berat lahir pada kesehatan kuda dan efisiensi reproduksi, dan kesehatan anak kuda dan kinerja balap berikutnya. *dokter hewan kuda. J.*44, 26-29.



Ulasan 100 Tahun: Deteksi, manajemen, dan pencegahan mastitis¹

Pamela L. Ruegg²

Departemen Ilmu Susu, Universitas Wisconsin, Madison 53706

ABSTRAK

Mastitis adalah penyakit yang paling sering terjadi pada sapi perah dan memiliki efek merugikan yang diakui dengan baik pada kesejahteraan hewan dan profitabilitas peternakan sapi perah. Sejak awal peternakan sapi perah modern, produsen telah mencari metode yang efektif untuk meminimalkan terjadinya mastitis pada ternak mereka. Tujuan dari makalah ini adalah untuk meninjau dan menyoroti kemajuan penting dalam deteksi, manajemen, dan pencegahan mastitis yang telah terjadi sejak volume pertama buku ini, *Jurnal Ilmu Susu* diterbitkan pada tahun 1917. Upaya penelitian awal diarahkan untuk memahami sifat bakteri patogen yang bertanggung jawab atas sebagian besar infeksi intramammary. Selama beberapa dekade, para peneliti bekerja untuk mengidentifikasi strategi yang efektif untuk mengendalikan mastitis yang disebabkan oleh: *Streptococcus agalactiae* dan *Stafilokokus aureus*. Untuk mengembangkan program pengendalian yang berhasil, pekerja mastitis pertama-tama harus mengidentifikasi mekanisme infeksi, menentukan keadaan klinis dan subklinis penyakit, menemukan tes skrining yang tepat, menentukan titik paparan yang mungkin, mengidentifikasi karakteristik spesifik patogen, dan mengembangkan prosedur yang efektif untuk pemerahan dengan mesin. Peneliti perintis akhirnya menyadari bahwa pengendalian mastitis didasarkan pada pencegahan infeksi baru terjadi pada sapi sehat dan mengurangi durasi sapi tetap terinfeksi. Pengembangan program pengendalian yang menggabungkan pencelupan puting susu setelah pemerahan, prosedur pemerahan yang higienis, dan penggunaan terapi antibiotik yang strategis pada pengeringan menghasilkan pengendalian patogen menular yang meluas. Ketika manajemen kawanan berubah, peneliti ditugaskan untuk menentukan kontrol mastitis yang disebabkan oleh patogen oportunistik yang berasal dari sumber lingkungan. Karena patogen mastitis telah berevolusi, para peneliti telah berusaha untuk mendefinisikan penggunaan antimikroba yang akan menjaga kesejahteraan hewan sambil meminimalkan penggunaan yang tidak perlu. Selama abad terakhir, kemajuan signifikan yang luar biasa dalam pengendalian mastitis telah dibuat tetapi mengubah struktur kawanan dan banyak lagi

standar prosesor yang ketat memastikan bahwa mastitis akan tetap menjadi fokus subjek penting dari penelitian masa depan. **Kata kunci:** mastitis, pencegahan, manajemen, tinjauan 100 tahun, *Jurnal Ilmu Susu*

PENGANTAR

Bukti sejarah menunjukkan bahwa sapi telah diperah setidaknya sejak 3100 SM (Nemet-Nejat, 1998) dan kemungkinan besar bovine mastitis telah ada sejak saat itu. Selama ribuan tahun, kontak dekat yang diperlukan untuk pemerahan susu dengan tangan memungkinkan pendeteksian kelainan susu dan kelenjar susu dengan mudah, tetapi sedikit yang diketahui tentang penyebab atau penanganan mastitis. Pemahaman yang lebih lengkap tentang mastitis tidak mungkin sampai perkembangan mikroskop yang memungkinkan deteksi mikroorganisme yang merupakan agen etiologi utama. Penyebutan mastitis sapi paling awal di *Jurnal Ilmu Susu* (JDS) terjadi pada edisi ketiga tahun 1917 dan difokuskan pada risiko kesehatan masyarakat yang terkait dengan jumlah bakteri susu mentah yang tinggi. Dalam studi tersebut, Breed dan Brew (1917) menjelaskan metode penilaian peternakan sapi perah yang mencakup penghitungan bakteri dalam susu dan mencatat bahwa "streptokokus rantai panjang" sering ditemukan dalam jumlah besar, bahkan ketika tanda-tanda peradangan sangat sedikit sehingga "petani tidak dapat disalahkan karena telah menyelamatkan susu." Para penulis melaporkan hasil bakteriologis dari beberapa survei kaleng susu mentah dan mencatat dalam satu survei (n = 9.387 kaleng), bahwa >20% "susu jumlah tinggi" dapat dikaitkan dengan "masalah ambing." Selama periode itu, streptokokus adalah penyebab utama mastitis yang diketahui dan konsep infeksi subklinis baru diketahui. Sejak itu, patogen, sapi, dan manajemen ternak telah berubah secara dramatis tetapi mastitis tetap merupakan penyakit penting pada sapi perah. Ratusan artikel penelitian dan review dengan topik bovine mastitis telah diterbitkan di JDS dan penekanannya telah diperluas (Lampiran Tabel A1). Efek mastitis pada kesehatan masyarakat, karakteristik pengolahan susu, kualitas susu, kesejahteraan hewan, dan profitabilitas peternakan telah menjadi terkenal. Standar kualitas untuk susu yang dapat diterima telah berkembang dan kekhawatiran tentang mastitis telah diperluas untuk mencakup efek dari program manajemen mastitis pada keberlanjutan peternakan dan persepsi konsumen. Itu karakteristik pengolahan susu, kualitas susu, kesejahteraan hewan, dan profitabilitas peternakan telah menjadi terkenal. Standar kualitas untuk susu yang dapat diterima telah berkembang dan kekhawatiran tentang mastitis telah diperluas untuk mencakup efek dari program manajemen mastitis pada keberlanjutan peternakan dan persepsi konsumen. Itu karakteristik pengolahan susu, kualitas susu, kesejahteraan hewan, dan profitabilitas peternakan telah menjadi terkenal. Standar kualitas untuk susu yang dapat diterima telah berkembang dan kekhawatiran tentang mastitis telah diperluas untuk mencakup efek dari program manajemen mastitis pada keberlanjutan peternakan dan persepsi konsumen. Itu

Diterima 14 April 2017.

Diterima 16 Juni 2017.

¹Ulasan ini adalah bagian dari edisi khusus *Jurnal Ilmu Susu* ditugaskan untuk merayakan 100 tahun penerbitan (1917–2017).

²Penulis yang sesuai: plruegg@wisc.edu

jumlah artikel penelitian di JDS yang mencakup konten tentang mastitis terus meningkat dari sekitar 3 pada tahun 1917 menjadi >100 pada tahun 2016. Tujuan dari tinjauan ini adalah untuk menyoroti kemajuan dalam deteksi, manajemen, dan pencegahan mastitis dengan penekanan pada penelitian yang dipublikasikan di JDS yang telah merangkul perubahan pemahaman kita tentang penyakit ini.

DETEKSI DAN DIAGNOSIS

Patogen Dulu dan Sekarang

Dalam tinjauan komprehensif, Plastridge (1958) mencatat bahwa bakteri penyebab mastitis pertama kali berkembang pada akhir 1800-an. Seorang peneliti mastitis awal (Murphy, 1947) mendefinisikan proses 3-fase untuk perkembangan mastitis berdasarkan (1) invasi organisme (dengan atau tanpa pembentukan infeksi), (2) infeksi (bakteri menjadi mapan di kelenjar), dan (3) peradangan. Proses ini terus menjadi dasar pemahaman kita tentang mastitis. Meskipun banyak bakteri diketahui dapat menyebabkan IMI, penekanan awal pengendalian mastitis diarahkan pada patogen yang diketahui menyebar di antara sapi dengan cara menular ketika puting susu terpapar bakteri dalam susu yang berasal dari kelenjar susu yang terinfeksi. Selama beberapa dekade, *Streptococcus agalactiae* dan *Stafilokokus aureus* dianggap sebagai patogen menular yang paling penting.

Streptococcus agalactiae dan Stafilococcus aureus

Kekhawatiran awal tentang mastitis sapi didasarkan pada kesehatan masyarakat dan diarahkan untuk mengurangi jumlah bakteri dari susu mentah. Breed dan Brew (1917) menyatakan, "Kami telah mengetahui bahwa mastitis adalah penyebab jumlah bakteri yang tinggi. Mastitis yang menyebabkan jumlah bakteri yang tinggi tanpa kecuali disebabkan oleh streptokokus." Seiring berkembangnya industri susu, pemahaman yang lebih luas tentang patogen mastitis muncul. Dalam sebuah manuskrip berjudul "A study of flaky milk," Jones dan Little (1927) melaporkan pengamatan 20 contoh di mana foremilk mengungkapkan "partikel flokulan." Meskipun streptokokus adalah bakteri yang paling umum diidentifikasi, stafilocokus hemolitik (kemungkinan besar *Staph. aureus*) menyumbang 20% dari bakteri patogen, dan hanya 1 kasus yang gagal menghasilkan pertumbuhan bakteri yang signifikan. Makalah itu berkontribusi pada pemahaman kita tentang mastitis karena mereka dengan tepat mendefinisikan kelainan yang diamati pada susu sebagai penggumpalan leukosit sebagai akibat peradangan yang disebabkan oleh IMI. Meskipun terjadinya sejumlah besar bakteri dalam susu merupakan masalah kesehatan masyarakat yang jelas, para peneliti mencatat bahwa tidak semua bakteri berasal dari IMI.

dan bahwa banyak aspek mastitis tetap tidak jelas. Pada tahun 1927, *radang. agalactiae* dianggap bertanggung jawab atas sekitar 90% IMI (Williams, 1927) dan kondisi subklinis merupakan alasan penting bahwa susu mengalami degradasi (dari grade A ke B). Selama periode ini, pekerja mastitis berjuang untuk menemukan cara yang efisien untuk mendeteksi sapi yang terinfeksi untuk mempertahankan status kelas A pada ternak yang terinfeksi (Williams, 1927). Masalah ini tetap penting karena prevalensi IMI pada 1950-an diperkirakan mendekati 50% sapi dan 25% kuartal (Plastridge, 1958). Penekanannya pada *radang. agalactiae* sebagai penyebab mastitis yang paling penting berlanjut selama beberapa dekade, meskipun mastitis dikaitkan dengan *Micrococcus pyogenes* (kemudian didefinisikan sebagai *Staph. aureus*) mulai dikenal pada tahun 1950-an (Plastridge, 1958).

Pada tahun 1956, pada pertemuan tahunan American Dairy Science Association, komite penyakit hewan melaporkan bahwa mastitis adalah "penyakit sapi perah paling mahal yang tidak terkendali dengan baik," (Murphy, 1956). Dalam makalah mani berjudul "Mastitis—Perjuangan untuk memahami," Murphy (1956) menggambarkan pengalaman bertahun-tahun dengan program pengendalian mastitis yang tidak efektif di New York dan Connecticut, dan menyimpulkan bahwa "masalahnya lebih besar daripada upaya tunggal apa pun yang dilakukan untuk memahaminya." Dia kemudian mempresentasikan 8 poin untuk membantu menentukan penyakit (Tabel 1). Poin-poin ini berfungsi sebagai dasar pemahaman modern kita tentang penyakit ini dan secara ringkas mendefinisikan tantangan yang melekat dalam pengendalian mastitis. Dia mencatat bahwa meskipun >20 jenis infeksi dapat menyebabkan mastitis, "setidaknya 99% disebabkan oleh...*str. agalactiae*, streptokokus lainnya, stafilocokus dan mastitis basiler (termasuk coliform, pseudomonas, dll)." Dia mengidentifikasi keadaan klinis, nonklinis, dan parah dan mencatat bahwa meskipun diskriminasi di antara patogen hanya dapat dilakukan dengan pengujian laboratorium, keadaan klinis dan nonklinis tidak terjadi pada frekuensi yang sama untuk semua patogen. Murphy (1956) lebih lanjut menyatakan bahwa penumpahan (dan kemungkinan kultur negatif) bervariasi di antara patogen dari waktu ke waktu dan menekankan perlunya program pengendalian spesifik patogen sehingga pengobatan yang tepat dapat diterapkan pada sapi yang terkena *radang. agalactiae* sambil menyerukan penelitian untuk mengidentifikasi sumber lingkungan paparan patogen lain.

Patogen Lingkungan

Sampai akhir 1970-an, sedikit penekanan ditempatkan pada organisme gram negatif sebagai penyebab mastitis. Eberhart (1977) mengarahkan perhatian awal pada munculnya coliform sebagai patogen mastitis dan pada tahun 1979 sebuah makalah berjudul "Coliform mastitis—A review" diterbitkan di JDS oleh Coliform Subcommittee of the Research

Komite Dewan Mastitis Nasional (1979). Tinjauan komprehensif ini mencakup deskripsi kebutuhan pertumbuhan berbagai bakteri coliform, mekanisme IMI (dengan penekanan pada paparan dan pergerakan melalui saluran puting susu), penjelasan tentang patogenesis (termasuk pengenalan bahwa besarnya peradangan tergantung pada faktor host), yang sangat baik. penggambaran epidemiologi dan faktor risiko, dan rekomendasi untuk program pengendalian model. Publikasi ulasan ini menandakan kesadaran tentang pentingnya munculnya mastitis yang disebabkan oleh organisme lingkungan oportunistik. Pada tahun 1985, pentingnya mastitis lingkungan disorot oleh makalah simposium yang komprehensif berjudul "Mastitis lingkungan: Penyebab, prevalensi, pencegahan," (Smith et al., 1985). Dalam makalah itu, Kemajuan dalam mengendalikan patogen menular kontras dengan munculnya mastitis yang disebabkan oleh patogen lingkungan. Mereka menggambarkan hasil studi longitudinal dari kawanan universitas yang mencirikan karakteristik mikrobiologis, epidemiologi,

ology, kontrol, dan pengobatan baik gram positif dan gram negatif patogen yang berasal terutama dari paparan lingkungan (Smith et al., 1985). Mereka mengakui pentingnya mengurangi paparan ujung puting susu, menyoroti perbedaan kerentanan di antara sapi, dan membedakan perbedaan antara gram negatif dan gram positif (terutama *Streptokokus* spp.) patogen oportunistik. Perbedaan antara patogen, pentingnya IMI selama periode kering, tingginya tingkat pembersihan spontan IMI gram negatif, dan peningkatan tingkat kasus klinis (vs IMI subklinis) yang terkait dengan patogen lingkungan semuanya dijelaskan secara menyeluruh. Mereka dengan tepat memprediksi tantangan untuk mengurangi mastitis lingkungan pada kawanan yang telah secara efektif mengendalikan organisme menular dan merangkum rekomendasi untuk pengendalian mastitis yang tetap relevan untuk peternakan sapi perah yang dikelola secara intensif dan modern.

Kelompok yang sama (Hogan et al., 1989) kemudian melaporkan bahwa kawanan dengan SCC rendah (menunjukkan keberhasilan pengendalian

Tabel 1. Garis besar untuk pemahaman mastitis (direproduksi dari Murphy, 1956)

Bentuk penyakit berdasarkan kultur laboratorium	Stadium klinis berdasarkan pengamatan gandang			
	Non-klinis negatif untuk tes gandang*	Klinis ringan positif untuk gandang tes saja*	parah-klinis; juga bengkak atau penyakit umum	
Poin 1. Masing-masing dari empat bentuk penyakit dapat muncul di setiap tahap klinis.				
Poin 2. Tanpa kultur laboratorium, stadium klinis dari setiap bentuk tidak dapat dibedakan satu sama lain.				
streptokokus, <i>radang. agalactiae</i>	Ya	Ya	Ya	
Streptococcal, lainnya	Ya	Ya	Ya	
Stafilokokus	Ya	Ya	Ya	
basiler	Ya	Ya	Ya	
Poin 3. Stadium klinis tidak terjadi dengan frekuensi yang sama pada setiap bentuk penyakit. Poin 4. Semua bentuk penyakit dapat berfluktuasi antar stadium klinis, kecuali mastitis klinis berat yang disebabkan oleh: <i>radang. agalactiae</i> jarang terjadi.				
streptokokus, <i>radang. agalactiae</i>	+++ ↔	++ ↔	Langka	
Streptococcal, lainnya	+++ ↔	+ ↔	+	
Stafilokokus	++ ↔	++ ↔	+	
basiler	+ ↔	++ ↔	++	
Poin 5. Keempat bentuk penyakit ini memiliki karakteristik shedding yang berbeda.				
streptokokus, <i>radang. agalactiae</i> Durasi panjang, positif hampir setiap hari	+++ ↔	++ ↔	Langka	
Streptococcal, lainnya Durasi variabel, positif hampir setiap hari	+++ ↔	+ ↔	+	
Staphylococcal Durasi variabel, tidak positif setiap hari	++ ↔	++ ↔	+	
Bacillary Durasi pendek, sering negatif saat dibudidayakan	+ ↔	++ ↔	++	
Poin 6. <i>Ituradang. agalactiae</i> bentuk penyakit adalah satu-satunya yang dapat dihilangkan dari kawanan. Ini bernilai ekonomis.				
Poin 7. Habitat bakteri ini adalah lingkungan. Ini akan menjadi tugas penelitian yang monumental untuk menemukan mode operasi mereka. Sampai saat itu mereka tidak bisa dihilangkan dari kawanan.				
* Tes gandang seperti strip-cup, tes bromthymol-blue, tes White-side dan tes California Mastitis (CMT).				
Poin 8. Melalui pengobatan dan manajemen, tahap klinis dapat disembuhkan atau dipaksa sementara ke tahap nonklinis. Saat ini, tidak diketahui secara pasti praktik manajemen mana yang benar-benar bernilai.				

patogen mastitis menular) dapat mengalami masalah kesehatan ambing serius yang ditandai dengan tingginya tingkat kasus klinis. Dalam dekade berikutnya, situasi ini telah menjadi umum. Antara 1994 dan 2001, isolasi *radang. agalactia* dan *Staph. aureus* dari sampel susu yang diserahkan ke Laboratorium Diagnostik Hewan Wisconsin menurun drastis (Makovec dan Ruegg, 2003) dan patogen gram negatif (atau hasil kultur negatif) telah menjadi hasil dominan dari sampel susu yang diperoleh dari sapi yang mengalami kasus klinis (Oliveira et al., 2013). Data nasional yang dikumpulkan untuk ternak AS telah menunjukkan peningkatan yang cukup besar dalam tangki curah SCC, mencapai rata-rata tertimbang susu 194.000 sel/mL pada tahun 2015 (USDA, 2015). Sebaliknya, dari tahun 1996 hingga 2014, insiden mastitis klinis yang dilaporkan di peternakan sapi perah AS meningkat dari 13% (USDA, 1996a) menjadi 25% (USDA, 2016). Meskipun mastitis disebabkan oleh *Staph. aureus* tetap menjadi tantangan bagi beberapa kawanan yang belum secara efektif menerapkan strategi pengendalian yang terkenal, berbagai patogen oportunistik (yaitu, *Enterobacteriaceae*, *Streptokokus* sp., *SSP*, *Lactococcus* sp., *Prototheca* sp., dan lain-lain) sering diidentifikasi sebagai patogen mastitis pada peternakan sapi perah modern (Bradley dan Green, 2001; Oliveira et al., 2013). Tantangan tambahan dengan patogen seperti *mikoplasma* sp. (Jasper, 1967; Fox, 2012) telah diakui penting untuk memperluas kawanan, terutama jika hewan bercampur dari berbagai lokasi. Mengidentifikasi mekanisme untuk mengurangi paparan dan meningkatkan resistensi terhadap IMI yang disebabkan oleh organisme oportunistik dan muncul sementara juga mendefinisikan intervensi yang tepat untuk sapi yang terkena dampak akan terus menjadi tantangan bagi petani, dokter hewan, dan peneliti di masa depan.

Diagnosis dan Dampak Mastitis

Hitung Leukosit. Pengembangan tes yang dapat diandalkan untuk mendeteksi mastitis merupakan prioritas bagi peneliti awal yang ingin memastikan keselamatan publik, menghasilkan produk susu berkualitas tinggi, dan memiliki sarana praktis untuk mengelola sapi yang terkena dampak (Halvorsen et al., 1934; Shaw et al., 1937). Metode deteksi yang dievaluasi meliputi pemeriksaan mikroskopis langsung bakteri pada susu, pencacahan leukosit susu, kultur mikroba, dan deteksi berbagai konstituen susu yang abnormal (seperti kandungan klorida; Halvorsen et al., 1934). Penghitungan leukosit dengan cepat muncul sebagai tes yang praktis dan dapat diulang tetapi ketidaktahuan umum tentang sifat respons inflamasi terhadap IMI menyulitkan peneliti awal untuk menyepakati ambang batas yang tampaknya sehat. Meskipun ambang batas yang digunakan untuk mendefinisikan mastitis sangat bervariasi (mencapai 3.000.000 sel/mL),

kelenjar mengandung <100.000 sel/mL dan mengidentifikasi sekitar 200.000 hingga 250.000 sel/mL sebagai ambang batas yang masuk akal untuk membedakan sampel susu yang sehat dan abnormal (Prouty, 1934). Namun, ambang batas ini tidak diadopsi secara seragam selama bertahun-tahun, mungkin karena prevalensi keseluruhan sapi dengan infeksi subklinis cukup tinggi dan peneliti tidak dapat mencapai konsensus untuk mendefinisikan susu normal. Selama bertahun-tahun, ambang batas 500.000 sel/mL dikombinasikan dengan isolasi >200 cfu/mL bakteri patogen umumnya digunakan untuk mendefinisikan mastitis subklinis (Plastridge, 1958).

Pada tahun 1953, insiden mastitis subklinis ditemukan menjelaskan hampir 80% dari jumlah leukosit susu yang dikirim ke pengolah, dan penelitian ini menetapkan tahap untuk penggunaan penghitungan leukosit sebagai alat manajemen ternak (MacLeod et al., 1953). Perkembangan berikutnya dari California Mastitis Test (CMT; Schalm dan Noorlander, 1957) dan Wisconsin Mastitis Test (Postle, 1964) menyediakan metode yang murah dan cepat untuk mendeteksi dan mengelola infeksi subklinis tetapi tes ini mengharuskan produsen untuk mengumpulkan susu dan mengevaluasi hasil secara subjektif, sehingga membatasi penerapannya. Pengembangan metode yang lebih cepat dan lebih otomatis untuk menghitung sel somatik dalam susu merupakan bidang penelitian intensif selama tahun 1960-an (Paape et al., 1965). Ketika metode untuk mengukur SCC dikembangkan, otoritas pengatur mulai menetapkan batasan untuk SCC tangki curah. Di Amerika Serikat, tangki curah maksimum SCC (1.500.000 sel/mL) pertama kali diberlakukan pada tahun 1967. Batas tersebut diturunkan beberapa kali dan distabilkan pada 750.000 sel/mL pada tahun 1993. Batas di negara bagian Eropa utara jauh lebih rendah; pada tahun 1992, Uni Eropa mengadopsi batas yang digunakan untuk produk yang ditujukan untuk pasar internasional.

Penekanan pada pengurangan SCC tangki curah memerlukan identifikasi sapi yang terinfeksi dan mengarah pada langkah penting untuk memasukkan tes SCC dalam program DHI bulanan (Funk et al., 1967). Era modern dalam mengelola kesehatan ambing dengan menggunakan pengujian SCC bulanan pada masing-masing sapi dimulai dan, akhirnya, nilai SCC mulai digunakan secara rutin sebagai alat manajemen mastitis (Reneau, 1986). Penggunaan nilai SCC bulanan merupakan penyimpangan dari program sebelumnya yang mendefinisikan mastitis berdasarkan hampir secara eksklusif pada kultur sampel susu. Mempelajari bagaimana menginterpretasikan SCC dengan benar membutuhkan pengetahuan imunologi dan fisiologi, dan tinjauan komprehensif SCC susu yang diterbitkan pada tahun 1994 tetap menjadi referensi yang relevan untuk memahami faktor-faktor yang mempengaruhi nilai-nilai ini (Harmon, 1994). Hari ini,

Dampak Mastitis.Efek negatif dari mastitis klinis sudah jelas, tetapi dampak penuh dari penyakit ini baru diketahui secara bertahap. Meskipun peneliti awal mengakui bahwa mastitis menghambat pembentukan dadih (Hansen et al., 1934) dan mengakibatkan penurunan produksi susu (Shaw dan Beam, 1935; White et al., 1937), efek mastitis subklinis pada kualitas produk, hasil susu, dan produktivitas keseluruhan tidak mudah diukur sampai metode deteksi infeksi subklinis yang akurat dikembangkan. Perkembangan skor sel somatik (Ali dan Shook, 1980; Wiggans dan Shook, 1987) memungkinkan peneliti untuk mengukur hubungan linier antara mastitis subklinis dan penurunan produksi susu. Menentukan bahwa setiap 1 unit peningkatan SCS (atau dua kali lipat SCC di atas 50, 000 sel/mL) mengakibatkan kehilangan produksi yang konstan (-91 dan 181 kg per laktasi untuk paritas 1 dan >1, masing-masing) memungkinkan produsen untuk memahami efek luar biasa dari mastitis subklinis pada produktivitas ternak. Nilai-nilai ini terus menjadi dasar untuk memperkirakan dampak ekonomi mastitis pada peternakan sapi perah.

Peradangan diketahui merusak kelenjar susu, tetapi efek mastitis di luar ambing tidak terlihat sampai para peneliti mulai berfokus pada patogen lingkungan. Ketika para peneliti mempelajari mastitis yang disebabkan oleh patogen gram negatif, studi eksperimental menunjukkan bahwa endotoksin dapat mengurangi kesuburan (Gilbert et al., 1990), dan beberapa studi observasional kemudian dilakukan untuk mengeksplorasi hubungan ini. Awalnya, para peneliti menyadari bahwa terjadinya mastitis klinis yang disebabkan oleh patogen gram negatif dan gram positif mengakibatkan penurunan tingkat konsepsi dan peningkatan hari untuk konsepsi (Barker et al., 1998). Penelitian ini diikuti oleh penelitian yang mengidentifikasi efek merugikan yang serupa untuk sapi yang terkena mastitis subklinis selama periode awal pembiakan (Schrick et al., 2001).

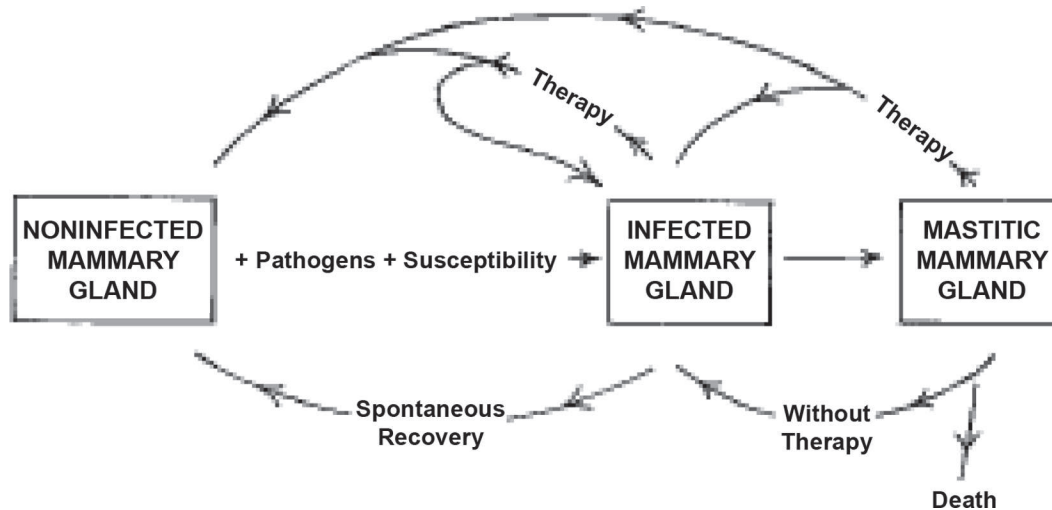
PENGELOLAAN

Definisi Pengendalian Mastitis Modern

Pada tahun 1956, Murphy mendefinisikan masalah mastitis (Murphy, 1956; Tabel 1) tetapi dengan cermat mencatat bahwa pengobatan tidak akan menjadi solusi dan menyerukan penelitian untuk menentukan nilai dari berbagai praktik manajemen yang belum terbukti. Pekerja mastitis menyadari bahwa mastitis adalah penyakit multifaktorial tetapi mereka kekurangan

penelitian yang memungkinkan mereka untuk memprioritaskan efek dari berbagai praktik pencegahan. Dalam dekade berikutnya, para peneliti Inggris dari Institut Nasional untuk Penelitian di Dairying mengevaluasi program manajemen yang berfokus pada pemahaman dinamika IMI (Gambar 1; Dodd et al., 1964). Mereka sampai pada persamaan sederhana bahwa persentase tempat yang terinfeksi dalam kawanan adalah fungsi dari tingkat infeksi baru dan durasi infeksi tersebut (Gambar 2; Dodd et al., 1964). Mereka mencatat bahwa pengobatan efektif untuk mengurangi durasi (dan mengendalikan) *radang. agalactiae*) tetapi nilainya kecil untuk menghilangkan infeksi stafilocokus, sehingga penekanan diarahkan pada pengurangan tingkat IMI baru. Sementara Neave dan Dodd bereksperimen dengan dampak dari berbagai praktik manajemen (Neave et al., 1966), mereka dengan benar mencatat bahwa, "itu berarti bahwa kontrol akan bergantung pada kemampuan untuk membujuk ribuan orang dengan kemampuan berbeda untuk menyesuaikan diri. untuk pola kerja tertentu." Empat dekade kemudian, para peneliti terus mempelajari metode untuk membujuk petani untuk meningkatkan manajemen mastitis (Valeeva et al., 2007).

Pada tahun 1969, JDS menerbitkan serangkaian makalah simposium yang menggambarkan kemajuan dalam pengendalian mastitis (Dodd et al., 1969; Neave et al., 1969; Norcross dan Stark, 1969; Philpot, 1969; Read, 1969). Seri ini diperkenalkan oleh Frank Dodd, yang diakui sebagai pelopor penting dalam bidang pengendalian mastitis. Dia merangkum data dari studi longitudinal 721 sapi di 14 kawanan (Dodd et al., 1969). Pada awal penelitian, 57% sapi terkena mastitis subklinis, 80% di antaranya disebabkan oleh streptokokus atau stafilocokus. Sepanjang studi selama setahun, mereka mencirikan sifat dinamis dari infeksi baru, terjadinya mastitis klinis (pada sapi dengan IMI), dan efek dari berbagai strategi pengobatan untuk mengurangi prevalensi secara keseluruhan. Mereka juga bereksperimen dengan berbagai praktik manajemen yang disebut sebagai "sistem kebersihan". Mereka berkomentar bahwa program pengendalian mastitis yang ideal "harus jauh lebih murah daripada kerugian yang disebabkan oleh penyakit, harus relatif mudah dilakukan, harus ada bukti eksperimental yang baik bahwa pengendalian bekerja di bawah berbagai kondisi, dan harus jelas bagi para petani yang mengadopsi metode bahwa mastitis klinis jauh berkurang." Dalam makalah yang menyertainya, Neave et al. (1969) menjelaskan hasil eksperimen lapangan yang mengevaluasi efek penerapan "sistem kebersihan penuh." Mereka menjelaskan hasil dari serangkaian percobaan dan percobaan lapangan yang secara sistematis mengevaluasi penggunaan disinfeksi dot sebelum pemerahan dengan handuk individu, penggunaan sarung tangan pemerahan, sanitasi cangkir dot, dan kemanjuran celup puting setelah pemerahan.



Gambar 1. Kemungkinan urutan kejadian dalam perkembangan infeksi dan mastitis. Dicitak ulang dari Dodd et al. (1964) dengan izin.

dalam pengurangan 44% dalam tingkat infeksi baru (Tabel 2) dan menganjurkan penggunaan terapi antibiotik di kering-off untuk lebih mengurangi infeksi. Di tahun-tahun mendatang, rencana ini diadopsi secara luas sebagai dasar pengendalian mastitis modern dan karya Dodd dan Neave berkontribusi besar dalam meningkatkan kesehatan ambing dan kualitas susu di seluruh dunia. Pekerjaan mereka segera memimpin Dewan Mastitis Nasional yang baru dibentuk untuk mengembangkan program pengendalian mastitis yang dikenal sebagai "Rencana 5 Poin" yang merupakan dasar untuk mengendalikan mastitis menular dan mencakup (1) pencelupan puting susu pasca-memerah yang efektif, (2) penggunaan terapi antibiotik sapi kering setiap triwulan pada akhir setiap laktasi, (3) pengobatan yang tepat untuk kasus klinis, (4) pemusnahan sapi yang terkena penyakit kronis, dan (5) pemeliharaan peralatan susu untuk memastikan vakum ujung puting yang stabil.

Terapi antimikroba

Selama era pra-antibiotik, sedikit yang bisa dilakukan dengan sapi yang mengembangkan IMI dan sedikit yang diketahui tentang cara membatasi penularan. Peneliti awal menetapkan bahwa pemeriksaan susu secara berkala, diikuti dengan pemisahan dan pemusnahan selektif sapi yang terkena dampak, dapat digunakan untuk membuat ternak bebas dari *radang. agalactiae* (Plastridge dkk., 1936). Namun, strategi pengendalian ini sulit diterapkan dan ketika antimikroba tersedia, para peneliti dengan cepat memulai eksperimen untuk menentukan cara menggunakannya. Meskipun pemberian dosis besar (yang mengakibatkan toksisitas pada beberapa sapi), studi awal dengan sulfanilamide oral gagal mencapai konsentrasi yang efektif dalam darah atau susu dan peneliti mencatat bahwa "pengobatan dengan sulfanilamide berhasil memulihkan aliran normal dan penampilan normal susu... tapi itu tidak menghilangkan streptokokus dari

ambing, atau mencegah serangan akut di kemudian hari (Gildow et al., 1938). Komentar ini merupakan indikasi pertama bahwa tayangan klinis dapat menyesatkan dalam menentukan kemanjuran senyawa antimikroba dan menggambarkan kesulitan memisahkan terjadinya peradangan dari IMI aktif. Eksperimen dengan penisilin intramammary dimulai pada tahun 1940-an dan efikasi in vitro penisilin terhadap organisme mastitis gram positif ditetapkan pada tahun 1945 (Seeley et al., 1945). Bahkan di tahun-tahun awal, para peneliti menyadari bahwa pengobatan menggunakan penisilin jauh lebih manjur terhadap *radang. agalactiae* daripada infeksi stafilokokus (Seeley et al., 1945). Ketidakefektifan pengendalian mastitis berdasarkan pengobatan kasus klinis dicatat sangat awal dalam makalah oleh Murphy (1956) dan diringkas dengan pernyataan yang mengesankan bahwa "kesia-siaan berpikir bahwa mastitis dapat dikendalikan oleh pengobatan mastitis klinis hanya harus jelas. Ini hanya memotong pucuk rumput liar dan meninggalkan akarnya." Namun, terlepas dari keberhasilan yang bervariasi dan pemahaman yang terbatas tentang cara efektif untuk mengurangi infeksi baru, penggunaan antibiotik untuk mengobati mastitis dengan cepat diadopsi untuk sapi menyusui dan sapi kering. Mastitis tetap merupakan penyakit bakteri yang paling umum di sebagian besar peternakan sapi perah, dan akibatnya, pengobatan dan pencegahan mastitis merupakan mayoritas antimikroba yang diberikan pada sapi perah dewasa (Pol dan Ruegg, 2007b; Saini dkk., 2012; González Pereyra dkk., 2015; Kuipers dkk., 2016; Steven et al., 2016). Penggunaan tersebut menjadi perhatian yang meningkat bagi konsumen dan otoritas kesehatan masyarakat, dan penelitian tambahan diperlukan untuk menentukan penggunaan antimikroba yang tepat yang menyeimbangkan kesejahteraan hewan dengan kekhawatiran masyarakat tentang peran penggunaan antimikroba di pertanian dalam pengembangan resistensi antimikroba.

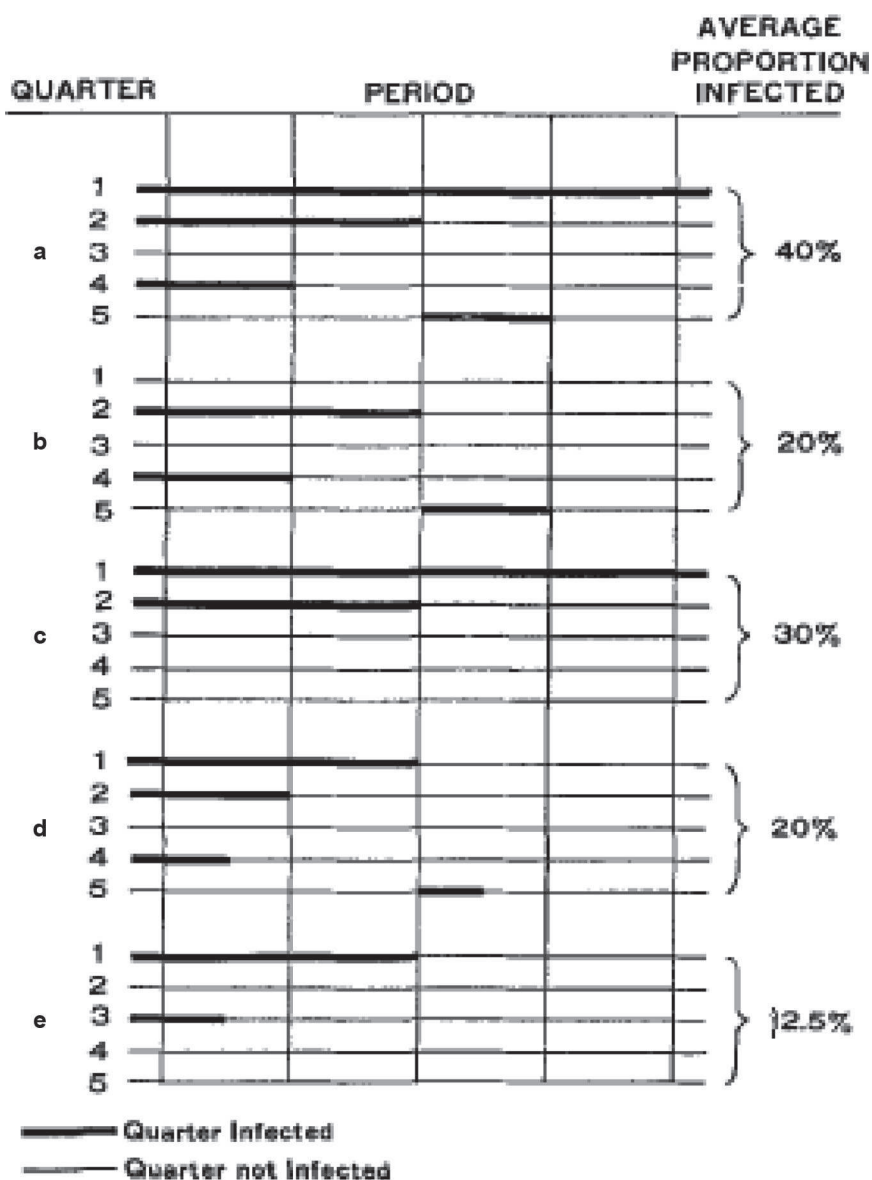
Meja 2. Hasil uji coba lapangan yang membandingkan manajemen kawanan normal (kontrol) dengan program higiene penuh atau sebagian, menunjukkan pengurangan proporsional (%) dalam tingkat infeksi baru dengan 3 sistem higiene (direproduksi dari data pada Tabel 4 di Neave et al., 1969); hasil yang signifikan ditampilkan dalam huruf tebal

Uji coba ¹	Perbandingan kebersihan ²	Penurunan baru infeksi	Penurunan baru <i>Stafilokokus aureus</i> infeksi	Penurunan baru infeksi streptokokus
MFE ₁	Penuh vs. kontrol	45(45)₃	33 (41) ₃	60(62)₃
MFE ₂	Penuh vs. kontrol	58	62	70
MFE ₂	Sebagian vs. kontrol	44	55	63
MFE ₂	Penuh vs sebagian	25	17	19

¹MFE₁= percobaan lapangan pertama, menggunakan 14 kelompok selama 12 bulan; MFE₂= percobaan lapangan kedua, menggunakan 15 kawanan selama 18 bulan.

²Kebersihan penuh = cangkir puting susu dipasteurisasi, ambing didesinfeksi dengan kain atau handuk ambing terpisah, dan celup puting. Kebersihan sebagian = cangkir dot tidak didesinfeksi, disinfektan dengan kain ambing atau handuk terpisah, dan celup dot. Kontrol = cangkir dot tidak didesinfeksi, ambing dicuci dengan air dan kain biasa, dan tidak dicelupkan dot.

³Setelah penyesuaian untuk jumlah rata-rata kuartal yang terinfeksi di awal.



Gambar 2. Faktor-faktor yang mempengaruhi tingkat rata-rata infeksi dalam kawanan: pencegahan infeksi baru dan pengurangan durasi infeksi. Dicitak ulang dari Dodd et al. (1964) dengan izin.

Pengobatan Antibiotik Selama Menyusui. Pada tahun 1969, penggunaan terapi antibiotik telah mapan, dan sebuah artikel ulasan berjudul "Peran terapi dalam pengendalian mastitis" diterbitkan sebagai bagian dari simposium mastitis ADSA (Philpot, 1969). Sesuai untuk periode ini, penekanannya adalah pada pengobatan IMI yang disebabkan oleh: *radang. agalactia* dan *Staph. aureus*. Rekomendasi tentang pengobatan mastitis subklinis termasuk preferensi untuk pemberian obat spektrum luas intramammary tersuspensi dalam volume yang relatif kecil dari kenderaan berair. Meskipun penggunaan antibiotik untuk mengobati mastitis sudah umum, keterbatasan terapi sudah diketahui saat ini. Philpot (1969) menekankan bahwa prognosis yang sangat baik untuk pengobatan *radang. agalactiae* sebagian karena lokasi infeksi pada sistem saluran susu. Sebaliknya, ketika mengacu pada *Staph. aureus*, ia melaporkan bahwa "prognosis mengenai terapi sangat rendah" karena organisme "menembus dinding saluran ambing dan menjadi mapan di banyak fokus." Dia lebih lanjut menyatakan, "hambatan jaringan di dalam ambing jauh lebih penting dalam kegagalan terapi daripada masalah resistensi obat." Meskipun ia mendokumentasikan bahwa pengobatan tunggal penisilin akan menghasilkan eliminasi sekitar 90% dari IMI yang disebabkan oleh: *radang. agalactiae*, ia mengutip 5 penelitian yang menunjukkan kemanjuran yang diharapkan sebesar 50% untuk pengobatan IMI stafilokokus. Yang penting, ini adalah publikasi pertama yang mencakup rekomendasi untuk meninjau faktor individu hewan (usia, tahap laktasi, tingkat produksi susu, silsilah, dan tingkat keparahan infeksi) sebelum memutuskan untuk menggunakan antibiotik untuk mengobati sapi yang terkena *Staph. aureus*. Tiga dekade kemudian, rekomendasi ini divalidasi dalam penelitian yang mengevaluasi faktor-faktor yang terkait dengan penyembuhan bakteriologis mastitis yang disebabkan oleh: *Staph. aureus* (Sol dkk., 1997, 2000; Barkema et al., 2006). Serupa dengan Philpot (1969), penelitian ini mengkonfirmasi tingkat kesembuhan bakteriologis yang rendah (30–50%) dan menunjukkan bahwa usia sapi, SCC, infeksi di bagian depan, dan tahap laktasi adalah penentu paling penting dari hasil yang sukses. Baru-baru ini, ulasan yang sangat dikutip tentang sapi, patogen, dan faktor pengobatan yang berkontribusi terhadap keberhasilan terapi sapi yang terinfeksi *Staph. aureus* sekali lagi menekankan bahwa hanya hewan terpilih yang akan merespon terapi antibiotik (Barkema et al., 2006). Philpot (1969) menyimpulkan makalahnya dengan pernyataan berikut yang relevan saat ini seperti saat pertama kali diterbitkan (ditulis dengan huruf kapital seperti dalam kutipan asli): "Terapi dapat menjadi tambahan yang berharga untuk program pengendalian mastitis yang efektif. Ini harus digunakan, bagaimanapun, dengan kesadaran penuh bahwa ITU KURANG EFEKTIF DALAM MENGHILANGKAN BANYAK INFEKSI YANG ADA DAN BAHWA

TIDAK MENGHAMBAT PERKEMBANGAN PALING INFEKSI BARU."

Karena mastitis koliform diakui sebagai masalah yang muncul, para peneliti mulai mengevaluasi tantangan unik dalam mengobati infeksi ini. Meskipun diakui bahwa banyak kasus tidak parah, mendefinisikan pengobatan yang efektif untuk kasus perakut dan akut adalah prioritas tinggi dan hampir tidak ada studi terkontrol yang tersedia untuk memandu keputusan pengobatan (Subkomite Coliform dari Komite Penelitian Dewan Mastitis Nasional, 1979). Awalnya, rekomendasi untuk pengobatan adalah empiris dan termasuk sering keluar susu, pemberian antibiotik sistemik dan intramammary, cairan suportif, dan terapi anti-inflamasi. Para penulis mencatat bahwa antibiotik yang disetujui dengan spektrum gram negatif tidak tersedia. Dengan demikian, pilihan antibiotik termasuk obat-obatan yang akan segera dilarang untuk digunakan pada sapi perah (seperti kloramfenikol) dan obat lain yang tidak memiliki periode penahanan yang disetujui oleh Food and Drug Administration (Subkomite Coliform dari Komite Penelitian Dewan Mastitis Nasional, 1979). Sampai tahun 1990-an, beberapa percobaan dilakukan untuk memvalidasi rekomendasi untuk pengobatan mastitis coliform tetapi percobaan awal menunjukkan bahwa terapi antimikroba tidak meningkatkan hasil mastitis yang disebabkan oleh *Escherichia coli* (Pyörälä et al., 1994) dan menantang konsep yang berlaku tentang bagaimana mastitis harus dirawat. Peran penting dari respon imun host dalam pembersihan infeksi coliform (daripada terapi antibiotik) telah disorot oleh badan penelitian yang penting (Burvenich et al., 2003, 2007). Meskipun beberapa obat spektrum yang lebih luas kemudian tersedia, peningkatan proporsi kasus klinis kultur-negatif dan peningkatan keragaman agen etiologi telah mendorong pengembangan protokol pengobatan selektif (Lago et al., 2011a,b). Rekomendasi saat ini untuk pengobatan mastitis klinis didasarkan pada penggunaan antibiotik yang ditargetkan untuk sebagian besar kasus gram positif sambil memberikan waktu untuk penyembuhan spontan sebagian besar kasus lainnya (Ruegg, 2017). Dengan meningkatnya tekanan untuk mengurangi penggunaan antibiotik di peternakan sapi perah,

Terapi Antibiotik Sapi Kering. Pekerja mastitis awal mengakui bahwa sekitar 50% sapi memiliki IMI sehingga penggunaan terapi antibiotik untuk mengurangi durasi IMI direkomendasikan sebagai bagian dari program pengendalian mastitis yang komprehensif (Neave et al., 1969). Biaya susu yang dibuang dan risiko residu susu (Albright et al., 1961) diakui sebagai keterbatasan penggunaan antibiotik untuk mengobati sebagian besar sapi menyusui yang terinfeksi sehingga

Tabel 3. Jumlah IMI baru terdeteksi selama 2 percobaan untuk mengevaluasi penggunaan terapi antibiotik sapi kering yang komprehensif dan kebersihan pemerahan (direproduksi dari data pada Tabel 2 dan 5 di Eberhart dan Buckalew, 1972)

Uji coba	Kelompok	Periode	Perempat terinfeksi					Total	jumlah baru IMI/tahun sapi
			<i>Streptokokus agalactiae</i>	<i>Stafilokokus aureus</i>	Lainnya streptokokus	Coliform	Lainnya		
1	Kontrol	Menyusui	53	51	25	13	4	146	1.50
		Kering	4	12	12	12	0	40	
		Total	57	63	37	25	4	186	
	Perlakuan	Menyusui	14	50	40	27	2	103	
		Kering	2	0	7	10	2	21	
		Total	16	20	47	37	4	124	
2	Kontrol	Menyusui	17	1	9	9	1	37	0,98
		Kering	2	1	3	1	1	8	
		Total	19	2	12	10	2	45	
	Perlakuan	Menyusui	0	4	9	3	0	16	
		Kering	0	1	3	4	0	8	
		Total	0	5	12	7	0	24	

1Percobaan 1 menggunakan 3 kawanan dengan sekitar 60 ekor sapi per kelompok; percobaan berlangsung 2 tahun dan prevalensi IMI pada awal percobaan ditandai sebagai tinggi. Percobaan 2 menggunakan 2 kawanan dengan sekitar 40 ekor sapi per kelompok; percobaan berlangsung 60 minggu dan prevalensi IMI pada awal percobaan ditandai sebagai rendah.

2Kontrol = tidak ada pencelupan puting susu dan tidak ada terapi antibiotik periode kering; puting didesinfeksi sebelum diperah dan dikupas, dan kasus mastitis klinis diobati dengan antibiotik. Perlakuan = puting menerima disinfeksi pasca pemerahan menggunakan celupan dot berbasis yodium; semua perempat diobati dengan antibiotik selama minggu 1 dan 2 setelah kering; puting didesinfeksi sebelum diperah dan dikupas, dan kasus mastitis klinis diobati dengan antibiotik.

penggunaan antibiotik terapi sapi kering (DCT) dieksplorasi. Para peneliti telah menetapkan bahwa sapi berisiko terkena IMI selama periode kering, dan manfaat tambahan dari mengurangi IMI baru selama periode ini telah dihipotesiskan (Neave et al., 1950). Mirip dengan kekhawatiran saat ini tentang pemberian antibiotik kepada hewan yang mungkin tidak terinfeksi, peneliti awal tidak setuju tentang sapi mana yang harus dirawat. Beberapa pihak berwenang merekomendasikan pengobatan semua bagian dari semua sapi sedangkan yang lain percaya bahwa hanya sapi yang terinfeksi yang harus diobati (Philpot, 1969). Tak lama setelah DCT dimulai, Natzke (1971) meninjau metode potensial pemilihan sapi untuk perawatan kering. Setelah membandingkan kultur bakteri, penggunaan tes skrining (seperti CMT), dan tinjauan riwayat mastitis klinis, dia menyatakan bahwa sensitivitas yang terbatas dari masing-masing metode tersebut mengarah pada kesimpulan "bahwa perawatan semua bagian dari semua sapi pada saat pengeringan adalah sistem yang disukai ..." Efektivitas DCT (dikombinasikan dengan pencelupan puting) kemudian ditunjukkan secara meyakinkan oleh beberapa studi lapangan. Penggunaan dot-dipping dan DCT komprehensif terbukti mengurangi IMI baru sekitar 50% pada kelompok dengan prevalensi IMI yang tinggi dan lebih rendah (Tabel 3), tetapi penulis mencatat bahwa "streptokokus lain" tidak dikendalikan secara efektif dan satu kelompok yang memulai percobaan dengan prevalensi IMI yang tinggi mengalami peningkatan infeksi yang disebabkan oleh bakteri coliform (Eberhart dan Buckalew, 1972).

peningkatan IMI baru, dan peningkatan kasus mastitis klinis pada sapi yang berada dalam kelompok perlakuan selektif (Ward dan Schultz, 1974), dan penggunaan DCT komprehensif menjadi komponen penting pengendalian mastitis pada peternakan sapi perah di Amerika Utara dan Amerika Serikat. Kerajaan. Sementara para peneliti terus memperdebatkan penggunaan antibiotik pada kelenjar yang tampaknya tidak terinfeksi (Rindsig et al., 1978; Poutrel dan Rainard, 1981; Schultze, 1983), peternak sapi perah AS dengan cepat mengadopsi praktik DCT komprehensif; pada tahun 1996, sekitar 77% petani menggunakan antibiotik DCT di semua tempat dari semua sapi di kering-off (USDA, 1996b). Sebaliknya, selama periode yang sama, peternakan sapi perah di Skandinavia memiliki tingkat IMI yang lebih rendah dan lebih suka menggunakan program sapi kering selektif (Schultze, 1983).

Sebagai peneliti belajar lebih banyak tentang risiko tinggi mastitis selama periode tidak menyusui, menjadi jelas bahwa DCT antibiotik tidak mampu mencegah IMI baru sepenuhnya selama periode periparturient (Oliver dan Sordillo, 1988). Kombinasi kekhawatiran tentang meluasnya penggunaan antibiotik dan keinginan untuk mengurangi IMI dengan lebih baik selama periode kering menghasilkan pengembangan dan pengenalan komersial dari sealant puting internal nonantibiotik (Woolford et al., 1998; Hillerton dan Kliem, 2002; Huxley et al., 2002), yang dengan cepat diadopsi sebagai tambahan untuk antibiotik DCT. Penurunan IMI yang berkelanjutan disebabkan oleh *radang agalactiae* dan *Staph. aureus* dan ketersediaan alternatif nonantibiotik untuk mencegah IMI baru kembali memicu perdebatan dan penelitian tentang DCT selektif (Halasa et al., 2010; Cameron et al., 2014; Scherpenzeel et al., 2014).

Model ekonomi telah menunjukkan bahwa keputusan untuk menggunakan antibiotik DCT selektif atau komprehensif sangat spesifik untuk pertanian (Huijps dan Hogeveen, 2007) tetapi ada kemungkinan bahwa peraturan pemerintah yang mendorong pengurangan penggunaan antibiotik akan menghasilkan lebih sedikit penggunaan antibiotik komprehensif di kekeringan. masa depan.

PENCEGAHAN

Pengaruh Mesin Perah dan Manajemen Pemerahan

Mesin pemerah susu. Selama abad yang dicakup oleh tinjauan ini, metode pemerahan dan manajemen pemerahan mengalami perubahan revolusioner yang jauh melampaui cakupan makalah ini. Kemajuan yang biasa selama periode ini diilustrasikan oleh komentar Witzel (1956), yang mengulas kemajuan teknik peternakan sapi perah di JDS untuk peringatan 50 tahun berdirinya American Dairy Science Association. Dia mencatat bahwa pada tahun 1950, ukuran kawanan rata-rata adalah 6 ekor sapi dan, meskipun 93% peternakan memiliki tenaga listrik, hanya 51% sapi yang diperah dengan mesin. Karena mesin pemerah susu dengan cepat menggantikan pemerahan tangan, para peneliti menjadi khawatir bahwa mesin tersebut dapat menyebabkan iritasi dan berfungsi sebagai penyebab penyebaran mastitis di antara sapi (Cone, 1942).

Studi inovatif awal tentang pemerahan mesin dilakukan oleh Espe dan Cannon (1942), yang menyuntikkan barium ke dalam sinus puting dan mengambil serangkaian radiografi yang menggambarkan fungsi sfingter puting. Eksperimen ini memberikan kontribusi besar untuk pemahaman kita tentang mekanisme dot dan menjelaskan mekanisme penetrasi bakteri melalui saluran coretan. Sebagai penelitian berkembang, efek tingkat vakum, stabilitas vakum, dan durasi pemerahan pada risiko mastitis diidentifikasi (Mochrie et al., 1953a,b; Eberhart et al., 1968). Akhirnya, peneliti menentukan bahwa fluktuasi vakum dan durasi pemerahan harus diminimalkan untuk mengurangi risiko IMI baru yang terkait dengan slip liner (Baxter et al., 1992).

Sebuah tinjauan dekade demi dekade kemajuan dalam penelitian pemerahan mesin diterbitkan di JDS oleh Thompson (1981) untuk peringatan 75 tahun berdirinya American Dairy Science Association. Thompson (1981) meninjau kemajuan dalam pengembangan mesin pemerah susu dan menyoroti penelitian tentang hubungan penting antara vakum pemerahan dan IMI. Dia menyimpulkan ulasannya dengan menekankan meningkatnya peran otomatisasi dalam proses pemerahan. Dia mencatat bahwa detacher otomatis telah menjadi perkembangan paling penting dalam otomatisasi pemerahan, meramalkan bahwa sensor akan

dikembangkan yang akan menghasilkan "otomatisasi lebih lanjut tidak hanya tugas pemerahan tetapi juga pencatatan dan analisis data manajemen." Dalam beberapa dekade sejak tinjuannya, sistem pemerahan susu otomatis telah menjadi hal biasa di banyak daerah tetapi penggunaan data yang efektif dari sistem tersebut masih belum dioptimalkan (Jacobs dan Siegford, 2012). Deteksi mastitis dan menjaga kesehatan ambing dalam sistem pemerahan otomatis tetap menjadi tantangan, dan peran penggembala yang "kompeten" dalam mengelola kesehatan ambing tetap sama pentingnya saat ini seperti dalam beberapa dekade terakhir (Hovinen dan Pyörälä, 2011).

Peninjau selanjutnya (Spencer, 1998) mendefinisikan peran mesin pemerah susu dalam menjaga kesehatan ambing. Pada saat ini, banyak kawanan telah dikendalikan *radang. agalactiae* dan *Staph. aureus*, dan prevalensi IMI telah menurun. Kemajuan dalam mesin pemerah susu telah sangat meningkatkan stabilitas vakum, dan standar instalasi untuk sistem pemerahan telah dikembangkan. Sementara Spencer (1998) mencatat bahwa mesin pemerah susu dapat mempengaruhi IMI baru dengan berfungsi sebagai fomite, memungkinkan infeksi silang dalam sapi, merusak sfingter dot atau menciptakan dampak dot, dia adalah salah satu yang pertama menunjukkan bahwa mesin pemerah jarang penyebab langsung IMI baru. Dia mengutip penelitian yang menunjukkan bahwa hanya 6,6% dari IMI baru yang diperhitungkan oleh faktor mesin pemerah susu dan menyimpulkan bahwa tidak ada bukti meyakinkan yang menghubungkan mesin pemerah susu dengan prevalensi keseluruhan infeksi kawanan (Spencer, 1998).

Manajemen pemerahan. Ketika mesin pemerah susu menjadi populer, menentukan prosedur pemerahan yang tepat merupakan prioritas penting. Pekerja mastitis awal telah mempelajari mekanisme fisiologis sekresi dan ejeksi susu, dan "pituitrin" (oksitosin) diidentifikasi sebagai zat yang secara positif dapat merangsang aliran susu (McCandlish, 1918). Sebagai mesin pemerah susu diadopsi, faktor-faktor yang dapat mempengaruhi pengeluaran susu dipelajari. Dalam satu percobaan yang luar biasa, efek ketakutan pada pengeluaran susu dievaluasi dengan menempatkan kucing di punggung sapi dan meledakkan kantong kertas setiap 10 detik selama 2 menit (penulis mencatat bahwa "kemudian kucing dikeluarkan karena tidak perlu"; Ely dan Petersen, 1941). Pekerjaan ini dengan jelas menunjukkan bahwa rasa takut memiliki efek yang signifikan dalam mengurangi pengeluaran ASI. *radang. agalactiae* segera terbukti mengakibatkan peningkatan terjadinya mastitis klinis (Schalm dan Mead, 1943). Penelitian ini memiliki pengaruh efek yang bertahan lama pada manajemen pemerahan. Meskipun penulis tidak melaporkan produksi susu sapi yang terdaftar dalam percobaan mereka, volume susu yang tersisa di ambing (sekitar 1 kg) mungkin mendekati 15 hingga 20% dari produksi susu harian normal sapi pada periode itu. Para penulis tidak melaporkan efek negatif pada sapi yang bebas dari IMI, tetapi ketakutan ini—bahwa meninggalkan susu di dalam

ambing menyebabkan mastitis—bertahan dan kemungkinan besar mendorong meluasnya penggunaan waktu perlekatan yang terlalu lama selama beberapa dekade berikutnya.

Hubungan antara kolonisasi bakteri pada kulit puting dan perkembangan IMI telah ditetapkan dengan baik dan penggunaan praktik manajemen yang mengurangi kontaminasi bakteri pada ujung puting merupakan aspek mendasar dari pengendalian mastitis. Dodd dkk. (1964) dan Neave et al. (1969) menetapkan pentingnya desinfeksi puting susu untuk pengendalian patogen menular. Dalam ulasan komprehensif tentang desinfeksi puting susu setelah pemerahan, Pankey et al. (1984) menyatakan, "antiseptis puting susu pascamemerah dianggap sebagai satu-satunya praktik paling efektif untuk pencegahan IMI pada sapi perah menyusui" tetapi memperingatkan bahwa itu tidak sama efektifnya terhadap coliform dan banyak streptokokus. Smith dkk. (1985) sependapat dan mencatat bahwa desinfeksi puting susu setelah pemerahan tidak secara efektif mengendalikan patogen lingkungan. Saat mastitis lingkungan muncul, peneliti mulai menyelidiki strategi pencegahan lainnya. Secara historis, sanitasi sebelum pemerahan biasanya dilakukan dengan mencuci ambing dan puting susu dengan air atau desinfektan, tetapi Galton et al. (1984, 1988) menunjukkan bahwa disinfeksi sebelum pemerahan pada puting (bukan ambing) diikuti dengan pengeringan yang efektif secara dramatis mengurangi perkembangan IMI yang disebabkan oleh *Streptococcus uberis*. Dalam uji coba lapangan, Pankey et al. (1987) menunjukkan penurunan 51% pada IMI baru yang disebabkan oleh streptokokus dan koliform ketika pra-perendaman dikombinasikan dengan "persiapan ambing yang baik." "Persiapan ambing yang baik" termasuk sanitasi puting susu, pengeringan menggunakan handuk sekali pakai, penebangan hutan, dan aplikasi pembersih celup selama minimal 30 detik. Pankey (1989) kemudian merekomendasikan standarisasi prosedur premilking dan penggunaan higiene ambing yang tepat pada setiap pemerahan. Di Amerika Serikat, persyaratan peraturan menyatakan bahwa puting susu harus disanitasi dan dikeringkan sebelum diperah, dan petani dengan cepat beralih dari mencuci ambing ke proses persiapan ambing yang baik (termasuk pra-perendaman dan pengeringan puting). Statistik nasional menunjukkan bahwa penggunaan sanitasi puting sebelum pemerahan dengan cangkir celup (atau semprotan) diikuti dengan pengeringan meningkat dari 58 menjadi 85% petani antara tahun 1996 (USDA, 1996b) dan 2014 (USDA, 2016). Meskipun terdapat perbedaan geografis dalam penerapan pra-perendaman dan prosedur pemerahan awal lainnya, kemungkinan preferensi prosesor untuk susu dengan sedikit kontaminasi bakteri, sedimen, atau residu akan terus mendorong penerapan praktik persiapan dot yang semakin ketat.

Strategi Pencegahan Penting Lainnya

Seleksi Genetik untuk Resistensi Mastitis. Kemampuan untuk menggunakan seleksi genetik untuk mengurangi mastitis telah berkembang secara bertahap. Sebagai bagian dari pekerjaan perintis mereka,

Murphy dkk. (1944) mengamati perbedaan tingkat IMI di antara keluarga sapi terpisah dengan produktivitas yang sama dalam satu kawanan dan mencatat bahwa perbedaan kerentanan yang diwariskan dapat berkontribusi pada pengembangan IMI. Perkiraan awal heritabilitas mastitis berkisar dari 0,27 (Legates dan Grinnells, 1952) hingga 0,38 (Lush, 1950), tetapi kemajuan menuju seleksi resistensi mastitis terhambat oleh perbedaan definisi penyakit dan kurangnya program pengujian. Kemajuan dalam seleksi genetik untuk resistensi mastitis tidak mungkin sampai adopsi luas pengujian SCC dalam program DHI. Seleksi untuk resistensi mastitis didorong karena peningkatan genetik dalam produksi susu terbukti berkorelasi dengan peningkatan kerentanan terhadap mastitis (Shook dan Schutz, 1994). Skor sel somatik (Ali dan Shook, 1980) dimasukkan ke dalam indeks seleksi AS pada tahun 1994 (Schutz, 1994). Meskipun meningkatkan resistensi mastitis belum menjadi prioritas tertinggi peternak sapi perah AS, kemajuan yang cukup besar telah terjadi di negara lain (Heringstad et al., 2008), dan inovasi masa depan dalam teknologi genom kemungkinan akan digunakan untuk mempercepat perolehan genetik dalam resistensi terhadap mastitis. (Vukasinovic et al., 2017).

Suplementasi dengan Vitamin E dan Selenium.

Peran manajemen nutrisi dalam perkembangan mastitis telah lama menjadi kontroversi dan sulit dipisahkan dari efek perancu lainnya. Plastridge (1958) secara keliru menyatakan bahwa pemberian makanan konsentrat tinggi merupakan faktor risiko mastitis tetapi efek langsung nutrisi pada mastitis tidak dilaporkan sampai Smith dan rekan kerja (1985) melakukan eksperimen yang menunjukkan bahwa defisiensi diet selenium dan vitamin E meningkatkan insiden dan durasi mastitis klinis. Eksperimen awal didukung oleh studi lapangan selanjutnya (Erskine et al., 1987; Weiss et al., 1990) yang menunjukkan peningkatan mastitis subklinis dan klinis pada ternak yang kekurangan selenium. Para peneliti melakukan eksperimen yang menunjukkan peran penting nutrisi ini dalam mempertahankan fungsi neutrofil yang efektif (Grasso et al., 1990; Hogan et al., 1990b, 1993). Peran penting vitamin E dan selenium dalam menjaga kesehatan ambing sekarang sudah mapan dan pekerjaan ini berkontribusi pada modifikasi diet dan pengetahuan penting tentang fungsi neutrofil.

Imunisasi. Pengembangan vaksin yang efektif untuk melindungi sapi dari pengembangan IMI baru telah menjadi tujuan banyak pekerja mastitis. Meskipun vaksin telah digunakan untuk secara efektif mengendalikan penyakit bakteri lain pada sapi perah, sifat mastitis menimbulkan banyak tantangan bagi keberhasilannya. Mastitis disebabkan oleh berbagai bakteri patogen yang berkembang dengan strain yang bervariasi di antara peternakan dan dari waktu ke waktu. Situs IMI dalam kelenjar susu, virulensi

karakteristik, dan kemampuan imunogenik semuanya bervariasi di antara patogen. Penelitian vaksin awal diarahkan pada pengembangan vaksin melawan *radang. agalactiae* dan *Staph. aureus* dan meskipun kemanjuran potensial ditunjukkan dalam percobaan laboratorium, percobaan lapangan awal gagal untuk menunjukkan bahwa imunisasi dapat mengurangi IMI baru (Oehme dan Coles, 1967; Mellenberger, 1977). Sementara beberapa *Staph. aureus* vaksin telah dikomersialkan, keberhasilan pengendalian organisme ini telah dicapai di banyak daerah tanpa menggunakan imunisasi berdasarkan penerapan prinsip-prinsip terkenal yang pertama kali dijelaskan oleh Dodd et al. (1964).

Berbeda dengan vaksin yang ditujukan pada patogen gram positif, tantangan eksperimental dan uji coba lapangan mampu menunjukkan kemanjuran yang dapat diterima dari vaksin antigen inti gram negatif (Hogan et al., 1990a, 1992a, b, 1995), dan beberapa vaksin dipasarkan ke membantu peternak sapi perah mengontrol gejala mastitis yang disebabkan oleh bakteri gram negatif. Vaksin Gram-negatif didasarkan pada antigen inti lipopolisakarida yang sangat terkonservasi, sehingga menghindari masalah variasi strain bakteri di antara peternakan. Mirip dengan vaksin yang ditujukan pada patogen gram positif, vaksinasi dengan vaksin gram negatif tidak memiliki efek besar dalam mengurangi IMI baru tetapi secara signifikan mengurangi perkembangan tanda-tanda klinis. Berbeda dengan mastitis yang disebabkan oleh *Staph. aureus*, sebagian besar IMI yang disebabkan oleh bakteri coliform mengembangkan tanda-tanda klinis yang menyebabkan sebagian besar kerugian ekonomi dan kesejahteraan yang terkait dengan infeksi ini. Kemampuan sapi yang divaksinasi untuk lebih cepat membersihkan infeksi dan mencegah perkembangan ke keadaan klinis telah mengakibatkan penggunaan vaksin ini secara luas. Pencarian vaksin yang manjur terus menjadi prioritas penelitian (Piepers et al., 2017), dan peneliti kontemporer menggunakan kemajuan imunologi untuk menguji vaksin baru terhadap *Staph. aureus*, streptokokus lingkungan, dan patogen lainnya.

Mastitis pada Sapi Primigravida. Sampai saat ini, sapi dara primigravida tidak dianggap terkena mastitis. Meskipun Schalm (1942) mengakui bahwa intersucking di antara anak sapi meningkatkan risiko mastitis pasca melahirkan yang disebabkan oleh *radang. agalactiae*, hampir tidak ada perhatian yang diberikan pada IMI pada sapi dara sampai Oliver dan Mitchell (1983) melaporkan hasil penelitian kecil di mana mereka menemukan frekuensi tinggi staphylococci dari sekresi susu yang dikumpulkan pada periode prepartum. Survei lapangan berikutnya menunjukkan perbedaan geografis yang luas dalam prevalensi dan jenis patogen berdasarkan wilayah dan waktu pengambilan sampel (Fox et al., 1995). Prevalensi IMI yang tinggi disebabkan oleh *Staph. aureus* awalnya dilaporkan untuk sapi dara prepartum di Amerika Serikat bagian selatan (Trinidad et al., 1990), dan menyebabkan eksperimen untuk mengidentifikasi intervensi yang tepat. Nickerson dkk. (1995) merangkum eksperimen yang dilakukan untuk mendefinisikan

prevalensi dan pengendalian IMI pada sapi perah. Berbeda dengan pada sapi dewasa, penggunaan terapi antimikroba pada sapi dara prepartum ditemukan sangat manjur dalam mengurangi IMI yang disebabkan oleh *Staph. aureus*, dan strategi ini tetap menjadi alat bagi kawanan yang mengalami masalah signifikan dengan masalah ini.

Baru-baru ini, tinjauan komprehensif tentang mastitis pada sapi perah diterbitkan (De Vliegher et al., 2012). Dalam makalah itu, studi prevalensi yang dilakukan dari seluruh dunia dirangkum, menunjukkan bahwa meskipun sapi dara primigravida memiliki prevalensi infeksi patogen utama yang relatif rendah, banyak yang dijajah oleh SSP (De Vliegher et al., 2012). Menariknya, IMI pada sapi perah yang disebabkan oleh SSP memiliki tingkat penyembuhan spontan yang tinggi dan biasanya tidak memiliki efek negatif pada produktivitas, membuat penggunaan pengobatan antibiotik sebelum melahirkan tidak diperlukan di sebagian besar ternak. Penulis ulasan tersebut merekomendasikan tindakan berbasis pencegahan seperti pengendalian alat, penghindaran inter-mengisap, dan jaminan area perumahan yang higienis dan nyaman. Meskipun kemajuan besar telah dibuat dalam mendefinisikan mastitis sapi,

RINGKASAN DAN ARAH MASA DEPAN

Selama abad terakhir, para peneliti telah mengkarakterisasi sifat IMI, mekanisme yang ditentukan dari respon inflamasi, mengembangkan program pengendalian mastitis yang efektif yang telah diadopsi secara luas di seluruh dunia, dan, di banyak wilayah, telah hampir memusnahkan patogen *radang. agalactiae* yang bertanggung jawab atas sebagian besar mastitis pada paruh pertama abad ini. Efek mastitis pada produktivitas, kinerja reproduksi, dan kualitas produk telah diukur. Alat diagnostik (seperti pengujian SCC) telah dikembangkan yang memungkinkan produsen untuk mengidentifikasi sapi yang terinfeksi secara subklinis dan menggunakan strategi manajemen yang ditargetkan untuk mengurangi penyebaran patogen menular. Seiring bertambahnya ukuran kawanan dan pengelolaan yang intensif, para peneliti mengenali munculnya patogen oportunistik yang sering mengakibatkan kasus klinis. Kemajuan luar biasa dalam mesin pemerah susu dan manajemen pemerahan telah menghasilkan adopsi yang luas dari sistem pemerahan yang sangat berfungsi dan prosedur pemerahan standar. Keterbatasan terapi antimikroba telah diakui tetapi penggunaan antibiotik untuk mengobati sapi yang terkena beberapa patogen tetap menjadi alat penting untuk pengendalian mastitis. Selama periode yang dicakup tinjauan ini, efek yang dimiliki peneliti mastitis terhadap peningkatan kualitas susu dan produktivitas peternakan sapi perah benar-benar luar biasa.

Pada tahun 1958, Plastridge menerbitkan ulasan tentang mastitis sapi di JDS (Plastridge, 1958) yang merangkum penelitian mastitis saat ini dan menyertakan penafian berikut: "Tinjauan lengkap berada di luar cakupan komunikasi ini ..." Penafian itu bahkan lebih berlaku untuk saat ini tinjauan. Sejumlah besar penelitian penting telah dilakukan dalam 58 tahun sejak pernyataan itu dibuat. Pada abad yang dicakup oleh ulasan ini, banyak peneliti telah berkontribusi pada kemajuan dalam mengendalikan mastitis. Saya telah mencoba untuk meringkas kemajuan dalam deteksi, pencegahan, dan pengelolaan mastitis sapi dan saya telah berfokus pada makalah yang diterbitkan di JDS yang membantu menggambarkan bagaimana pemahaman kita tentang mastitis telah berkembang. Penelitian penting harus dikecualikan, hanya karena keterbatasan ruang.

Terlepas dari kemajuan yang luar biasa, di sebagian besar wilayah, mastitis tetap menjadi penyakit bakteri yang paling signifikan secara ekonomi pada sapi perah, dan kemajuan lanjutan dalam pengendalian mastitis diperlukan untuk memastikan keberlanjutan peternakan sapi perah di seluruh dunia. Sebagian besar negara telah menghilangkan kontrol produksi dan globalisasi memiliki dampak yang luar biasa pada standar kualitas. Kemampuan untuk berpartisipasi dalam perdagangan susu global semakin bergantung pada produksi susu yang memenuhi standar kualitas ketat yang ditetapkan oleh pengolah susu daripada regulator pemerintah. Di daerah persusuan yang sedang berkembang, ada kebutuhan untuk menyediakan infrastruktur dan pelatihan untuk membantu peternak secara efisien mengadopsi strategi manajemen yang telah terbukti yang meminimalkan pengembangan IMI baru dan menghasilkan produksi susu berkualitas tinggi.

Di daerah persusuan maju, intensifikasi pengelolaan ternak telah menimbulkan tantangan baru bagi produsen. Studi diperlukan untuk sepenuhnya menentukan faktor risiko dan strategi pengendalian untuk patogen yang muncul (seperti: *Prototheca*, *Mycoplasma bovis*, dan lain-lain). Penelitian menggunakan metode diagnostik baru dan teknologi molekuler diperlukan untuk sepenuhnya memahami ekologi dan pengendalian mikroba yang berada di ekosistem susu dan merupakan agen etiologi potensial untuk mastitis. Masalah resistensi antimikroba dan tekanan masyarakat untuk mengurangi terapi antimikroba di peternakan sapi perah akan semakin penting, dan penelitian yang mendefinisikan penggunaan antimikroba yang tepat adalah prioritas tinggi. Standarisasi metode yang digunakan untuk mengevaluasi kemanjuran pengobatan mastitis diperlukan untuk mengidentifikasi kapan penggunaan antimikroba benar-benar bermanfaat. Investasi lanjutan dalam penelitian untuk mengembangkan alternatif antimikroba diperlukan dan

penekanan lebih harus diarahkan pada metode untuk meningkatkan resistensi mastitis.

Keterbatasan pasokan tenaga kerja telah berkontribusi pada peningkatan penggunaan otomatisasi, dan tren ini kemungkinan akan meningkat. Peningkatan penggunaan sistem pemerahan otomatis dan penggabungan otomatisasi ke dalam panti pemerahan memerlukan penelitian tentang pengoptimalan dan penggunaan data yang berasal dari sistem ini secara efektif. Semua prioritas penelitian ini memerlukan sarana yang efektif untuk mengkomunikasikan dan meyakinkan petani tentang kegunaan mereka, sehingga pengembangan mekanisme transfer pengetahuan yang berkelanjutan diperlukan untuk sepenuhnya menangkap nilai keuntungan penelitian di masa depan.

REFERENSI

- Albright, JL, SL Tuckey, dan GT Woods. 1961. Antibiotik dalam susu; Sebuah ulasan. *J. Ilmu Susu*. 44:779-807.
- Ali, AKA, dan GE Shook. 1980. Transformasi optimal untuk konsentrasi sel somatik dalam susu. *J. Ilmu Susu*. 63:487-490.
- Barkema, HW, YH Schukken, dan RN Zadoks. 2006. Diundang review: Peran sapi, patogen, dan rejimen pengobatan dalam keberhasilan terapi sapi *Stafilococcus aureus* mastitis. *J. Ilmu Susu*. 89:1877-1895.
- Barker, AR, FN Schrick, MJ Lewis, HH Dowlen, dan SP Oliver. 1998. Pengaruh mastitis klinis selama awal laktasi terhadap kinerja reproduksi sapi Jersey. *J. Ilmu Susu*. 81:1285-1290.
- Baxter, JD, GW Rogers, SB Spencer, dan RJ Eberhart. 1992. Pengaruh slip liner mesin pemerah susu pada infeksi intramammary baru. *J. Ilmu Susu*. 75:1015-1018.
- Bradley, AJ, dan MJ Green. 2001. Etiologi mastitis klinis pada enam ternak sapi perah Somerset. *Dokter hewan. Rek*. 148:683-686.
- Breed, RS, dan JD Brew. 1917. Kontrol pasokan susu publik dengan menggunakan metode mikroskopis. *J. Ilmu Susu*. 1:259-271.
- Burvenich, C., DD Bannerman, JD Lippolis, L. Peelman, BJ Nonnecke, ME Kehrl, dan MJ Paape. 2007. Peristiwa fisiologis kumulatif mempengaruhi respon inflamasi ambung sapi terhadap *Escherichia coli* infeksi selama masa transisi. *J. Ilmu Susu*. 90(Lampiran 1):E39-E54.
- Burvenich, C., V. Van Merris, J. Mehrzad, A. Diez-Fraile, dan L. Du-istana. 2003. Tingkat keparahan mastitis *E. coli* terutama ditentukan oleh faktor sapi. *Dokter hewan. Res*. 34:521-564.
- Cameron, M., SL McKenna, KA MacDonald, IR Dohoo, JP Roy, dan GP Keefe. 2014. Evaluasi perlakuan selektif sapi kering setelah budidaya di peternakan: Risiko infeksi intramammary pasca melahirkan dan mastitis klinis pada laktasi berikutnya. *J. Ilmu Susu*. 97:270-284.
- Subkomite Coliform dari Komite Riset Nasional Dewan Mastitis. 1979. Coliform mastitis—Sebuah tinjauan. *J. Ilmu Susu*. 62:1-22.
- Cone, JF 1942. Pengaruh pemerahan mesin pada leukosit jumlah dan kandungan klorida susu. *J. Ilmu Susu*. 27:215-224.
- De Vliegher, S., LK Fox, S. Piepers, S. McDougall, dan HW Barkebu 2012. Tinjauan yang diundang: Mastitis pada sapi perah: Sifat penyakit, dampak potensial, pencegahan, dan pengendalian. *J. Ilmu Susu*. 95:1025-1040.
- Dodd, FH, FK Neave, dan RG Kingwill. 1964. Kontrol ambung infeksi oleh manajemen. *J. Ilmu Susu*. 47:1109-1114.
- Dodd, FH, DR Westgarth, FK Neave, dan RG Kingwill. 1969. Mastitis—Strategi pengendalian. *J. Ilmu Susu*. 52:689-695.
- Eberhart, RJ 1977. Coliform mastitis. Selai. *Dokter hewan. Med. Asosiasi* 170:1160-1163.
- Eberhart, RJ, dan JM Buckalew. 1972. Evaluasi kebersihan dan program terapi periode kering untuk pengendalian mastitis. *J. Ilmu Susu*. 55:1683-1691.

- Eberhart, RJ, WH Cloninger, dan Kartu CS. 1968. Efek dari vakum pemerahan yang tidak stabil pada beberapa ukuran kesehatan ambing. *J. Ilmu Susu*. 51:1026-1030.
- Ely, F., dan WE Petersen. 1941. Faktor-faktor yang terlibat dalam pengusiran susu. *J. Ilmu Susu*. 24:211-223.
- Erskine, RJ, RJ Eberhart, LJ Hutchinson, dan RW Scholz. 1987. Konsentrasi selenium darah dan aktivitas glutathione peroxidase pada ternak sapi perah dengan jumlah sel somatik tinggi dan rendah. *Selai. Dokter hewan. Med. Asosiasi* 190:1417-1421.
- Erskine, RJ, RD Walker, CA Bolin, PC Bartlett, dan D. G. Putih. 2002. Tren kerentanan antibakteri patogen mastitis selama periode tujuh tahun. *J. Ilmu Susu*. 85:1111-1118.
- Espe, D., dan Meriam CY. 1942. Anatomi dan fisiologi dari sfingter puting. *J. Ilmu Susu*. 25:155-160.
- Fox, LK 2012. Mastitis mikoplasma: Penyebab, penularan, dan mengendalikannya. *Dokter hewan. klinik Am Utara Makanan Anim. Praktek*. 28:225-237.
- Fox, LK, ST Chester, JW Hallberg, SC Nickerson, JW Pan-kunci, dan LD Weaver. 1995. Survei infeksi intramammary pada sapi perah pada usia kawin dan partus pertama. *J. Ilmu Susu*. 78:1619-1628.
- Fuenzalida, MJ, PM Fricke, dan PL Ruegg. 2015. Asosiasi antara kejadian dan keparahan mastitis subklinis dan klinis pada kehamilan per inseminasi buatan pada pelayanan pertama sapi Holstein. *J. Ilmu Susu*. 98:3791-3805.
- Funk, CD, LH Schultz, dan GR Barr. 1967. Investigasi atas kemungkinan penggunaan tes skrining mastitis di laboratorium pusat Dairy Herd Improvement Association. *J. Ilmu Susu*. 50:47-52.
- Galton, DM, LG Peterson, dan WG Merrill. 1988. Evaluasi persiapan ambing pada infeksi intramammary. *J. Ilmu Susu*. 71:1417-1421.
- Galton, DM, LG Petersson, WG Merrill, DK Bandler, dan DE Shuster. 1984. Pengaruh persiapan ambing sebelum pemerahan pada populasi bakteri, sedimen, dan residu yodium dalam susu. *J. Ilmu Susu*. 67:2580-2589.
- Gilbert, RO, WTK Bosu, dan AT Peter. 1990. Efek dari *Escherichia coli* endotoksin pada fungsi luteal pada sapi dara Holstein. *Teriogenologi* 33:645-651.
- Gildow, EM, DL Fourn, dan AO Shaw. 1938. Sulfanilamida dalam pengobatan mastitis streptokokus. *J. Ilmu Susu*. 21:759-766.
- González Pereyra, V., M. Pol, F. Pastorino, dan A. Herrero. 2015. Kuantifikasi penggunaan antimikroba pada sapi perah dan anak sapi yang disapih di Argentina. *sebelumnya Dokter hewan. Med.* 122:273-279.
- Grasso, PJ, RW Scholz, RJ Erskine, dan RJ Eberhart. 1990. Fagositosis, aktivitas bakterisida, dan metabolisme oksidatif neutrofil susu dari sapi perah yang diberi diet suplemen selenium dan defisiensi selenium. *Saya. J. Dokter hewan. Res.* 51:269-274.
- Halasa, T., M. Nielsen, T. van Werven, dan H. Hogeveen. 2010. Sebuah simulasi model lasi untuk menghitung biaya dan manfaat intervensi periode kering pada sapi perah. *hidup. Sci.* 129:80-87.
- Halversen, WV, VA Cherrington, dan HC Hansen. 1934. Labo-metode ratory untuk mendeteksi susu dari sapi yang terinfeksi mastitis. *J. Ilmu Susu*. 17:281-296.
- Hansen, HC, DR Theophilus, FW Atkeson, dan EM Gildow. 1934. Pengaruh mastitis pada ketegangan dadih susu. *J. Ilmu Susu*. 17:257-264.
- Harmon, RJ 1994. Fisiologi mastitis dan faktor-faktor yang mempengaruhi so-jumlah sel matic. *J. Ilmu Susu*. 77:2103-2112.
- Heringstad, B., E. Sehested, dan T. Steine. 2008. Komunikasi singkat tion: Respon seleksi berkorelasi dalam jumlah sel somatik dari seleksi terhadap mastitis klinis. *J. Ilmu Susu*. 91:4437-4439.
- Hillerton, JE, dan KE Kliem. 2002. Pengobatan yang efektif untuk *Streptokokus uberis* mastitis klinis untuk meminimalkan penggunaan antibiotik. *J. Ilmu Susu*. 85:1009-1014.
- Hogan, JS, KL Smith, KH Hoblet, PS Schoenberger, DA Todhunter, WD Hueston, DE Pritchard, GL Bowman, LE Heider, BL Brockett, dan HR Conrad. 1989. Survei lapangan mastitis klinis pada kelompok jumlah sel somatik rendah. *J. Ilmu Susu*. 72:1547-1556.
- Hogan, JS, KL Smith, DA Todhunter, dan PS Schoenberger. 1990a. Khasiat dari *Escherichia coli* Vaksin J-5 untuk mencegah coli-membentuk mastitis. Halaman 200-204 di *Int. Sim. Bovine Mastitis*, Indianapolis, IN. Dewan Mastitis Nasional, Arlington, VA.
- Hogan, JS, KL Smith, DA Todhunter, dan PS Schoenberger. 1992a. Uji coba lapangan untuk menentukan kemanjuran suatu *Escherichia coli* Vaksin mastitis J5. *J. Ilmu Susu*. 75:78-84.
- Hogan, JS, KL Smith, WP Weiss, DA Todhunter, dan WL Schockey. 1990b. Hubungan antara vitamin E, selenium, dan neutrofil darah sapi. *J. Ilmu Susu*. 73:2372-2378.
- Hogan, JS, WP Weiss, dan KL Smith. 1993. Peran vitamin E dan selenium dalam pertahanan inang terhadap mastitis. *J. Ilmu Susu*. 76:2795-2803.
- Hogan, JS, WP Weiss, KL Smith, DA Todhunter, PS Schoenberger, dan LM Sordillo. 1995. Efek dari sebuah *Escherichia coli* Vaksin J5 pada mastitis coliform klinis ringan. *J. Ilmu Susu*. 78:285-290.
- Hogan, JS, WP Weiss, DA Todhunter, KL Smith, dan PS Schoenberger. 1992b. Khasiat dari sebuah *Escherichia coli* Vaksin mastitis J5 dalam uji coba tantangan eksperimental. *J. Ilmu Susu*. 75:415-422.
- Hovinen, M., dan S. Pyorala. 2011. Ulasan yang diundang: Kesehatan ambing dari sapi perah dalam pemerahan otomatis. *J. Ilmu Susu*. 94:547-562.
- Hudson, CD, AJ Bradley, JE Breen, dan MJ Green. 2012. Sebagai-hubungan antara kesehatan ambing dan kinerja reproduksi pada sapi perah Inggris. *J. Ilmu Susu*. 95:3683-3697.
- Huijps, K., dan H. Hogeveen. 2007. Pemodelan stokastik untuk menentukan efek ekonomi dari terapi selimut, selektif, dan tidak ada sapi kering. *J. Ilmu Susu*. 90:1225-1234.
- Huxley, JN, MJ Green, LE Green, dan AJ Bradley. 2002. Evaluasi kemanjuran sealer dot internal selama periode kering. *J. Ilmu Susu*. 85:551-561.
- Jacobs, JA, dan JM Siegford. 2012. Tinjauan yang diundang: Dampak dari sistem pemerahan otomatis pada manajemen, perilaku, kesehatan, dan kesejahteraan sapi perah. *J. Ilmu Susu*. 95:2227-2247.
- Jasper, DE 1967. Mikoplasma—Peran mereka dalam penyakit sapi. *Selai. Dokter hewan. Med. Asosiasi* 151:1650.
- Jones, FS, dan RB Little. 1927. Sebuah studi tentang susu serpihan. *J. Susu Sci.* 10:439-447.
- Kuipers, A., WJ Koops, dan H. Wemmenhove. 2016. Penggunaan antibiotik dalam peternakan sapi perah di Belanda dari tahun 2005 hingga 2012. *J. Dairy Sci.* 99:1632-1648.
- Lago, A., SM Godden, R. Bey, PL Ruegg, dan K. Leslie. 2011a. Pengobatan selektif mastitis klinis berdasarkan hasil kultur di peternakan: I. Efek pada penggunaan antibiotik, waktu penghentian susu, dan hasil klinis dan bakteriologis jangka pendek. *J. Ilmu Susu*. 94:4441-4456.
- Lago, A., SM Godden, R. Bey, PL Ruegg, dan K. Leslie. 2011b. Pengobatan selektif mastitis klinis berdasarkan hasil kultur on-farm: II. Efek pada kinerja laktasi, termasuk kekambuhan mastitis klinis, jumlah sel somatik, produksi susu, dan kelangsungan hidup sapi. *J. Ilmu Susu*. 94:4457-4467.
- Lavon, Y., M. Kaim, G. Leitner, D. Biran, E. Ezra, dan D. Wolfenson. 2016. Dua pendekatan untuk meningkatkan fertilitas sapi perah mastitis subklinis. *J. Ilmu Susu*. 99:2268-2275.
- Lavon, Y., G. Leitner, U. Moallem, E. Klipper, H. Voet, S. Jacoby, G. Glick, R. Meidan, dan D. Wolfenson. 2011. Efek langsung dan sisa mastitis yang diinduksi toksin Gram-negatif dan Gram-positif pada fungsi folikel pada sapi perah. *Theriogenologi* 76:942-953.
- Legates, JE, dan CD Grinnells. 1952. Hubungan genetik dalam re-resistensi mastitis pada sapi perah. *J. Ilmu Susu*. 35:829-833.
- Lush, JL 1950. Warisan kerentanan terhadap mastitis. *J. Ilmu Susu*. 33:121-125.
- MacLeod, P., WN Plastridge, EO Anderson, VN Gullet, dan HH Hal. 1953. Jumlah leukosit susu ternak dibandingkan dengan kejadian mastitis. *J. Ilmu Susu*. 36:1267-1271.
- Makovec, JA, dan PL Ruegg. 2003. Hasil sub sampel susu diajukan untuk pemeriksaan mikrobiologi di Wisconsin dari tahun 1994 hingga 2001. *J. Dairy Sci.* 86:3466-3472.
- McCandlish, AC 1918. Kemungkinan meningkatkan susu dan but-produksi terfat dengan pemberian obat-obatan. *J. Ilmu Susu*. 1:475-486.

- Mellenberger, RW 1977. Vaksinasi terhadap mastitis. J. Ilmu Susu. 60:1016-1021.
- Mochrie, RD, HH Hale, HD Eaton, FI Elliott, WN Plastringe, dan G. Beall. 1953a. Pengaruh tingkat vakum dan durasi pemerahan pada kesehatan ambing pada sapi dara pertama yang bebas mastitis. J. Ilmu Susu. 36:504-515.
- Mochrie, RD, HH Hale, HD Eaton, RE Johnson, dan WN Plester. 1953b. Sebuah studi lebih lanjut tentang efek tingkat vakum dan durasi pemerahan pada kesehatan ambing dan produksi susu. J. Ilmu Susu. 36:1223-1232.
- Murphy, JM 1947. Asal-usul infeksi ambing sapi dan mastitis ini; terjadinya infeksi streptokokus pada populasi sapi selama periode tujuh tahun dan hubungannya dengan umur. Saya. J. Dokter hewan. Res. 8:29-42.
- Murphy, JM 1956. Mastitis—Perjuangan untuk memahami. J. Ilmu Susu. 39:1768-1773.
- Murphy, JM, KO Pfau, OL Leopard, dan JW Bartlett. 1944. Perbandingan kejadian infeksi ambing dan mastitis pada dua keluarga sapi. Dokter Hewan Cornell. 34:185-192.
- Natzke, RP 1971. Terapi: Salah satu komponen dalam pengendalian mastitis sistem. J. Ilmu Susu. 54:1895-1901.
- Neave, FK, AH Dodd, dan E. Henriques. 1950. Infeksi ambing pada periode kering. J. Susu Res. 17:37-49.
- Neave, FK, FH Dodd, dan RG Kingwill. 1966. Sebuah metode mengendalikan penyakit ambing. Dokter hewan. Rek. 78:521-523.
- Neave, FK, FH Dodd, RG Kingwill, dan DR Westgarth. 1969. Pengendalian mastitis pada ternak sapi perah dengan higiene dan manajemen. J. Ilmu Susu. 52:696-707.
- Nemet-Nejat, KR 1998. Kehidupan Sehari-hari di Mesopotamia Kuno. Hijau-kayu Tekan, Westport, CT.
- Nickerson, SC, WE Owens, dan RL Boddie. 1995. Mastitis pada sapi perah: Studi awal tentang prevalensi dan kontrol. J. Ilmu Susu. 78:1607-1618.
- Norcross, NL, dan DM Stark. 1969. Peran imunisasi dalam mas-pengendalian titis. J. Ilmu Susu. 52:714.
- Oehme, FW, dan EH Coles. 1967. Penggunaan lapangan dan evaluasi a vaksin untuk mastitis stafilokokus sapi. J. Ilmu Susu. 50:1792- 1797.
- Oliveira, L., C. Hulland, dan PL Ruegg. 2013. Karakterisasi mastitis klinis yang terjadi pada sapi pada 50 sapi perah besar di Wisconsin. J. Ilmu Susu. 96:7538-7549.
- Oliver, SP, dan BA Mitchell. 1983. Kerentanan mammae sapi kelenjar mary untuk infeksi selama periode kering. J. Ilmu Susu. 66:1162-1166.
- Oliver, SP, dan LM Sordillo. 1988. Kesehatan ambing pada periparturi-periode masuk. J. Ilmu Susu. 71:2584-2606.
- Paape, MJ, HA Tucker, dan HD Hafs. 1965. Perbandingan metode untuk memperkirakan sel somatik susu. J. Ilmu Susu. 48:191. Pankey, JW 1989. Kebersihan ambing sebelum pemerahan susu. J. Ilmu Susu. 72:1308-1312.
- Pankey, JW, RJ Eberhart, AL Cuming, RD Daggett, RJ Farnsworth, dan CK McDuff. 1984. Penggunaan antiseptis puting susu setelah pemerahan susu. J. Ilmu Susu. 67:1336-1353.
- Pankey, JW, EE Wildman, PA Drechsler, dan JS Hogan. 1987. Evaluasi uji coba lapangan desinfeksi dot premilking. J. Ilmu Susu. 70:867-872.
- Philpot, WN 1969. Peran terapi dalam pengendalian mastitis. J. Ilmu Susu. 52:708-713.
- Phuektes, P., PD Mansell, dan GF Browning. 2001. Multipleks reaksi berantai polimerase untuk deteksi simultan *Stafilokokus aureus* dan streptokokus penyebab mastitis sapi. J. Ilmu Susu. 84:1140-1148.
- Piepers, S., A. Prenafeta, J. Verbeke, A. De Visscher, R. March, dan S. De Vliher. 2017. Respons kekebalan setelah tantangan intramammary eksperimental dengan pembunuhan *Stafilokokus aureus* pada sapi dan sapi yang divaksinasi dan tidak divaksinasi dengan Startvac, vaksin mastitis polivalen. J. Ilmu Susu. 100:769-782.
- Plastringe, WN 1958. Bovine mastitis: Sebuah tinjauan. J. Ilmu Susu. 41:1141-1181.
- Plastringe, WN, EO Anderson, FJ Weirether, dan RE John-putra. 1936. Laporan mastitis sapi menular tentang program pengendalian berdasarkan pemisahan hewan yang terinfeksi. J. Ilmu Susu. 19:641-650. Pol, M., dan PL Ruegg. 2007a. Hubungan antara antimikroba penggunaan obat dan kerentanan antimikroba patogen mastitis gram positif. J. Ilmu Susu. 90:262-273.
- Pol, M., dan PL Ruegg. 2007b. Praktek pengobatan dan kuantitatif tion penggunaan obat antimikroba di peternakan sapi perah konvensional dan organik di Wisconsin. J. Ilmu Susu. 90:249-261.
- Postle, DS 1964. Tes mastitis Wisconsin. Prok. annu. Gunung U. S.Anim. Asosiasi Kesehatan. 68:488-494.
- Poutrel, B., dan P. Rainard. 1981. Panduan Tes Mastitis California dari terapi sapi kering selektif. J. Ilmu Susu. 64:241-248.
- Prouty, CC 1934. Perbandingan jumlah leukosit, brom thymol blue reaction and the catalase content of freshly drawn milk. J. Dairy Sci. 17:75-81.
- Pyrälä, S., L. Kaartinen, H. Kack, dan V. Rainio. 1994. Khasiat dari dua rejimen terapi untuk pengobatan yang diinduksi secara eksperimental *Escherichia colimastitis* pada sapi. J. Ilmu Susu. 77:453-461.
- Baca, RB 1969. Program susu abnormal dari pengirim susu antarnegara bagian konferensi. J. Ilmu Susu. 52:718.
- Reneau, JK 1986. Penggunaan somatik perbaikan ternak sapi perah yang efektif jumlah sel dalam kontrol mastitis. J. Ilmu Susu. 69:1708-1720.
- Rindsig, RB, RG Rodewald, AR Smith, dan SL Spahr. 1978. Terapi sapi kering lengkap versus selektif untuk pengendalian mastitis. J. Ilmu Susu. 61:1483-1497.
- Ruegg, PL 2017. Pendekatan praktis untuk terapi mastitis pada besar ternak sapi perah. Halaman 933-948 dalam Manajemen Ternak Perah Besar. edisi ke-3 DK Beede, ed. Saya. Ilmu Susu. Assoc., Champaign, IL.
- Saini, V., JT McClure, D. Leger, S. Dufour, AG Sheldon, DT Scholl, dan HW Barkema. 2012. Penggunaan antimikroba di peternakan sapi perah Kanada. J. Ilmu Susu. 95:1209-1221.
- Schalm, OW 1942. *Streptococcus agalactiae* ambing sapi dara di partus dilacak sampai menyusui di antara anak sapi. Dokter Hewan Cornell. 32:39-60. Schalm, OW, dan SW Mead. 1943. Pengaruh susu tidak lengkap-pada mastitis kronis yang disebabkan oleh *Streptococcus agalactiae*. J. Ilmu Susu. 26:823-832.
- Schalm, OW, dan DO Noorlander. 1957. Eksperimen dan pengamatan yang mengarah pada pengembangan tes mastitis California. Selai. Dokter hewan. Med. Asosiasi 130:199-204.
- Scherpenzeel, CGM, IEM den Uijl, G. van Schaik, RGM O. Riekerink, dan TJGM Lam. 2014. Evaluasi penggunaan antibiotik sapi kering pada sapi dengan jumlah somatik rendah. J. Ilmu Susu. 97:3606-3614.
- Schrick, FN, ME Hockett, AM Saxton, MJ Lewis, HH Dowlen, dan SP Oliver. 2001. Pengaruh mastitis subklinis selama awal laktasi terhadap parameter reproduksi. J. Ilmu Susu. 84:1407-1412.
- Schultze, WD 1983. Efek dari rejimen selektif terapi sapi kering pada infeksi intramammary dan sensitivitas antibiotik patogen yang masih hidup. J. Ilmu Susu. 66:892-903.
- Schutz, MM 1994. Evaluasi genetik skor sel somatik untuk United Serikat sapi perah. J. Ilmu Susu. 77:2113-2129.
- Seeley, HW, Jr., EO Anderson, dan WN Plastringe. 1945. Ak-tion penisilin terhadap organisme mastitis dalam susu. J. Ilmu Susu. 28:887-891.
- Shaw, AO, dan AL Beam. 1935. Pengaruh mastitis pada susu produksi. J. Ilmu Susu. 18:353-357.
- Shaw, AO, HC Hansen, dan RC Nutting. 1937. Keandalan-tes yang dipilih untuk mendeteksi mastitis. J. Ilmu Susu. 20:199-203.
- Shook, GE, dan MM Schutz. 1994. Seleksi pada skor sel somatik untuk meningkatkan resistensi terhadap mastitis di Amerika Serikat. J. Ilmu Susu. 77:648-658.
- Smith, KL, DA Todhunter, dan PS Schoenberger. 1985. Lingkungan mastitis ronmental: Penyebab, prevalensi, pencegahan. J. Ilmu Susu. 68:1531-1553.
- Sol, J., OC Sampimon, HW Barkema, dan YH Schukken. 2000. Faktor-faktor yang berhubungan dengan penyembuhan setelah terapi mastitis klinis disebabkan oleh: *Stafilokokus aureus*. J. Ilmu Susu. 83:278-284.

Sol, J., OC Sampimon, JJ Snoep, dan YH Schukken. 1997. Faktor-faktor yang berhubungan dengan penyembuhan bakteriologis selama menyusui setelah terapi untuk mastitis subklinis yang disebabkan oleh: *Stafilokokus aureus*. J. Ilmu Susu. 80:2803-2808.

Spencer, SB 1998. Penelitian dan pengembangan terbaru dalam mesin pemerahan—Sebuah ulasan. J. Ilmu Susu. 72:1907-1917.

Stevens, M., S. Piepers, K. Supre, J. Dewulf, dan S. De Vlieghe. 2016. Kuantifikasi konsumsi antimikroba pada sapi dewasa pada peternakan sapi perah di Flanders, Belgia, dan hubungannya dengan kesehatan ambing, kualitas susu, dan kinerja produksi. J. Ilmu Susu. 99:2118-2130.

Thompson, PD 1981. Mesin pemerah susu—25 tahun terakhir. J. Susu Sci. 64:1344-1357.

Trinidad, P., SC Nickerson, dan TK Alley. 1990. Prevalensi infeksi intramammary dan kolonisasi saluran puting pada sapi perah yang tidak dikawinkan dan primigravida. J. Ilmu Susu. 73:107-114.

USDA. 1996a. Bagian I: Referensi praktik pengelolaan susu tahun 1996. USDA-Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS)-Veterinary Services (VS)-Center for Epidemiology and Animal Health (CEAH) National Animal Health Monitoring System (NAHMS), Fort Collins, CO.

USDA. 1996b. Bagian III: Referensi kesehatan dan kesehatan susu 1996 pengelolaan. C. USDA-Layanan Pemeriksaan Kesehatan Hewan dan Tumbuhan (APHIS)-Layanan Veteriner (VS), Fort Collins, CO.

USDA. 2015. Penentuan kualitas susu AS menggunakan somatic tangki curah jumlah sel, 2015. C. USDA-Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS)-Veterinary Services (VS), Fort Collins, CO. USDA. 2016. Susu 2014, Kualitas susu, prosedur pemerahan dan pemtitis di Amerika Serikat, 2014. USDA-Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS)-Veterinary Services (VS)-Center for Epidemiology and Animal Health (CEAH) National Animal Health Monitoring System (NAHMS), Fort Collins, CO.

Valeeva, NI, TJGM Lam, dan H. Hogeveen. 2007. Motivasi peternak sapi perah untuk meningkatkan manajemen mastitis. J. Ilmu Susu. 90:4466-4477.

Vukasinovic, N., N. Bacciu, CA Przybyla, P. Boddhireddy, dan S. K. DeNise. 2017. Pengembangan evaluasi genetik dan genomik untuk sifat-sifat kesehatan pada sapi Holstein AS. J. Ilmu Susu. 100:428-438.

Ward, GE, dan LH Schultz. 1974. Insiden dan pengendalian mastitis selama periode kering. J. Ilmu Susu. 57:1341-1349.

Weiss, WP, JS Hogan, KL Smith, dan KH Hoblet. 1990. Hubungan-hubungan antara selenium, vitamin E, dan kesehatan kelenjar susu di peternakan sapi perah komersial. J. Ilmu Susu. 73:381-390.

Putih, GC, GW Couture, EO Anderson, RE Johnson, WN Plastringe, dan FJ Weirether. 1937. Mastitis sapi kronis dan produksi susu. J. Ilmu Susu. 20:171-180.

Witzel, SA 1956. Pengembangan teknik peternakan sapi perah. J. Susu Sci. 39:777-782.

Wiggins, GR, dan GE Shook. 1987. Sebuah ukuran laktasi dari sojumlah sel matic. J. Ilmu Susu. 70:2666-2672.

Williams, WL 1927. Deteksi shedder dari streptokokus penyebab mastitis pada sampel susu kontrol komposit. J. Ilmu Susu. 20:711-717.

Woolford, MW, JH Williamson, AM Day, dan PJA Copeman. 1998. Efek profilaksis dari dot sealer pada mastitis sapi selama periode kering dan menyusui berikutnya. Dokter hewan Selandia Baru. J.46:12.

LAMPIRAN

Tabel A1. Garis waktu kemajuan signifikan dalam deteksi, manajemen, dan pencegahan mastitis

Tanggal	Tonggak pencapaian	Referensi
1917	Streptococci dari ambing yang terinfeksi diidentifikasi sebagai penyebab tingginya jumlah bakteri dalam susu.	Breed and Brew, 1917
1927	Penampakan susu “berkelupas” dikaitkan dengan peradangan bakteri yang disebabkan oleh stafilokokus dan streptokokus.	Jones dan Little, 1927
1937	Terjadinya mastitis subklinis terbukti menurunkan produksi ASI.	White dkk., 1937
1942	Aspek anatomi dan fisiologis sfingter puting dijelaskan.	Espe dan Meriam, 1942
1945	Studi in vitro menunjukkan kemanduran penisilin terhadap patogen mastitis gram positif.	Seeley dkk., 1945
1950	Heritabilitas kerentanan terhadap mastitis diperkirakan.	Subur, 1950
1953	Jumlah leukosit susu curah terbukti dapat memprediksi prevalensi mastitis subklinis pada ternak.	MacLeod dkk., 1953
1956	Karakteristik spesifik patogen dari infeksi dan presentasi penyakit pertama kali ditentukan.	Murphy, 1956
1957	Pengembangan Uji Mastitis California.	Schalm dan Noorlander, 1957

Lanjutan

Tabel A1 (Lanjutan). Garis waktu kemajuan signifikan dalam deteksi, manajemen, dan pencegahan mastitis

Tanggal	Tonggak pencapaian	Referensi
1961	Dewan Mastitis Nasional dibentuk untuk menyatukan rekomendasi pengendalian mastitis.	
1967	Batas AS pertama pada tangki curah SCC ditetapkan pada 1.500.000 sel/mL.	
1969	Seminal bekerja untuk mengendalikan <i>Streptococcus agalactiae</i> dan <i>Stafilokokus aureus</i> melalui kebersihan dan manajemen diterbitkan.	Dodd dkk., 1969; Neave dkk., 1969
1971	Penggunaan pengobatan antibiotik yang komprehensif di kering dipromosikan.	Natzke, 1971
1982	Hubungan linier antara SCC dan kehilangan hasil susu ditunjukkan.	Ali dan Shook, 1980
1984	Epidemiologi dan pengendalian mastitis lingkungan didefinisikan.	Smith et al., 1985
1992	Khasiat dari <i>Escherichia coli</i> vaksin antigen inti ditunjukkan.	Hogan dkk., 1992a,b
1994	Mastitis termasuk dalam indeks seleksi genetik di Amerika Serikat.	
1995	IMI pada sapi dara prepartum diakui.	Nickerson et al., 1995
1998	Mastitis terbukti mengurangi kesuburan.	Barker et al., 1998
1998	Khasiat sealant dot internal dalam mencegah mastitis ditunjukkan.	Woolford dkk., 1998
2001	Era tes diagnostik molekuler dimulai.	Phuektes et al., 2001
2002	Penggunaan antibiotik di peternakan dan kemungkinan hubungan dengan resistensi antibiotik muncul sebagai isu penting.	Erskine dkk., 2002; Pol dan Ruegg, 2007a,b
2012	Sebagian besar produsen AS diharuskan memenuhi standar SCC Uni Eropa sebesar 400.000 sel/mL.	



Daftar isi tersedia di [SainsLangsung](#)

Jurnal Kedokteran Hewan

beranda jurnal: www.elsevier.com/locate/tvj



Glikokaliks endotel mikrovaskular: Sepotong teka-teki tambahan dalam kedokteran hewan

Sara J. Lawrence-Mills^{a,b,*}, David Hughes^c, Melanie J. Hezzell^c, Matthew Butler^a, Chris Neal^a, Rebecca R. Foster^a, Gavin I. Welsh^a, Natalie Finch^{a,c,d}

^a *Bristol Renal, Bristol Medical School, University of Bristol, Bristol, Inggris*

^b *afiliasi saat ini The Royal Veterinary College, University of London, North Mimms, UK*

^c *Sekolah Kedokteran Hewan Bristol, Universitas Bristol, Langford, Inggris*

^d *Dokter Hewan Langford, Rumah Langford, Langford, Inggris*

INFO ARTIKEL

Kata kunci:

Deteksi
Diagnosa
Penyakit
Fisiologi
visualisasi

ABSTRAK

Glikokaliks endotel (eGlx) adalah struktur yang sangat penting yang melapisi permukaan luminal sel endotel. Ada semakin banyak bukti, pada pasien manusia dan model hewan, untuk peran penting dalam pemeliharaan kesehatan. Selain itu, kerusakannya dikaitkan dengan patogenesis berbagai keadaan penyakit. Ulasan ini memberikan gambaran umum tentang eGlx kepada pembaca; meringkas struktur, fungsi esensial, dan bukti perannya dalam penyakit. Kami menyoroti kurangnya penelitian mengenai eGlx pada kucing dan anjing, terutama pada penyakit yang terjadi secara alami. Yang penting, kami membahas teknik untuk membantu studinya, yang dapat diterapkan pada spesies hewan. Terakhir, kami menyajikan terapi bertarget yang ditujukan untuk melestarikan, dan dalam beberapa kasus, memulihkan eGlx yang rusak.

pengantar

Glikokaliks (Glx) adalah matriks seperti gel yang terdiri dari kombinasi rantai gula glikosaminoglikan (GAG), protein, dan enzim, yang tersusun dalam jaring. Molekul yang paling sering ditemukan adalah glikoprotein dan proteoglikan. Glx adalah struktur mikroskopis yang melapisi membran ekstraseluler dari banyak sel hidup, termasuk sel epitel dan beberapa bakteri. Ulasan ini akan fokus pada Glx endotel (eGlx) yang menutupi permukaan luminal sel endotel. eGlx memainkan peran penting dalam pemeliharaan kesehatan dan gangguannya berkontribusi pada patogenesis sejumlah besar penyakit. Peningkatan pemahaman tentang eGlx dan kontribusinya terhadap permeabilitas vaskular telah menyebabkan revisi prinsip Starling (Jacob et al., 2007). eGlx semakin dikenal sebagai target terapi dengan potensi untuk memperlambat perkembangan banyak penyakit. Namun, pada spesies veteriner, kepentingannya sebagian besar tidak diketahui, kemungkinan karena tantangan yang terkait dengan studinya.

Struktur glx

Struktur dasar Glx dilestarikan antara sel prokariotik, termasuk bakteri, dan sel eukariotik, termasuk epitel dan

sel endotel. Komponen utama dirangkum dalam [Gambar 1](#).

Proteoglikan, membentuk tulang punggung eGlx, terdiri dari protein inti dan rantai samping GAG yang terikat secara kovalen, bermuatan negatif, dan tidak bercabang. Proteoglikan bervariasi dalam jumlah dan jenis rantai samping, ukuran protein inti dan tingkat ikatan membran. Rantai samping GAG terdiri dari polimer linier disakarida yang bervariasi panjang dan modifikasinya, seperti asetilasi dan sulfasi. GAG, hyaluronan, mengikat langsung ke membran sel endotel melalui reseptor permukaan sel (Cerdas, 2016). Ada banyak glikoprotein yang terkandung dalam eGlx, mereka dicirikan oleh rantai karbohidrat bercabang kecil, contohnya termasuk molekul adhesi sel endotel dan komponen kaskade koagulasi dan fibrinolitik. Ekspresi glikoprotein sangat bervariasi, tergantung pada aktivasi sel endotel (Jung dan Ley, 1997). Struktur berlapis-lapis ini juga mengandung berbagai komponen terlarut seperti reseptor (misalnya reseptor faktor pertumbuhan fibroblas (Gloe dkk., 2002)), enzim, dan faktor pertumbuhan. Molekul turunan plasma lainnya, termasuk albumin, berikatan sementara dengan komponen eGlx (Jacob et al., 2007). Komposisi eGlx yang sangat beragam berada dalam keseimbangan dinamis dengan darah, strukturnya berubah sebagai respons terhadap lingkungan mikro.

Perbedaan antar spesies yang signifikan dalam struktur eGlx disimpulkan dari teknik seperti pewarnaan lektin. Misalnya, pewarnaan yang berbeda

* Korespondensi dengan: Royal Veterinary College, Rumah Sakit Ibu Ratu untuk Hewan, Hawkshead Lane, Brookmans Park, Hatfield, AL9 7TA. *Alamat email: slawrencemills21@rvc.ac.uk* (S) Lawrence-Mills).

<https://doi.org/10.1016/j.tvj.2022.105843>

Diterima 15 September 2021; Diterima dalam bentuk revisi 29 April 2022; Diterima 25 Mei 2022

Tersedia online 30 Mei 2022

1090-0233/© 2022 Penulis. Diterbitkan oleh Elsevier Ltd. Ini adalah artikel akses terbuka di bawah lisensi CC BY (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

pola pada ginjal tikus dan tikus dengan konjugat lektin telah ditunjukkan (Schulte dan Spicer, 1983). Perbedaan antar spesies dalam struktur eGlx juga dapat berkontribusi pada kerusakan eGlx yang bervariasi setelah terpapar rangsangan berbahaya, penjelasan potensial untuk kerentanan spesies unik terhadap penyakit pembuluh darah. Misalnya, aterosklerosis, di mana kerusakan eGlx berkontribusi pada pembentukan plak aterosklerotik (van den Berg dkk., 2006; Batal dkk., 2016), merupakan penyebab signifikan morbiditas dan mortalitas pada manusia sementara kucing dan anjing tampak resisten secara alami (Heron dan Anderson, 2016; Seidelmann et al., 2018). Struktur eGlx juga dapat bervariasi antar jenis kelamin. Hal ini ditunjukkan oleh temuan bahwa pasien wanita dengan penyakit arteri koroner memiliki kedalaman eGlx yang sangat berkurang dibandingkan dengan kontrol yang sehat, sebagai akibat dari pelepasan eGlx yang lebih besar sebagai respons terhadap penyakit (Merek dkk., 2020), sementara tidak ada perbedaan yang ditemukan pada pasien laki-laki. Studi perbandingan yang mengeksplorasi perbedaan unik dalam struktur eGlx antara spesies, jenis kelamin, atau bahkan breed individu belum dilakukan. Penelitian di masa depan harus mempertimbangkan faktor pembaur potensial ini dalam desain penelitian mereka.

Visualisasi eGlx

Ada beberapa metode untuk deteksi dan visualisasi eGlx, yang dirangkum dalam Tabel 1. Karena kerapuhan ekstrim dan kedalaman kecil eGlx, visualisasi menjadi menantang. eGlx mudah terganggu, dehidrasi, dan akibatnya hilang selama banyak protokol persiapan yang mengakibatkan banyak penelitian meremehkan kedalamannya (Luft, 1966; Ueda dkk., 2004).

Teknik visualisasi langsung

Fiksasi perfusi

Teknik yang paling mapan dan berhasil untuk visualisasi langsung eGlx melibatkan perfusi dan pewarnaan pembuluh darah (Hegermann dkk., 2016). Kanulasi pembuluh awal diperlukan sebelum pembilasan dengan larutan onkotik fisiologis dan sifat elektrolit (Kimura dkk., 2001; Oliveira et al., 2014) untuk menghilangkan protein plasma dan mencegah dehidrasi eGlx (Yakub et al., 2007; Ebong dkk., 2011). Setelah ini, pembuluh disiapkan untuk mikroskop elektron dengan perfusi dengan larutan fiksatif seperti glutaraldehid dalam buffer cacodylate sebelum perfusi dengan pewarna khusus yang mengikat kation logam berat ke proteoglikan dalam eGlx (Curran dkk., 1965; van den Berg et al., 2003). Gambar 2 menunjukkan pengikatan biru Alcian, bisa dibilang zat pewarna yang paling banyak dikutip (van den Berg dkk., 2003; Ebong dkk., 2011), ke rantai samping GAG sulfat yang ada pada proteoglikan dalam sel endotel glomerulus tikus. Dengan menggunakan teknik standar ini, eGlx telah divisualisasikan di rahim

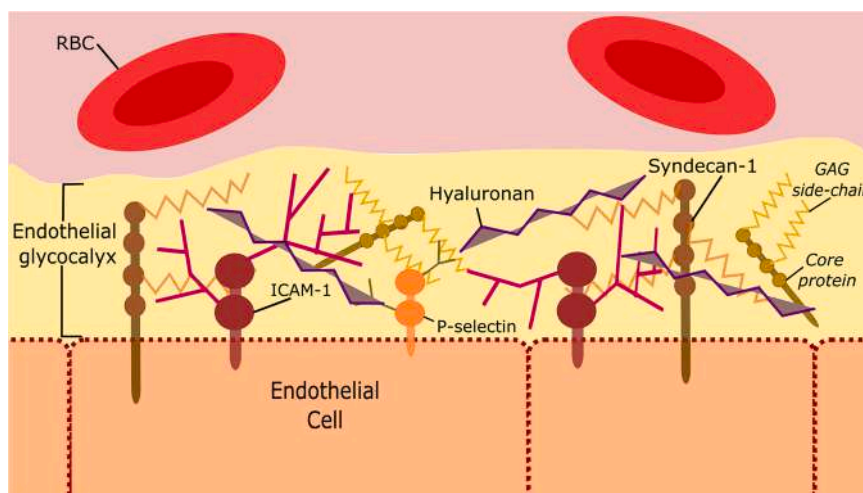
dan arteri testis dari anjing (Lawrence-Mills dkk., 2022a, masalah ini). Metode ini secara teknis menantang; kapal memerlukan pembilasan segera setelah pengumpulan dan pada tekanan fisiologis untuk mencegah kerusakan eGlx, solusi fiksatif lebih lanjut memerlukan penggunaan lemari asam. Fiksasi perfusi juga tidak memiliki reproduktifitas baik di dalam maupun di antara studi, mungkin terkait dengan tantangan teknisnya, yang menyebabkan perbedaan antara pengukuran eGlx (Hegermann dkk., 2016) dan membatasi interpretasi studi ini. Untuk alasan ini, teknik ini tidak cocok untuk sampel klinis.

Fiksasi perendaman

Sifat perfusi pembuluh yang sulit dan memakan waktu telah menyebabkan pengembangan metode fiksasi perendaman. Beberapa penelitian melaporkan keberhasilan yang sangat baik dengan teknik ini, menunjukkan gambar dengan kualitas yang sama dengan sampel tetap perfusi (Yang dkk., 2014). Namun, keterbatasan potensial termasuk pelepasan spontan setelah perendaman (Chappell et al., 2009); penetrasi kation yang buruk membuat eGlx lebih rentan untuk runtuh pada fiksasi. Studi alternatif telah menerapkan fiksasi perendaman sebelum pewarnaan dengan lektin (Mulivor dan Lipowsky, 2004) atau antibodi berlabel fluorezen spesifik yang menargetkan komponen eGlx seperti heparan sulfat (Florian et al., 2003). Beberapa penelitian telah membandingkan berbagai teknik fiksasi dan visualisasi eGlx (Betteridge et al., 2017); namun, duplikasi jaringan organ seks memang cocok untuk penyelidikan semacam itu.

Pewarnaan lektin

Lektin adalah glikoprotein yang diisolasi dari tumbuhan, hewan, bakteri, dan virus. Sharon dan Lis, 2004). Uniknya, lektin mengikat karbohidrat tertentu dan dapat digunakan untuk menargetkan GAG di dalam eGlx (Mulivor dan Lipowsky, 2004; Dane dkk., 2013). Teknik baru untuk kuantifikasi eGlx menggunakan pelabelan lektin yang disebut 'pengukuran puncak ke puncak', menggunakan pelabelan membran sel dengan oktadesil rhodamin B klorida (R18) dalam kombinasi dengan pelabelan eGlx lektin untuk mendapatkan ukuran ketebalan eGlx (Betteridge et al., 2017). Studi tikus in vivo telah menunjukkan metode puncak-ke-puncak ini berkorelasi dengan pengukuran eGlx yang diambil dari mikroskop elektron (Betteridge et al., 2017). Yang lain juga menggunakan pewarnaan lektin untuk mempelajari eGlx pada anjing (Meyer dkk., 2008; Yabuki dkk., 2012) dan kucing (Castagnaro dkk., 1987; Roussel dan Dalion, 1988; Kamiya et al., 1991). Harus dicatat bahwa tidak satu pun dari penelitian yang disebutkan di atas mengkonfirmasi pewarnaan eGlx melainkan mengasumsikan pewarnaan terkait dengan eGlx berdasarkan lokasi relatif terhadap endotelium. Konfirmasi pewarnaan spesifik eGlx membutuhkan pewarnaan bersama membran sel, dengan R18 misalnya (Oltean et al., 2015), atau pencitraan mikroskop elektron lebih lanjut (Mennander dkk., 2012).



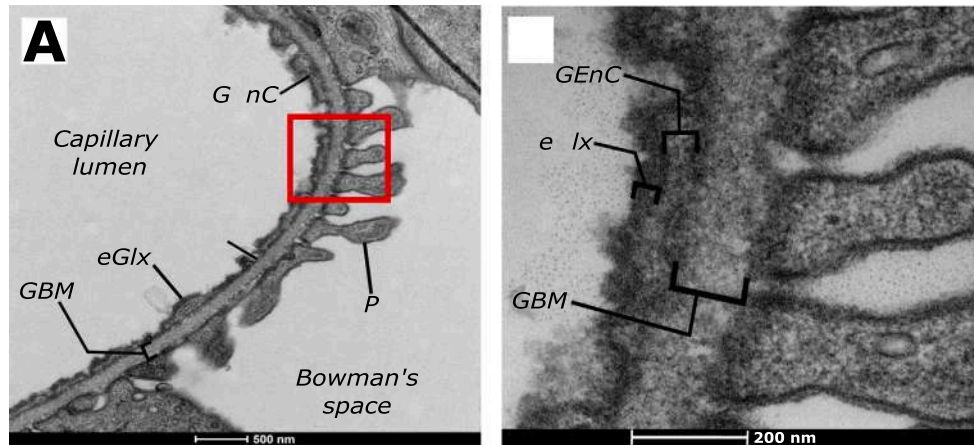
Gambar 1. Representasi skematis dari komponen struktural utama glikokaliks endotel. GAG, glikosaminoglikan; ICAM-1, molekul adhesi antar sel-1; RBC, sel darah merah.

Tabel 1

Keuntungan dan kerugian dari metode deteksi glikokaliks kunci.

	Teknik	Keuntungan	Kekurangan
Langsung Deteksi	Fiksasi perfusi dan pewarnaan dengan ion logam berat	Referensi teknik standar	Secara teknis menantang; tidak praktis secara klinis
	Fiksasi perendaman dan pewarnaan dengan ion logam berat	Cepat; sederhana	Keberhasilan variabel; membutuhkan biopsi jaringan
	Fiksasi perendaman dan pewarnaan lektin	Pengumpulan dan pemrosesan sampel yang lebih sederhana daripada teknik perfusi	Spesies dan spesifik organ; 'puncak-ke-puncak' secara teknis menantang
tidak langsung Deteksi	Kuantifikasi komponen eGlx yang bersirkulasi (ELISA)	Dapat diterapkan secara klinis; minimal invasif	Berlaku untuk komponen tertentu
	Pencitraan medan gelap sidestream	Dapat diterapkan secara klinis; non-invasif	kedalaman eGlx disimpulkan; hanya cocok untuk hewan yang dibius

eGlx, glikokaliks endotel; ELISA, uji immunosorben terkait enzim.



Gambar 2. Gambar mikrograf elektron menggunakan pewarnaan biru Alcian dari glikokaliks endotel (eGlx) pada permukaan sel endotel glomerulus tikus. Kotak merah menunjukkan area di (A) diperbesar di (B). F, fenestrasi endotel; GBM, membran basal glomerulus; GEnC, sel endotel glomerulus; P, proses kaki podosit.

Lektin juga menampilkan pola pengikatan yang berbeda dalam penelitian yang berbeda. Misalnya, aglutinin gandum (WGA) dilaporkan berhasil memberi label eGlx di otot jantung dan otak kucing dalam satu penelitian (Castagnaro dkk., 1987) tetapi tidak di tempat lain (Roussel dan Dalion, 1988). Alasan perbedaan tersebut tidak jelas tetapi mungkin termasuk perbedaan dalam suksinilasi lektin, penggunaan fiksatif yang berbeda, variasi dalam glikan yang diekspresikan oleh masing-masing hewan, dan variasi status penyakit.

Pengukuran eGlx tidak langsung

Banyak teknik deteksi dan visualisasi langsung yang tidak cocok untuk studi eGlx dalam sampel klinis. Kuantifikasi produk pemecahan eGlx yang bersirkulasi dalam darah dan urin adalah alat yang lebih dapat diterapkan secara klinis (Schmidt dkk., 2016; Cerdas, 2016). Metode tersebut yang mengukur komponen eGlx dalam cairan biologis termasuk metode kolorimetri, kromatografi cair kinerja tinggi, spektrometri massa, dan uji immunosorben terkait-enzim (ELISA) (Imanari dkk., 1992; Padberg dkk., 2014; Schmidt dkk., 2016). ELISA dapat mengukur komponen eGlx tertentu, misalnya hyaluronan, dan syndecan-1 (Padberg dkk., 2014; Yini dkk., 2015). Seperti dibahas di atas, mungkin ada perbedaan spesies dalam struktur eGlx terkait primari ly untuk pengaturan dan kontribusi Hai f perbedaan proteoglikan dan glikoprotein (Dore dkk., 1998). Oleh karena itu, pengujian spesifik mungkin lebih efektif untuk mendeteksi pelepasan eGlx pada beberapa spesies daripada spesies lainnya. Banyaknya fungsi hyaluronan telah mempengaruhi konservasi tinggi di seluruh spesies (Garantziotis dan Savani, 2019), memungkinkan penggunaan ELISA hyaluronan lintas spesies. Berbagai penelitian pada model manusia dan hewan telah menunjukkan korelasi antara komponen sirkulasi eGlx dan pengukuran ketebalan eGlx langsung dan tidak langsung lainnya (Rehm et al., 2007; Vlahu et al., 2012). Oleh karena itu, kuantifikasi sirkulasi

Komponen eGlx diterima secara luas sebagai penanda kesehatan eGlx.

Penggunaan ELISA untuk mengukur komponen eGlx telah dilaporkan pada anjing (Yini dkk., 2015). Syndecan-1 dan heparan sulfat ELISA digunakan untuk mengevaluasi efektivitas heparin tak terfraksi dalam melindungi eGlx pada model anjing dengan syok septik (Yini dkk., 2015). Namun, tidak jelas apakah tes ini divalidasi untuk digunakan pada anjing. Pengukuran hyaluronan menggunakan ELISA yang tersedia secara komersial divalidasi untuk digunakan dengan sampel serum dari anjing yang menyarankan pelepasan eGlx setelah pemberian cairan kristaloid cepat pada model anjing dengan syok hemoragik (Cerdas dkk., 2018). Konsentrasi hyaluronan plasma telah diukur pada anjing yang sehat untuk menyelidiki dampak dari berbagai tingkat cairan dan menunjukkan tidak ada perbedaan yang signifikan dalam konsentrasi hyaluronan antara tingkat pemberian cairan (Beiseigel dkk., 2021). Baru-baru ini, menggunakan ELISA hyaluronan yang sama, kerusakan eGlx ditunjukkan pada anjing dengan penyakit katup mitral myxomatous yang terjadi secara alami dan anjing dalam keadaan hiperkoagulasi (Lawrence-Mills dkk., 2022b, masalah ini). Hyaluronan secara khusus juga telah diukur sebagai penanda kesehatan pembuluh darah pada penyakit lain. Misalnya, serum hyaluronan telah dilaporkan lebih tinggi pada anjing dengan pirau portosistemik (Seki dkk., 2010). Sementara konsentrasi serum hyaluronan terbukti menurun dari satu bulan pasca ligasi shunt (Devriendt dkk., 2021). Studi-studi ini menggunakan hyaluronan sebagai penanda perfusi hati karena katabolismenya yang cepat oleh sel-sel endotel sinusoidal hati; namun, peningkatan konsentrasi sirkulasi dapat mengindikasikan kerusakan eGlx pada penyakit ini.

Kebutuhan akan metode pengukuran eGlx yang lebih non-invasif telah mengarah pada pengembangan teknik yang memanfaatkan pencitraan bidang gelap aliran mikro (biasanya mukosa sublingual) dalam kombinasi dengan perangkat lunak khusus. Teknik ini menyimpulkan kedalaman eGlx dengan mengukur perfused boundary region (PBR). Ini intra-

area luminal di mana sel darah merah yang mengalir dapat bergerak melalui eGlx dan berbeda dari bagian impermeabel eGlx (Gambar 3). Kerusakan pada eGlx menghasilkan peningkatan PBR, sehingga PBR merupakan ukuran tidak langsung dari kesehatan eGlx (Martens et al., 2013). Teknik ini sudah digunakan pada pasien manusia untuk menyelidiki eGlx. Sebagai contoh, Pouska dkk. (2018) menggunakan PBR untuk menyelidiki dampak tantangan cairan pada eGlx dan mampu menunjukkan peningkatan PBR yang signifikan setelah pemberian kristaloid seimbang 500 mL. Pencitraan lapangan gelap sidestream telah dieksplorasi untuk penggunaan hewan. Dua penelitian telah menerapkan metodologi ini dengan cara non-invasif untuk mengukur eGlx di mikrovaskular sublingual anjing yang dibius (London et al., 2018) dan kucing (Yozova dkk., 2021). Pada kuda, mikroskop video lapangan gelap sidestream telah digunakan untuk menilai perfusi mikrovaskuler. Mansour dkk., (2021), tetapi bukan eGlx. Teknik ini juga telah diterapkan untuk menilai mikrosirkulasi usus. Pada pasien manusia; pengukuran indeks aliran mikrovaskular telah terbukti serupa antara mikrovaskular usus dan sublingual (de Bruin dkk., 2016). Pada spesies hewan, penilaian mikroskopis video lapangan gelap sidestream eGlx jejunal telah diusulkan sebagai penanda kesehatan mikrovaskular jejunum pada anjing (Mullen dkk., 2020), dengan aplikasi potensial yang mencakup membantu dalam identifikasi usus terganggu yang membutuhkan reseksi. Pengukuran dalam semua penelitian pada spesies hewan dilaporkan serupa dengan yang diperoleh pada manusia. Namun, temuan tidak berkorelasi dengan pengukuran eGlx langsung atau tidak langsung lainnya. Selanjutnya, persyaratan untuk akses ke mikrovaskular sublingual atau jejunum dan kebutuhan untuk mendapatkan gambar selama beberapa menit berarti saat ini teknik ini hanya dapat digunakan pada hewan yang dibius.

fungsi eGlx

eGlx berkontribusi pada kesehatan pembuluh darah melalui banyak fungsi. Fungsi utama diuraikan dalam Gambar 4.

Permeabilitas vaskular

eGlx sangat penting untuk menjaga homeostasis vaskular dan kesehatan secara keseluruhan. Ini secara langsung mengatur permeabilitas vaskular karena ukuran dan pengaturan spasial protein dan disakarida membentuk jaring fisik dan GAG yang sangat tersulfat menghasilkan muatan negatif bersih. Kombinasi sifat fisik dan elektrostatik eGlx membuat saringan makromolekul tidak termasuk molekul >70 kDa dari mencapai membran sel endotel luminal (Vink dan Duling, 1996). Selanjutnya, pengikatan albumin yang bersirkulasi ke eGlx menghasilkan tekanan onkotik di dalam eGlx, sehingga secara lokal meningkatkan tekanan onkotik intravaskular. Oleh karena itu, permeabilitas vaskular dipengaruhi oleh

tekanan onkotik di dalam lumen pembuluh darah, eGlx, dan interstitium (Jacob et al., 2007). Pergerakan cairan melintasi dinding pembuluh darah ke jaringan sekitarnya ditentukan oleh perbedaan antara tekanan onkotik di ketiga kompartemen (Yakub et al., 2007; Salmon et al., 2009). Ini merevisi teori gaya Starling tradisional yang sebelumnya hanya mempertimbangkan tekanan onkotik intravaskular global relatif terhadap jaringan sekitarnya (Yakub et al., 2007; Cerdas, 2016).

Interaksi dinding kapal

eGlx mengatur interaksi antara sel-sel di dalam pembuluh, seperti sel darah merah dan trombosit, dan membran sel endotel. Ini memberikan lapisan fisik pada permukaan sel endotel sehingga mencegah kontak langsung dengan sel yang bersirkulasi (Pries et al., 1998). Lebih lanjut, 'penyembunyikan' glikoprotein yang aktif secara fungsional, seperti selektin dan integrin, membantu mempertahankan homeostasis vaskular. Degradasi eGlx memperlihatkan molekul adhesi intraseluler-1 yang menghasilkan perlekatan dan aktivasi leukosit (Mulivor dan Lipowsky, 2009). Keseimbangan yang baik antara keadaan hiper dan hipokoagulasi dipertahankan melalui penyimpanan kofaktor enzimatik dalam eGlx, termasuk antitrombin dan aktivator plasminogen tipe jaringan (Johansson et al., 2011). Kemampuan eGlx untuk mengikat enzim seperti superoksida dismutase juga berperan untuk melindungi endotelium (Li et al., 1998). eGlx terikat superoksida dismutase mengais oksigen radikal bebas, sehingga mengurangi stres oksidatif dan mencegah disfungsi endotel.

Mekanotransduksi

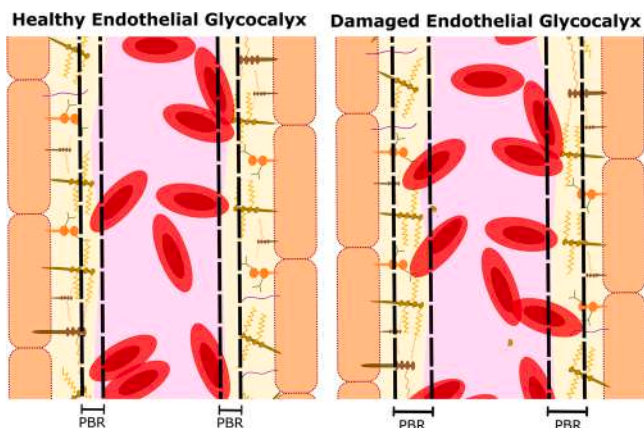
eGlx bertindak sebagai mekanotransduser, memungkinkan sel-sel endotel untuk merespon kekuatan yang disebabkan oleh aliran plasma. Tegangan geser ditransmisikan melalui protein transmembran eGlx, diperkirakan mengikat secara intraseluler ke sitoskeleton sel endotel (Pries et al., 2000). Sinyal tegangan geser menentukan komposisi eGlx, dengan paparan tegangan geser kronis meningkatkan sintesis glikosaminoglikan (Arisaka dkk., 1995). Selanjutnya, vasodilatasi yang dimediasi aliran diatur oleh eGlx. Peningkatan aliran darah menyebabkan perubahan konformasi dalam eGlx memicu pelepasan oksida nitrat (NO) (Mochizuki dkk., 2003) yang pada gilirannya memediasi vasodilatasi lokal dan peningkatan permeabilitas vaskular (Santos-Parker dkk., 2017).

Bukti keterlibatan eGlx dalam penyakit

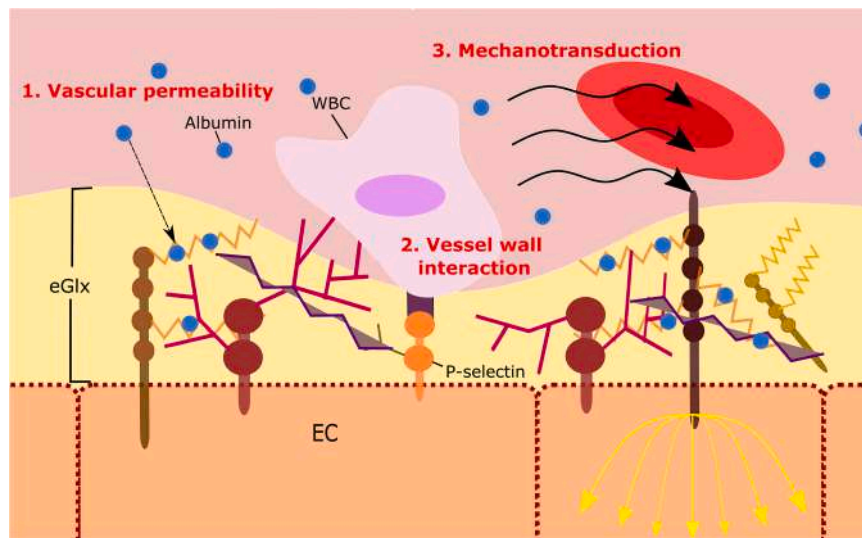
Ada semakin banyak bukti yang mendukung peran penumpahan eGlx pada model penyakit hewan dan penyakit yang terjadi secara alami pada manusia, namun, beberapa penelitian telah meneliti hal ini pada kucing dan anjing. Meja 2 merangkum bukti degradasi eGlx pada pasien manusia dengan penyakit alami dan bukti terbatas pada kucing dan anjing. Sebagian besar bukti peran kerusakan eGlx berasal dari model hewan percobaan dan penyakit spontan pada manusia dan spesies hewan untuk keadaan berikut:

Sepsis

Sepsis mengacu pada respon inflamasi sistemik terhadap infeksi (Penyanyi dkk., 2016). Sepsis adalah penyebab utama kematian pada kucing dan anjing yang sakit kritis (Babyak dan Sharp, 2016; Kenney dkk., 2010). eGlx secara patofisiologis penting pada sepsis karena perannya yang penting dalam permeabilitas dan tonus vaskular. Perubahan komposisi eGlx setelah peradangan dianggap sebagai salah satu ciri awal sepsis pada manusia (Martin dkk., 2016; Steppan et al., 2011). Anjing dengan septic peritonitis telah terbukti memiliki peningkatan konsentrasi hyaluronan pada hari ke 2 atau 3 rawat inap dibandingkan dengan masuk, konsentrasi ini menurun selama masa pemulihan (Shaw dkk., 2021). Studi yang sama mengidentifikasi hubungan antara interleukin serum (IL) 6 dan konsentrasi hyaluronan, menunjukkan hubungan antara peradangan dan degradasi eGlx. Pada anjing dengan



Gambar 3. Representasi skema dari daerah batas perfusi (PBR), menunjukkan dua pembuluh darah, kiri dengan glikokaliks endotel yang sehat dan kanan dengan glikokaliks endotel yang rusak.



Gambar 4. Fungsi utama glikokaliks endotel (eGlx). Permeabilitas vaskular ditunjukkan oleh eksklusi albumin. Interaksi dinding pembuluh darah ditunjukkan oleh area tipis eGlx yang mengekspos P-selectin pada membran endotel yang memungkinkan terjadinya pengikatan leukosit. Kekuatan aliran plasma, digambarkan oleh panah hitam, ditransmisikan melalui proteoglikan coklat ke dalam sel endotel, ditunjukkan oleh panah kuning. EC, sel endotel; WBC, sel darah putih.

Meja 2

Menguraikan contoh spesifik bukti pelepasan glikokaliks endotel di berbagai keadaan penyakit pada manusia dan spesies hewan.

	Referensi	Keadaan penyakit	Penanda yang digunakan	Temuan
Manusia pasien	Schmidt dkk. (2016)	Sepsis; ARDS	GAG urin fragmen (HS, CS, dan HA)	Pada pasien septic, fragmen GAG urin berkorelasi dengan disfungsi ginjal, dan konsentrasi HS dan HA urin dikaitkan dengan kematian. Pada pasien ARDS, fragmen GAG urin yang lebih tinggi dikaitkan dengan risiko mengembangkan AKI.
	Padberg dkk. (2014)	CKD	Plasma syndecan-1 dan HA	Syndecan-1 plasma dan HA meningkat di seluruh tahap CKD dan peningkatan secara independen terkait dengan disfungsi ginjal.
	Dan dkk. (2014)	ESRD	PBR; plasma sindecan-1	Dibandingkan dengan kontrol yang sehat, pasien ESRD mengalami peningkatan PBR dan syndecan-1 plasma yang lebih tinggi.
	Vlahu et al., 2012	pasien dialisis	PBR; serum syndecan-1 dan HA	Dibandingkan dengan kontrol yang sehat, pasien dialisis mengalami peningkatan PBR, serum syndecan-1, dan serum HA.
	Steppan dkk. (2011)	Sepsis; operasi perut besar	Plasma syndecan-1 dan HS	Pasien bedah dan septic mengalami peningkatan plasma syndecan-1 dan HS (septic > bedah).
	Nelson dkk. (2008)	Sepsis	Plasma syndecan-1	Plasma syndecan-1 meningkat pada pasien septic. Peningkatan berkorelasi dengan peningkatan risiko kematian.
Dokter hewan Jenis	Shaw dkk. (2021)	Peritonitis septic	Serum HA	Serum HA meningkat pada hari ke-2 atau ke-3 rawat inap. Interleukin-6 adalah prediktor serum HA.
	Lawrence-Mills dkk. (2022b)	Hiperkoagulabilitas; MMVD	Plasma HA	Peningkatan HA plasma ditemukan pada anjing dengan hiperkoagulabilitas serta anjing dengan MMVD.
	Naseri dkk. (2020)	parvoviral anjing radang usus	Serum ESM-1	ESM-1 serum yang lebih tinggi ditemukan pada orang yang tidak selamat.
	Yini dkk. (2015)	Model syok septic	Plasma syndecan-1 dan HS	Peningkatan plasma syndecan-1 dan HS ditemukan setelah injeksi dengan dosis yang mematikan <i>E. coli</i> .

AKI, cedera ginjal akut; ARDS, sindrom gangguan pernapasan akut; CKD, penyakit ginjal kronis; CS, kondroitin sulfat; ESM-1, molekul spesifik sel endotel-1; ESRD, penyakit ginjal stadium akhir; GAG, glikosaminoglikan; HA, hialuronan; HS, heparan sulfat; MMVD, penyakit katup mitral myxomatous; PBR, wilayah batas perfusi.

enteritis parvoviral, konsentrasi molekul-1 sel spesifik endotel yang bersirkulasi meningkat dibandingkan dengan kontrol (Naseri dkk., 2020) menunjukkan cedera sel endotel. Namun, komponen eGlx syndecan-1 dan heparan sulfate, tidak ditemukan berbeda secara signifikan antara anjing yang terkena dan kontrol (Naseri dkk., 2020). Ini mungkin karena ukuran sampel yang kecil atau waktu pengambilan sampel (sampel dikumpulkan hanya saat masuk, relatif awal dalam proses penyakit) atau kinerja pengujian yang buruk.

Peran kerusakan eGlx dalam melanggengkan peradangan dan kompromi vaskular telah ditunjukkan (Annecke dkk., 2011; Schmidt dkk., 2012). Kerusakan EGLx menginduksi kebocoran kapiler, agregasi platelet, koagulasi, dan hilangnya tonus vaskular. Annecke dkk., 2011; Desjardins dan Duling, 1990; Johansson et al., 2011) serta ekspresi molekul adhesi, seperti molekul adhesi interseluler-1, memungkinkan ekstrasvasi leukosit (Meerschaert dan Furie,

1995; Stulc dkk., 2008). Peran penting pelepasan eGlx dalam melanggengkan peradangan, dan kerusakan eGlx lebih lanjut, dibuktikan oleh pelepasan eGlx yang diinduksi endotoksemia pada tikus yang memulai aktivasi heparanase endotel, suatu glukuronidase spesifik heparan sulfat yang menginduksi degradasi eGlx dan adhesi neutrofil (Schmidt dkk., 2012). Studi yang sama menunjukkan penghambatan heparanase melemahkan cedera paru akut yang diinduksi sepsis dan kematian pada tikus.

Pelepasan EGLx telah terbukti berkontribusi pada patofisiologi sepsis. Secara khusus, komponen shed eGlx telah terbukti bertindak sebagai pola molekul terkait kerusakan, yang selanjutnya memicu kaskade proinflamasi (Goodall et al., 2014). Fragmen sulfat heparan telah terbukti memediasi pelepasan sitokin; penambahan soluble heparan sulfate ke sel mononuklear darah manusia memicu pelepasan IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10, dan tumor necrosis factor (TNF), sebuah efek yang dimediasi oleh Toll-like receptor-4 (Goodall dkk.,

2014). Lebih lanjut, pengikatan heparan sulfat ke interferon-gamma telah terbukti secara signifikan mengurangi pembersihan plasma, serta meningkatkan aktivitas sitokinnya sebesar 600%, dengan membatasi degradasi domain terminal karboksinya (Lortat-Jacob et al., 1996). Selain itu, degradasi eGlx menawarkan penjelasan yang masuk akal untuk keadaan hiperkoagulasi banyak pasien sepsis (Hoppensteadt et al., 2015). Memang, peningkatan konsentrasi hyaluronan serum juga dilaporkan pada anjing dengan hiperkoagulabilitas. Lawrence-Mills dkk., 2022b, masalah ini). Peran penting eGlx dalam mengatur hemostasis; termasuk pengaturan interaksi antara sel-sel yang bersirkulasi dan membran sel endotel (Pries et al., 1998), 'penyembunyian' glikoprotein yang aktif secara fungsional (Mulivor dan Lipowsky, 2009; Schmidt dkk., 2012), dan penyimpanan kofaktor enzimatik (Pries et al., 2000), menjadikan pelepasan eGlx sebagai salah satu mekanisme patofisiologi yang masuk akal yang berkontribusi terhadap hiperkoagulabilitas pada anjing.

Selain peningkatan pemahaman tentang patofisiologi sepsis, pengetahuan tentang efek pemberian cairan intravena pada eGlx dapat membantu mencegah perburukan penyakit iatrogenik. Penelitian pada orang telah menguraikan dampak negatif dari infus berlebihan pada pasien sepsis (Kelm dkk., 2015). Yang terpenting, ini terkait dengan peningkatan kematian (Alsous dkk., 2000; Uchino dkk., 2006). Data ini telah menginformasikan pedoman internasional untuk pengobatan sepsis, di mana penggunaan terapi cairan yang hati-hati direkomendasikan setelah resusitasi darurat awal (Dellinger et al., 2008). Kerusakan pada eGlx dianggap sebagai salah satu konsekuensi dari infus berlebih (Chappell et al., 2014). Dalam model eksperimental syok hemoragik anjing, pemberian kristaloid yang cepat meningkatkan pelepasan eGlx (Cerdas dkk., 2018). Temuan ini sejalan dengan pasien manusia dan model hewan dan menyarankan penghindaran pemberian bolus cairan yang berlebihan mungkin penting dalam pengelolaan syok pada anjing. Penanda kerusakan eGlx memberikan informasi prognostik pada pasien manusia sepsis (Kumar dkk., 2006; Mouncey dkk., 2015) dan ini mungkin juga berlaku pada anjing dan kucing. Pada pasien syok sepsis manusia, konsentrasi GAG yang bersirkulasi meningkat secara signifikan pada non-selamat dibandingkan dengan yang selamat (Nelson dkk., 2008).

Penyakit ginjal, proteinuria, dan mikroalbuminuria

Penyakit ginjal kronis (CKD) sering terjadi pada hewan pendamping. Satu studi retrospektif mengidentifikasi 40% kucing dewasa di bawah usia 15 tahun menderita CKD, ini meningkat menjadi 80% untuk kucing di atas 15 tahun (Marino et al., 2014). Satu studi Swedia melaporkan prevalensi CKD seumur hidup pada anjing sebesar 16% (Pelander dkk., 2015), meskipun laporannya bervariasi; beberapa menyatakan prevalensi serendah 3,7% (O'Neill et al., 2013). Pada manusia, kerusakan eGlx sistemik, diukur dengan komponen eGlx yang bersirkulasi, berkorelasi dengan disfungsi ginjal. Dane dkk., 2014; Vlahu et al., 2012) dengan konsentrasi komponen eGlx 4 kali lipat lebih besar, syndecan-1 dan hyaluronan, pada pasien CKD dibandingkan dengan kontrol yang sehat (Padberg et al., 2014). Selanjutnya, konsentrasi komponen eGlx yang lebih tinggi ditunjukkan dalam peningkatan tahap penyakit (Padberg et al., 2014). Selain itu, konsentrasi fragmen GAG urin pada pasien manusia yang sakit kritis berkorelasi dengan disfungsi ginjal. Schmidt dkk., 2016). Studi mengevaluasi kerusakan eGlx dan fungsi ginjal pada kucing dan anjing belum dipublikasikan; namun, pengukuran komponen GAG urin menawarkan biomarker non-invasif yang potensial. Selain itu, peningkatan pengetahuan tentang peran eGlx dalam penyakit ginjal kronis dan akut pada kucing dan anjing memungkinkan pengembangan terapi bertarget yang sangat dibutuhkan.

Kerusakan eGlx sistemik dilaporkan pada pasien CKD manusia. Selain itu, kerusakan eGlx khususnya di dalam mikrovaskuler ginjal dapat berkontribusi pada gangguan permeabilitas ginjal (Singh dkk., 2007; Oltean dkk., 2015; Desideri dkk., 2018; Butler dkk., 2019; Bawang et al., 2019; Ramnath dkk., 2020). Pada manusia, pelepasan eGlx glomerulus dapat terjadi setelah terpapar noxae inflamasi yang bersirkulasi (Padberg et al., 2014). Hilangnya integritas eGlx glomerulus berkontribusi pada peningkatan permeabilitas albumin (dan berpotensi makromolekul lainnya).

(Henry dan Duling, 2000; Zdosek dkk., 2020). Dengan demikian, kerusakan eGlx glomerulus berperan dalam perkembangan proteinuria dan khususnya albuminuria pada cedera glomerulus. Singh dkk., 2007; Lees et al., 2011). Studi in vitro telah mendukung peran pelepasan eGlx glomerulus pada mikroalbuminuria pada manusia (Singh dkk., 2007). Lebih lanjut, telah dihipotesiskan bahwa mikroalbuminuria dapat menandakan kerusakan eGlx sistemik serta kerusakan eGlx glomerulus (Singh dan Satchell, 2011). Pada manusia, mikroalbuminuria secara klinis penting karena dikaitkan dengan peningkatan risiko semua penyebab kematian. Xia dkk., 2015), penyakit kardiovaskular (Segura dkk., 2004), perkembangan berbagai etiologi penyakit ginjal, dan peningkatan mortalitas akibat penyakit ginjal (Matsushita dkk., 2010). Signifikansi klinis mikroalbuminuria pada kucing dan anjing masih belum jelas, seperti halnya hubungannya dengan kerusakan eGlx glomerulus atau sistemik.

Hipervolemia dan hipertensi

Hipervolemia telah dikaitkan dengan peningkatan mortalitas pada anjing yang dirawat di rumah sakit (Cavanagh dkk., 2016). Hipervolemia dan hipertensi menginduksi pelepasan eGlx pada pasien manusia dan model hewan (Ueno dkk., 2004; Bruegger dkk., 2011; Chappell et al., 2014). Penumpahan eGlx yang diinduksi hipervolemia pada anjing didukung oleh temuan peningkatan hyaluronan yang bersirkulasi setelah pemberian kristaloid volume besar yang cepat dalam model syok hemoragik anjing eksperimental (Cerdas dkk., 2018). Studi yang sama menyelidiki dampak dari jenis dan kecepatan, serta volume keseluruhan, dari cairan yang diberikan. Konsentrasi puncak hyaluronan diidentifikasi lebih awal, setelah 20 menit, setelah infus kristaloid isotonik, dibandingkan dengan kemudian, setelah 40 menit, setelah infus gelatin suksinilasi 4%. Lebih lanjut, kerusakan eGlx lebih besar dengan kristaloid isotonik pada kecepatan tinggi infus 80 mL/kg selama 20 menit, dibandingkan dengan larutan lain pada 20 mL/kg selama 20 menit. Sebuah studi yang berbeda telah menunjukkan peningkatan konsentrasi hyaluronan plasma dari awal pada anjing setelah pemberian cairan kristaloid 5 dan 10 mL/kg/jam (Beiseigel dkk., 2021), mendemonstrasikan laju cairan yang bahkan sederhana memiliki potensi untuk menginduksi degradasi eGlx. Pada pasien manusia, peningkatan PBR yang signifikan telah ditunjukkan setelah bolus kristaloid 500 mL pada pasien bedah tulang belakang dan pasien syok sepsis. Pouska dkk., 2018). PBR menjadi normal dalam waktu 60 menit pada pasien bedah tulang belakang, tetapi tidak pada pasien syok sepsis, menunjukkan bahwa bahkan bolus konservatif dapat menghasilkan kerusakan eGlx jangka panjang pada pasien dengan eGlx yang sudah rentan. Hipervolemia itu sendiri merusak eGlx melalui hemodilusi protein plasma serta perubahan osmotik. Pries dkk., 1998; Torres dkk., 2013); namun, ia juga menginduksi pelepasan peptida natriuretik atrium dari atrium jantung (Chappell et al., 2014). Peptida natriuretik atrium menginduksi pelepasan eGlx dan hilangnya fungsi penghalang vaskular di dasar pembuluh darah koroner jantung kelinci percobaan (Bruegger dkk., 2005; Yakub et al., 2013).

Dampak hipertensi pada eGlx telah dipelajari secara ekstensif pada sel endotel otak. Penumpahan eGlx awal, terutama di kapiler, ditunjukkan pada model hewan pengerat hipertensi spontan, yang membahayakan integritas sawar darah otak (Ueno et al., 2004). Pada hewan pendamping, hipertensi sistemik paling sering merupakan akibat dari penyakit bersamaan (Acierno et al., 2018). Hingga 93% anjing dengan CKD (Anderson dan Fisher, 1968), 67% anjing dengan diabetes (Marynissen dkk., 2016) dan 73% anjing dengan hiperadrenocorticism (Ortega dkk., 1996) adalah hipertensi. Studi melaporkan 87% kucing hipertiroid dan 46% kucing dengan CKD menjadi hipertensi. Kobayashi dkk., 1990). Hipertensi sistemik yang tidak terkontrol menyebabkan kerusakan organ target dalam jaringan yang rentan termasuk ginjal, mata, otak, dan jantung. Acierno et al., 2018). Patofisiologi kerusakan organ target bersifat multifaktorial; Namun, komponen kuncinya adalah peradangan dan cedera endotel (Schmid-Schönbein dkk., 1991; McCarron dkk., 1994; Schillaci et al., 2003). Peran penting eGlx dalam menjaga integritas vaskular membuat keterlibatannya dalam kerusakan organ target pada pasien manusia tidak mengejutkan, meskipun hal ini tetap tidak dipelajari pada kucing dan anjing. Yang penting, pemulihan penawaran eGlx

perlindungan potensial organ penting pada pasien dengan hipertensi sekunder, di samping obat anti-hipertensi dan pengelolaan penyakit primer.

Perlindungan terapeutik eGlx

Bukti yang berkembang tentang kontribusi kerusakan eGlx di sebagian besar keadaan penyakit manusia telah menyebabkan fokus dalam penelitian medis ke dalam terapi untuk mencegah penumpahan eGlx atau memulihkan eGlx yang rusak. Penelitian terapi bertarget masih dalam tahap awal dan saat ini tidak ada produk berlisensi. Sampai saat ini, bukti menunjukkan bahwa salah satu strategi paling efektif untuk perlindungan eGlx adalah dengan mencegah kelebihan volume cairan (Chappell et al., 2014). Ini telah membantu menginformasikan rezim terapi cairan pada pasien manusia (Dellinger et al., 2008) dan kucing dan anjing (Byers, 2017). Namun, rekomendasi spesifik untuk kecepatan infus cairan masih diperdebatkan. Pada orang dengan sepsis, laju cairan kristaloid hingga 30 mL/kg selama 3 jam pertama telah direkomendasikan (Rhodes et al., 2017). Pedoman yang diperbarui menilai bukti di balik ini sebagai kualitas rendah dan sebagai gantinya menyarankan penggunaan langkah-langkah dinamis untuk memandu resusitasi cairan (Evans dkk., 2021). Misalnya, memantau perubahan volume sekuncup sebagai respons terhadap kenaikan kaki pasif. Namun, volume darah spesifik spesies dan toleransi cairan membatasi ekstrapolasi langsung dari rekomendasi untuk manusia ke spesies hewan. Sebaliknya, konsensus adalah untuk pendekatan individual berbasis pasien (Montealegre dan Lyons, 2021). Kristaloid isotonic umumnya merupakan jenis cairan pilihan pada pasien manusia dan hewan dengan koloid yang berpotensi menyebabkan keadaan hipervolemik dan kerusakan eGlx (Rehm et al., 2001).

Atau, penghambatan enzim yang memulai degradasi eGlx telah dieksplorasi. Pra-pengobatan dengan etanercept, inhibitor TNF, mencegah peningkatan konsentrasi hyaluronan plasma serta penurunan aktivasi koagulasi pada pria yang disuntik dengan *E. coli* lipopolisakarida endotoksin (Nieuwdorp dkk., 2009). Doksisisiklin dapat menstabilkan eGlx dengan menghambat matriks metaloproteinase. Pemberiannya pada tikus sebelum dan selama serangan mengurangi pelepasan eGlx, setelah infus peptida chemoattractant buatan f-Met-Leu-Phe ke dalam mesenterium usus (Mulivor dan Lipowsky, 2009). Keberhasilan klinis pendekatan yang secara selektif menghambat enzim degradasi eGlx kemungkinan akan terbatas karena sejumlah besar enzim yang mampu merusak eGlx, serta kebutuhan untuk mengelola inhibitor ini secara pre-emptive untuk efek maksimal (Mulivor dan Lipowsky, 2009; Purushothaman dkk., 2010).

Rekonstitusi eGlx memberikan pilihan terapi tambahan. Sulodexide, GAG murni yang mengandung 80% heparan sulfat dan 20% dermatan sulfat (Veraldi dkk., 2018), telah menunjukkan yang paling menjanjikan. Sulodexide diduga mempromosikan regenerasi eGlx, menurunkan regulasi enzim degradasi eGlx dan memberikan efek anti-apoptosis dan anti-inflamasi pada sel endotel (Ciszewicz dkk., 2009; Broekhuizen dkk., 2010). Pada pasien diabetes tipe-2 manusia, sulodexide sebagian menormalkan permeabilitas pembuluh darah yang didalilkan sebagian karena pemulihan eGlx yang sehat (Broekhuizen dkk., 2010). Namun, uji klinis yang lebih besar yang menyelidiki penggunaan sulodeksida dalam mencegah perkembangan penyakit ginjal dan jantung telah terbukti tidak meyakinkan (Lewis et al., 2011; Packham et al., 2012), berpotensi karena desain studi. Pada anjing, potensi rekonstitusi eGlx telah ditunjukkan dalam model anjing syok septik di mana infus heparin tak terpecah mengurangi pelepasan eGlx (Yini dkk., 2015).

Kesimpulan

eGlx adalah struktur yang dinamis dan menarik dengan peran penting dalam kesehatan dan penyakit. Terdiri dari proteoglikan, glikoprotein, dan protein plasma terlarut, komposisinya secara integral terkait dengan fungsinya dalam mengatur permeabilitas pembuluh darah, interaksi sel endotel dan mekanotransduksi. Studi eGlx menantang. Namun, kami telah menyajikan teknik dalam ulasan ini yang cocok untuk kedokteran hewan

pasien klinis seperti pengukuran tidak langsung komponen eGlx menggunakan ELISA. Pada manusia, ada banyak bukti yang muncul bahwa kerusakan eGlx mencegah fungsi normalnya dalam mempertahankan homeostasis vaskular dan berkontribusi pada patofisiologi dan perkembangan banyak penyakit. Pada spesies hewan, penelitian masih dalam tahap awal, meskipun penelitian awal menunjukkan degradasi eGlx berperan dalam penyakit yang terjadi secara alami pada anjing. Penelitian pada spesies veteriner pada awalnya harus fokus pada menunjukkan adanya kerusakan eGlx pada penyakit, dan memvalidasi alat yang diperlukan untuk studinya, sebelum mengevaluasi terapi potensial.

Pernyataan konflik kepentingan

Penelitian ini didanai seluruhnya, atau sebagian, oleh Wellcome Trust (204813/Z/16/Z). Tak satu pun dari penulis makalah ini memiliki hubungan keuangan atau pribadi dengan orang atau organisasi lain yang dapat mempengaruhi atau membiaskan isi makalah secara tidak tepat.

Referensi

- Acierno, MJ, Brown, S., Coleman, AE, Jepson, RE, Papich, M., Stepien, RL, Syme, H. M., 2018. Pernyataan konsensus ACVIM: pedoman untuk identifikasi, evaluasi, dan manajemen hipertensi sistemik pada anjing dan kucing. *Jurnal Kedokteran Penyakit Dalam Hewan* 32, 1803-1822.
- Alsous, F., Khamies, M., DeGirolamo, A., Amoateng-Adjepong, Y., Manthous, CA, 2000. Keseimbangan cairan negatif memprediksi kelangsungan hidup pada pasien dengan syok septik: studi percontohan retrospektif. *Jurnal Dada* 117, 1749-1754.
- Anderson, LJ, Fisher, EW, 1968. Tekanan darah pada nefritis interstisial anjing. *Penelitian dalam Ilmu Kedokteran Hewan* 9, 304-313.
- Annecke, T., Fischer, J., Hartmann, H., Tschöep, J., Rehm, M., Conzen, P., Sommerhoff, CP, Becker, BF, 2011. Pelepasan glikokaliks endotel koroner: Efek hipoksia/reoksigenasi vs iskemia/reperfusi. *British Journal of Anesthesia* 107, 679-686.
- Arisaka, T., Mitsumata, M., Kawasumi, M., Tohjima, T., Hirose, S., Yoshida, Y., 1995. Efek tegangan geser pada sintesis glikosaminoglikan dalam sel endotel vaskular. *Sejarah Akademi Ilmu Pengetahuan New York* 748, 543-554.
- Babyak, JM, Sharp, CR, 2016. Epidemiologi respon inflamasi sistemik sindrom dan sepsis pada kucing yang dirawat di rumah sakit pendidikan hewan. *Jurnal Asosiasi Medis Hewan Amerika* 249, 65-71.
- Beiseigel, M., Simon, BT, Michalak, C., Stickney, MJ, Jeffery, U., 2021. Pengaruh per-laju cairan kristaloid operasi pada hyaluronan yang bersirkulasi pada anjing sehat: studi percontohan. *Jurnal Kedokteran Hewan* 267, 105578.
- van den Berg, BM, Vink, H., Spaan, JA, 2003. Glikokaliks endotel melindungi terhadap edema miokard. *Penelitian Peredaran Darah* 92, 592-594.
- van den Berg, BM, Spaan, JA, Rolf, TM, Vink, H., 2006. Wilayah aterosklerotik dan diet mengurangi dimensi glikokaliks dan meningkatkan rasio intima-ke-media pada bifurkasi arteri karotis murine. *American Journal of Physiology Jantung dan Peredaran Darah* 290, H915-H920.
- Betteridge, KB, Arkill, KP, Neal, CR, Harper, SJ, Foster, RR, Satchell, SC, Bates, D. O., Salmon, AHJ, 2017. Asam sialat mengatur permeabilitas pembuluh mikro, diungkapkan oleh studi in vivo baru tentang struktur dan fungsi glikokaliks endotel. *Jurnal Fisiologi* 595, 5015-5035.
- Brands, J., Hubel, CA, Althouse, A., Reis, SE, Pacella, JJ, 2020. Noninvasif pencitraan mikrovaskular sublingual mengungkapkan pengurangan spesifik jenis kelamin dalam sifat perantara glikokaliks pada pasien dengan penyakit arteri koroner. *Laporan Fisiologi* 8, e14351.
- Broekhuizen, LN, Lemkes, BA, Mooij, HL, Meuwese, MC, Verberne, H., Holleman, F., Schlingemann, RO, Nieuwdorp, M., Stroes, ES, Vink, H., 2010. Pengaruh sulodexide pada glikokaliks endotel dan permeabilitas vaskular pada pasien dengan diabetes mellitus tipe 2. *Journal of European Association of the Study of Diabetes* 53, 2646-2655.
- Bruegger, D., Jacob, M., Rehm, M., Loetsch, M., Welsch, U., Conzen, P., Becker, BF, 2005. Peptida natriuretik atrium menginduksi pelepasan glikokaliks endotel di dasar pembuluh darah koroner hati babi guinea. *American Journal of Physiology Jantung dan Fisiologi Peredaran Darah* 289, H1993-H1999.
- Bruegger, D., Schwartz, L., Chappell, D., Jacob, M., Rehm, M., Vogeser, M., Kristus, F., Reichart, B., Becker, BF, 2011. Pelepasan peptida natriuretik atrium mendahului pelepasan glikokaliks endotel secara merata pada pasien yang menjalani operasi bypass arteri koroner on- dan offpump. *Penelitian Dasar dalam Kardiologi* 106, 1111-1121.
- de Bruin, AF, Kornmann, VN, van der Sloot, K., van Vugt, JL, Gosselink, MP, Smits, A., Van Ramshorst, B., Boerma, EC, Noordzij, PG, Boerma, D., 2016. Pencitraan bidang gelap sidestream dari mikrosirkulasi serosal selama operasi gastrointestinal. *Penyakit Kolorektal* 18, O103-O110.
- Butler, MJ, Ramnath, R., Kadoya, H., Desposito, D., Riquier-Brison, A., Ferguson, JK, Onions, KL, Ogier, AS, Elhegny, H., Coward, RJ, et al., 2019. Aldosteron menginduksi albuminuria melalui kerusakan matriks yang bergantung pada metaloproteinase dari glikokaliks endotel. *Ginjal Internasional* 95, 94-107.
- Byers, CG, 2017. Terapi cairan: pilihan dan seleksi rasional. *Klinik Hewan Amerika Utara: Latihan Hewan Kecil* 47, 359-371.

- Batal, LM, Ebong, EE, Mensah, S., Hirschberg, C., Tarbell, JM, 2016. Endotel glycocalyx, apoptosis dan peradangan pada model tikus aterosklerotik. *Aterosklerosis* 252, 136-146.
- Castagnaro, M., Alroy, J., Ucci, AA, Glew, RH, 1987. Histokimia lektin dan ultrastruktur ginjal kucing dari enam penyakit penyimpanan yang berbeda. *Patologi Sel termasuk Patologi Molekuler* 54, 16-26.
- Cavanagh, AA, Sullivan, LA, Hansen, BD, 2016. Evaluasi retrospektif cairan kelebihan beban dan hubungan dengan hasil pada anjing yang sakit kritis. *Jurnal Perawatan Darurat dan Kritis Hewan* 26, 578-586.
- Chappell, D., Jacob, M., Paul, O., Rehm, M., Welsch, U., Stoeckelhuber, M., Conzen, P., Becker, BF, 2009. Glikokaliks dari sel endotel vena umbilikalis manusia: Struktur yang mengesankan secara ex vivo tetapi tidak dalam kultur. *Penelitian Sirkulasi* 104, 1313-1317.
- Chappell, D., Bruegger, D., Potzel, J., Jacob, M., Brettner, F., Vogeser, M., Conzen, P., Becker, BF, Rehm, M., 2014. Hipervolemia meningkatkan pelepasan peptida natriuretik atrium dan pelepasan glikokaliks endotel. *Perawatan Kritis* 18, 538.
- Ciszewicz, M., Polubinska, A., Antoniewicz, A., Suminska-Jasinska, K., Breborowicz, A., 2009. Sulodexide menekan peradangan pada sel endotel manusia dan mencegah sitotoksitas glukosa. *Penelitian Penerjemahan* 153, 118-123.
- Curran, RC, Clark, AE, Lovell, D., 1965. Mukopolisakarida asam dalam elektron mikroskopi. *Penggunaan Jurnal Anatomi Metode Besi Kolloid* 99, 427-434. Dane, MJ, van den Berg, BM, Avramut, MC, Faas, FG, van der Vlag, J., Rops, AL, Ravelli, RB, Koster, BJ, van Zonneveld, AJ, Vink, H., et al., 2013. Lapisan permukaan endotel glomerulus bertindak sebagai penghalang terhadap filtrasi albumin. *Jurnal Patologi Amerika* 182, 1532-1540.
- Dane, MJ, Khairoun, M., Lee, DH, van den Berg, BM, Eskens, BJ, Boels, MG, van Teeffelen, JW, Rops, AL, van der Vlag, J., van Zonneveld, AJ, et al., 2014. Asosiasi fungsi ginjal dengan perubahan pada lapisan permukaan endotel. *Jurnal Klinis American Society of Nephrology* 9, 698-704. Dellinger, RP, Levy, MM, Carlet, JM, Bion, J., Parker, MM, Jaeschke, R., Reinhart, K., Angus, DC, Brun-Buisson, C., Beale, R., et al., 2008. Surviving Sepsis Campaign: pedoman internasional untuk pengelolaan sepsis berat dan syok septik: 2008. *Jurnal Kedokteran Perawatan Kritis* 36, 296-327.
- Desideri, S., Bawang, KL, Qiu, Y., Rammath, RD, Butler, MJ, Neal, CR, Raja, MLR, Salmon, AE, Saleem, MA, Welsh, GL, et al., 2018. Sebuah uji baru memberikan pengukuran sensitif dari perubahan fisiologis yang relevan dalam permeabilitas albumin pada glomeruli manusia dan hewan pengerat yang terisolasi. *Ginjal Internasional* 93, 1086-1097. Desjardins, C., Duling, BR, 1990. Pengobatan heparinase menunjukkan peran untuk glikokaliks sel endotel dalam regulasi hematokrit kapiler. *Jurnal Fisiologi Amerika* 258, H647-H654.
- Devriendt, N., Serrano, G., Meyer, E., Demeyere, K., Paepe, D., Vandermeulen, E., Stock, E., de Rooster, H., 2021. Serum asam hialuronat, penanda untuk peningkatan perfusi hati setelah peleman bedah bertahap penutupan shunt portosistemik ekstrahepatik pada anjing. *Jurnal Kedokteran Hewan* 268, 105604.
- Dore, JM, Morand, F., Vita, N., Wijdenes, J., 1998. Identifikasi dan lokasi pada protein inti syndecan-1 dari epitel antibodi monoklonal B-B2 dan B-B4. *Surat FEBS* 426, 67-70.
- Ebong, EE, Macaluso, FP, Semprot, DC, Tarbell, JM, 2011. Pencitraan endotel glycocalyx in vitro dengan mikroskop elektron transmisi substitusi pembekuan / pembekuan cepat. *Trombosis Arteriosklerosis dan Biologi Vaskular* 31, 1908-1915.
- Evans, L., Rhodes, A., Alhazzani, W., Antonelli, M., Coopersmith, CM, Prancis, C., Machado, FR, McIntyre, L., Ostermann, M., Prescott, HC, et al., 2021. Kampanye sepsis yang bertahan: pedoman internasional untuk pengelolaan sepsis dan syok septik 2021. *Pengobatan Perawatan Intensif* 47, 1181-1247.
- Florian, JA, Kosky, JR, Ainslie, K., Pang, Z., Kusam, RO, Tarbell, JM, 2003. Heparan sulfat proteoglikan adalah mekanosensor pada sel endotel. *Penelitian Sirkulasi* 93, e136-e142.
- Garantziotis, S., Savani, RC, 2019. Biologi Hialuronan: tindakan penyeimbangan yang kompleks dari struktur, fungsi, lokasi dan konteks. *Biologi Matriks* 78-79, 1-10.
- Gloe, T., Sohn, HY, Meiningner, GA, Pohl, U., 2002. Pelepasan yang diinduksi tegangan geser dari faktor pertumbuhan fibroblas dasar dari sel endotel dimediasi oleh interaksi matriks melalui integrin $\alpha(v)\beta3$. *Jurnal Kimia Biologi* 277, 23453-23458.
- Goodall, KJ, Poon, IK, Phipps, S., Hulett, MD, 2014. Heparan sulfat terlarut fragmen yang dihasilkan oleh heparanase memicu pelepasan sitokin pro-inflamasi melalui TLR-4. *PLoS One* 9, e109596.
- Hegermann, J., Lunsdorf, H., Ochs, M., Haller, H., 2016. Visualisasi glomerulus glikokaliks endotel dengan mikroskop elektron menggunakan torium dioksida kolloid kationik. *Histokimia dan Biologi Sel* 145, 41-51.
- Henry, CB, Duling, BR, 2000. TNF-alpha meningkatkan masuknya makromolekul ke dalam glikokaliks sel endotel luminal. *American Journal of Physiology: Fisiologi Jantung dan Peredaran Darah* 279, H2815-H2823.
- Heron, M., Anderson, RN, 2016. Perubahan penyebab utama kematian: Pola terkini pada penyakit jantung dan kematian akibat kanker. *Pengarahan Data NCHS* 1-8.
- Hoppensteadt, D., Tsuruta, K., Hirman, J., Kaul, I., Osawa, Y., Fareed, J., 2015. Disregulasi penanda inflamasi dan hemostatik pada sepsis dan dugaan koagulasi intravaskular diseminata. *Trombosis Klinis dan Terapan / Hemostasis* 21, 120-127.
- Imanari, T., Toyoda, H., Yamanashi, S., Shinomiya, K., Koshiishi, I., Oguma, T., 1992. Studi pengukuran kondroitin sulfat dalam plasma dan serum kelinci. *Jurnal Kromatografi* 574, 142-145.
- Jacob, M., Bruegger, D., Rehm, M., Stoeckelhuber, M., Welsch, U., Conzen, P., Becker, B. F., 2007. Glikokaliks endotel memberikan kompatibilitas prinsip Starling dan kadar albumin interstitial jantung yang tinggi. *Penelitian Kardiovaskular* 73, 575-586.
- Jacob, M., Saller, T., Chappell, D., Rehm, M., Welsch, U., Becker, BF, 2013. Tingkat fisiologis peptida natriuretik tipe A-, B- dan C melepaskan lapisan endotel glikokaliks dan meningkatkan permeabilitas pembuluh darah. *Penelitian Dasar dalam Kardiologi* 108, 347.
- Johansson, PI, Stensballe, J., Rasmussen, LS, Ostrowski, SR, 2011. Penerimaan yang tinggi tingkat syndecan-1, penanda degradasi glikokaliks endotel, dikaitkan dengan peradangan, penipisan protein C, fibrinolisis, dan peningkatan mortalitas pada pasien trauma. *Sejarah Bedah* 254, 194-200.
- Jung, U., Ley, K., 1997. Regulasi E-selectin, P-selectin, dan adhesi antar sel ekspresi molekul 1 dalam pembuluh darah otot kremaster tikus. *Mikrosirkulasi* 4, 311-319.
- Kamiya, S., Suzuki, Y., Yamano, S., Daigo, M., 1991. Histokimia lektin kucing badan poliglukosa. *Jurnal Patologi Perbandingan* 104, 141-145. Kelm, DJ, Perrin, JT, Cartin-Ceba, R., Gajic, O., Schenck, L., Kennedy, CC, 2015. Kelebihan cairan pada pasien dengan sepsis berat dan syok septik yang diobati dengan terapi terarah awal dikaitkan dengan peningkatan kebutuhan akut akan intervensi medis terkait cairan dan kematian di rumah sakit. *Kejut* 43, 68-73.
- Kenney, EM, Rozanski, EA, Rush, JE, deLaforcade-Buress, AM, Berg, JR, Silverstein, DC, Montealegre, CD, Jutkowitz, LA, Adamantos, S., Ovbey, DH, et al., 2010. Hubungan antara hasil dan disfungsi sistem organ pada anjing dengan sepsis: 114 kasus (2003-2007). *Jurnal Asosiasi Medis Hewan Amerika* 236, 83-87.
- Kimura, T., Toda, N., Noda, Y., Okamura, T., 2001. Mekanisme relaksasi yang disebabkan oleh angiotensin II pada kaninus terisolasi dan arteri uterina manusia. *Jurnal Farmakologi Kardiovaskular* 37, 585-595.
- Kobayashi, DL, Peterson, ME, Graves, TK, Lesser, M., Nichols, CE, 1990. Hipertensi pada kucing dengan gagal ginjal kronis atau hipertiroidisme. *Jurnal Kedokteran Penyakit Dalam Hewan* 4, 58-62.
- Kumar, A., Roberts, D., Kayu, KE, Light, B., Parrillo, JE, Sharma, S., Suppes, R., Feinstein, D., Zanotti, S., Taiberg, L., et al., 2006. Durasi hipotensi sebelum memulai terapi antimikroba yang efektif adalah penentu penting kelangsungan hidup pada syok septik manusia. *Kedokteran Perawatan Kritis* 34, 1589-1596. Lawrence-Mills, SJ, Neal, C., Satchell, S., Welsh, G., Foster, RR, Finch, N., 2022a. Memvisualisasikan glikokaliks endotel pada anjing. *Jurnal Kedokteran Hewan*, edisi ini. doi.org/10.1016/j.tvjl.2022.105844.
- Lawrence-Mills, SJ, Hezzell, MJ, Adamantos, SE, Chan, I., Borgeat, K., Payne, JR, Satchell, S., Welsh, G., Foster, RR, Finch, N., 2022b. Hialuronan yang bersirkulasi sebagai penanda kerusakan glikokaliks endotel pada anjing dengan penyakit katup mitral miksomatosus dan anjing dalam keadaan hiperkoagulasi. *Jurnal Kedokteran Hewan*, edisi ini. doi.org/10.1016/j.tvjl.2022.105845.
- Lees, GE, Cianciolo, RE, Clubb Jr., FJ, 2011. Biopsi ginjal dan evaluasi patologi dari penyakit glomerulus. *Topik dalam Pengobatan Hewan Pendamping* 26, 143-153.
- Lewis, EJ, Lewis, JB, Greene, T., Hunsicker, LG, Berl, T., Pohl, MA, de Zeeuw, D., Heerspink, HL, Rohde, RD, Atkins, RC, et al., 2011. Sulodexide untuk perlindungan ginjal pada pasien diabetes tipe 2 dengan mikroalbuminuria: uji coba terkontrol secara acak. *Jurnal Penyakit Ginjal Amerika* 58, 729-736.
- Li, Q., Bolli, R., Qiu, Y., Tang, XL, Murphree, SS, Francis, BA, 1998. Terapi pada dengan superoksida dismutase ekstraseluler melemahkan pemingsanan miokard pada kelinci yang sadar. *Sirkulasi* 98, 1438-1448.
- London, LB, Bowen, CM Buckley, GJ., 2018. Evaluasi glikokaliks endotel pada anjing sehat yang dibius menggunakan perangkat lunak analisis glikocheck sisi pasien yang cepat. Dalam: *Prosiding Simposium Darurat dan Perawatan Kritis Hewan Internasional, Kongres Tahunan Perawatan Kritis dan Darurat Hewan Eropa, dan Konferensi Trauma dan Perawatan Kritis VetCOT VetCOT, New Orleans, LA, AS, hlm. 17.*
- Lortat-Jacob, H., Baltzer, F., Grimaud, JA, 1996. Heparin menurunkan pembersihan darah interferon-gamma dan meningkatkan aktivitasnya dengan membatasi pemrosesan urutan terminal karboksilnya. *Jurnal Kimia Biologi* 271, 16139-16143. Luft, JH, 1966. Struktur halus dari lapisan kapiler dan endokapiler seperti yang diungkapkan oleh rutenium merah. *Prosiding Federasi* 25, 1773-1783.
- Mansour, C., Chaaya, R., Sredensek, J., Mocci, R., Santangelo, B., Allaouchiche, B., Bonnet-Garin, JM, Boselli, E., Junot, SA, 2021. Evaluasi mikrosirkulasi sublingual dengan mikroskop video lapangan gelap sidestream pada kuda yang dibius untuk prosedur elektif atau operasi usus. *American Journal of Veterinary Research* 82, 574-581.
- Marino, CL, Lascelles, BD, Vaden, SL, Gruen, ME, Marks, SL, 2014. Prevalensi dan klasifikasi penyakit ginjal kronis pada kucing yang dipilih secara acak dari empat kelompok umur dan pada kucing yang direkrut untuk studi penyakit sendi degeneratif. *Jurnal Kedokteran dan Bedah Kucing* 16, 465-472.
- Martens, RJ, Vink, H., van Oostenbrugge, RJ, Staals, J., 2013. Sublingual dimensi glikokaliks mikrovaskular pada pasien stroke lakunar. *Penyakit Serebrovaskular* 35, 451-454.
- Martin, L., Koczera, P., Zechendorf, E., Schuerholz, T., 2016. Glikokaliks endotel: Pendekatan diagnostik dan terapeutik baru pada sepsis. *Biomed Research International* 2016, 3758278.
- Marynissen, SJ, Smets, PM, Ghys, LF, Paepe, D., Delanghe, J., Galac, S., Meyer, E., Lefebvre, HP, Daminet, S., 2016. Jangka panjang tidak lanjut dari fungsi ginjal menilai serum cystatin C pada anjing dengan diabetes mellitus atau hyperadrenocorticism. *Patologi Klinis Hewan* 45, 320-329.
- Matsushita, K., van der Velde, M., Astor, BC, Woodward, M., Levey, AS, de Jong, PE, Coresh, J., Gansevoort, RT, 2010. Asosiasi perkiraan laju filtrasi glomerulus dan albuminuria dengan semua penyebab dan mortalitas kardiovaskular pada kohort populasi umum: meta-analisis kolaboratif. *Lancet* 375, 2073-2081. McCarron, RM, Wang, L., Sirene, AL, Spatz, M., Hallenbeck, JM, 1994. Monosit adhesi ke sel endotel serebrovaskular yang berasal dari tikus hipertensi dan normotensif. *Jurnal Fisiologi Amerika* 267, H2491-H2497. Meerschaert, J., Furie, MB, 1995. Molekul adhesi yang digunakan oleh monosit untuk migrasi melintasi endotel termasuk CD11a/CD18, CD11b/CD18, dan VLA-4 on

- monosit dan ICAM-1, VCAM-1, dan ligan lain pada endotelium. *Jurnal Imunologi* 154, 4099–4112.
- Mennander, AA, Shalaby, A., Oksala, N., Leppänen, T., Hämäläinen, M., Huovinen, S., Zhao, F., Moilanen, E., Tarkka, M., 2012. Diazoksida dapat melindungi integritas glikokaliks endotel selama pencangkakan bypass arteri koroner. *Jurnal Kardiovaskular Skandinavia J* 46, 339–344.
- Meyer, W., Godynicki, S., Tsukise, A., 2008. Histokimia lektin dari endotelium pembuluh darah di integumen mamalia, dengan catatan tentang glikokaliks endotel dan nomenklatur sistem pembuluh darah. *Sejarah Anatomi* 190, 264–276.
- Mochizuki, S., Vink, H., Hiramatsu, O., Kajita, T., Shiget, F., Spaan, JA, Kajiji, F., 2003. Peran glikosaminoglikan asam hialuronat dalam pelepasan oksida nitrat turunan endotel yang diinduksi geser. *Jurnal Fisiologi Amerika-Jantung dan Peredaran Darah* 285, H722–H726.
- Montealegre, F., Lyons, BM, 2021. Terapi cairan pada anjing dan kucing dengan sepsis. *Perbatasan dalam Ilmu Kedokteran Hewan* 8, 622127.
- Mouncey, PR, Osborn, TM, Power, GS, Harrison, DA, Sadique, MZ, Berduka, RD, Jahan, R., Tan, JC, Harvey, SE, Bell, D., et al., 2015. Manajemen Protokol pada Sepsis (ProMISE): uji coba terkontrol acak multisenter dari efektivitas klinis dan efektivitas biaya awal, tujuan-diarahkan, resusitasi protokol untuk muncul syok septik. *Penilaian Teknologi Kesehatan* 19 i-xxv, 1-150. Mulivor, AW, Lipowsky, HH, 2004. Pelepasan yang diinduksi oleh inflamasi dan iskemia glikokaliks vena. *Jurnal Fisiologi Amerika-Jantung dan Peredaran Darah* 286, H1672–H1680.
- Mulivor, AW, Lipowsky, HH, 2009. Penghambatan pelepasan glikan dan leukosit-adhesi endotel di vena postcapillary dengan penekanan aktivitas matriksmetaloprotease dengan doksisisiklin. *Mikrosirkulasi* 16, 657–666. Mullen, KM, Regier, PJ, Londoño, LA, Millar, K., Groover, J., 2020. Evaluasi mikrovaskular jejunum anjing sehat yang dibius dengan mikroskop video lapangan gelap sidestream. *American Journal of Veterinary Research* 81, 888–893.
- Naseri, A., Gulersoy, E., Ider, M., Durgut, MK, Erturk, A., Avci, C., Koral, E., Sevinc, M., Ok, M., 2020. Biomarker serum cedera glikokaliks endotel pada infeksi parvoviral anjing. *Jurnal Ilmu Kedokteran Hewan Australia* 52.
- Nelson, A., Berkestedt, I., Schmidtchen, A., Ljunggren, L., Bodellsson, M., 2008. Meningkatkan tingkat glikosaminoglikan selama syok septik: kaitannya dengan kematian dan tindakan antibakteri plasma. *Kejut* 30, 623–627.
- Nieuwendorp, M., Meuwese, MC, Mooij, HL, van Lieshout, MH, Hayden, A., Levi, M., Meijers, JC, Ince, C., Kastelein, JJ, Vink, H., et al., 2009. Penghambatan faktoralfa nekrosis tumor melindungi terhadap gangguan glikokaliks endotel yang diinduksi oleh endotoksin. *Aterosklerosis* 202, 296–303.
- Oliveira, MA, Ferreira, LC, Zuccari, DA, Brandi, AC, Santos, CA, Botelho, PH, Petrucci, O., Braile, DM, 2014. Perbandingan larutan histidin-triptofanalfacetoglutarat dengan histidin-triptofan-glutamat sebagai agen kardioplegik pada jantung tikus yang terisolasi: Sebuah studi imunohistokimia. *Jurnal Bedah Kardiovaskular Brasil* 29, 83–88.
- Oltean, S., Qiu, Y., Ferguson, JK, Stevens, M., Neal, C., Russell, A., Kaura, A., Arkill, K. P., Harris, K., Symonds, C., et al., 2015. Faktor pertumbuhan endotel vaskular-165b bersifat protektif dan mengembalikan glikokaliks endotel pada nefropati diabetik. *American Society of Nephrology* 26, 1889–1904.
- O'Neill, DG, Elliott, J., Gereja, DB, McGreevy, PD, Thomson, PC, Brodbelt, DC, 2013. Penyakit ginjal kronis pada anjing di praktik kedokteran hewan Inggris: Prevalensi, faktor risiko, dan kelangsungan hidup. *Jurnal Kedokteran Penyakit Dalam Hewan* 27, 814–821. Bawag, KL, Gamez, M., Buckner, NR, Baker, SL, Betteridge, KB, Desideri, S., Dallyn, BP, Ramnath, RD, Neal, CR, Farmer, LK, et al., 2019. VEGFC mengurangi permeabilitas albumin glomerulus dan melindungi terhadap perubahan ekspresi reseptor VEGF pada nefropati diabetik. *Diabetes* 68, 172–187.
- Ortega, TM, Feldman, EC, Nelson, RW, Willits, N., Cowgill, LD, 1996. Sistemik tekanan darah arteri dan rasio protein/kreatinin urin pada anjing dengan hiperadrenocorticism. *Jurnal Asosiasi Kedokteran Hewan Amerika* 209, 1724–1729.
- Packham, DK, Wolfe, R., Reutens, AT, Berl, T., Heerspink, HL, Rohde, R., Ivory, S., Lewis, J., Raz, I., Wiegmann, TB, et al., 2012. Sulodexide gagal menunjukkan renoprotection pada nefropati diabetes tipe 2 yang nyata. *Jurnal American Society of Nephrology* 23, 123–130.
- Padberg, JS, Wiesinger, A., di Marco, GS, Reuter, S., Grabner, A., Kentrup, D., Lukasz, A., Oberleithner, H., Pavenstadt, H., Brand, M., et al., 2014. Kerusakan glikokaliks endotel pada penyakit ginjal kronis. *Aterosklerosis* 234, 335–343.
- Pelander, L., Ljungvall, I., Egenvall, A., Syme, H., Elliott, J., Häggström, J., 2015. Insiden dan kematian akibat penyakit ginjal pada lebih dari 600.000 anjing Swedia yang diasuransikan. *Catatan Kedokteran Hewan* 176, 656.
- Pouska, J., Tegl, V., Astapenko, D., Cerny, V., Lehmann, C., Benes, J., 2018. Dampak dari cairan intravena tantangan waktu infus pada makrosirkulasi dan glikokaliks endotel pada pasien bedah dan sakit kritis. *BioMed Research International* 2018, 8925345.
- Pries, AR, Secomb, TW, Sperandio, M., Gaehtgens, P., 1998. Resistensi aliran darah selama hemodilusi: efek komposisi plasma. *Penelitian Kardiovaskular* 37, 225–235.
- Pries, AR, Secomb, TW, Gaehtgens, P., 2000. Lapisan permukaan endotel. *Eropa Jurnal Fisiologi* 440, 653–666.
- Purushothaman, A., Uyama, T., Kobayashi, F., Yamada, S., Sugahara, K., Rapraeger, AC, Sanderson, RD, 2010. Pelepasan syndecan-1 yang ditingkatkan oleh heparanase oleh sel myeloma mendorong invasi endotel dan angiogenesis. *Darah* 115, 2449–2457. Ramnath, RD, Butler, MJ, Newman, G., Desideri, S., Russell, A., Lay, AC, Neal, CR, Qui, Y., Fawaz, S., Onions, KL, et al., 2020. Memblokir pelepasan syndecan-4 matriks yang dimediasi metalloproteinase mengembalikan glikokaliks endotel dan fungsi penghalang filtrasi glomerulus pada penyakit ginjal diabetes awal. *Ginjal Internasional* 97, 951–965.
- Rehm, M., Haller, M., Orth, V., Kreimeier, U., Jacob, M., Dressel, H., Mayer, S., Brechtelsbauer, H., Finsterer, U., 2001. Perubahan volume darah dan hematokrit selama pembebanan volume pra operasi akut dengan albumin 5% atau larutan hetastarch 6% pada pasien sebelum histerektomi radikal. *Anestesiologi* 95, 849–856. Rehm, M., Bruegger, D., Kristus, F., Conzen, P., Thiel, M., Jacob, M., Chappell, D., Stoeckelhuber, M., Welsch, U., Reichart, B., 2007. Penumpahan glikokaliks endotel pada pasien yang menjalani operasi vaskular besar dengan iskemia global dan regional. *Sirkulasi* 116, 1896–1906.
- Rhodes, A., Evans, LE, Alhazzani, W., Levy, MM, Antonelli, M., Ferrer, R., Kumar, A., Sevransky, JE, Sprung, CL, Nunnally, ME, et al., 2017. Surviving Sepsis Campaign: Pedoman internasional untuk manajemen sepsis dan syok septik: 2016. *Pengobatan Perawatan Intensif* 43, 304–377.
- Roussel, F., Dalion, J., 1988. Lektin sebagai penanda sel endotel: Studi banding antara sel manusia dan sel hewan. *Lab Hewan* 22, 135–140.
- Salmon, AH, Neal, CR, Sage, LM, Glass, CA, Harper, SJ, Bates, DO, 2009. Angiopietin-1 mengubah koefisien permeabilitas mikrovaskular in vivo melalui modifikasi glikokaliks endotel. *Penelitian Kardiovaskular* 83, 24–33. Santos-Parker, JR, Strahler, TR, Bassett, CJ, Bispham, NZ, Chonchol, MB, Seals, D. R., 2017. Suplementasi kurkumin meningkatkan fungsi endotel vaskular pada orang dewasa paruh baya dan lanjut usia yang sehat dengan meningkatkan bioavailabilitas oksida nitrat dan mengurangi stres oksidatif. *Penuaan (Albany Nyomda)* 9, 187–208.
- Schillaci, G., Pirro, M., Gemelli, F., Pasqualini, L., Vaudo, G., Marchesi, S., Siepi, D., Bagaglia, F., Mannarino, E., 2003. Peningkatan konsentrasi protein C-reaktif pada hipertensi yang tidak pernah diobati: Peran tekanan sistolik dan nadi. *Jurnal Hipertensi* 21, 1841–1846.
- Schmid-Schönbein, GW, Seiffge, D., DeLano, FA, Shen, K., Zweifach, BW, 1991. Jumlah leukosit dan aktivasi pada tikus hipertensi dan normotensif spontan. *Hipertensi* 17, 323–330.
- Schmidt, EP, Yang, Y., Janssen, WJ, Gandjeva, A., Perez, MJ, Barthel, L., Zemans, R. L., Bowman, JC, Koyanagi, DE, Yunt, ZX, 2012. Glikokaliks endotel paru mengatur adhesi neutrofil dan cedera paru selama syok septik eksperimental. *Pengobatan Alam* 18, 1217–1223.
- Schmidt, EP, Overdier, KH, Sun, X., Lin, L., Liu, X., Yang, Y., Ammons, LA, Hiller, T. D., Sufliya, MA, Yu, Y., et al., 2016. Glikosaminoglikan urin memprediksi hasil pada syok septik dan sindrom gangguan pernapasan akut. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 194, 439–449.
- Schulte, BA, Spicer, SS, 1983. Evaluasi histokimia ginjal tikus dan tikus dengan konjugat lektin-lobak peroksidase. *Jurnal Anatomi Amerika* 168, 345–362.
- Segura, J., Ruilope, LM, Rodicio, JL, 2004. Mikroalbuminuria. *Klinis dan Hipertensi ES* 16, 701–707.
- Seidemann, SB, Claggett, B., Cheng, S., Henglin, M., Shah, A., Steffen, LM, Folsom, A. R., Rimm, EB, Willett, WC, Solomon, SD, 2018. Asupan karbohidrat diet dan kematian: studi kohort prospektif dan meta-analisis. *Kesehatan Masyarakat Lancet* 3, e419–e428.
- Seki, M., Asano, K., Sakai, M., Kanno, N., Teshima, K., Edamura, K., Tanaka, S., 2010. Asam hialuronat serum pada anjing dengan pirau portosistemik bawaan. *Jurnal Praktek Hewan Kecil* 51, 260–263.
- Sharon, N., Lis, H., 2004. Sejarah lektin: Dari hemagglutinin ke biologis molekul pengenalan. *Glikobiologi* 14, 53r–62r.
- Shaw, KE, Bersenas, AM, Bateman, SW, Blois, SL, Gieue, LS, Wood, RD, 2021. Gunakan asam hialuronat serum sebagai biomarker degradasi glikokaliks endotel pada anjing dengan peritonitis septik. *Jurnal Penelitian Amerika* 82, 566–573. Penyanyi, M., Deutschman, CS, Seymour, CW, Shankar-Hari, M., Annane, D., Bauer, M., Bellomo, R., Bernard, GR, Chiche, JD, Coopersmith, CM, et al., 2016. Definisi Konsensus Internasional Ketiga untuk sepsis dan syok septik (Sepsis-3). *Jurnal Asosiasi Medis Amerika* 315, 801–810.
- Singh, A., Satchell, SC, 2011. Mikroalbuminuria: penyebab dan implikasi. *anak Nefrologi* 26, 1957–1965.
- Singh, A., Satchell, SC, Neal, CR, McKenzie, EA, Tooke, JE, Mathieson, PW, 2007. Glikokaliks endotel glomerulus merupakan penghalang permeabilitas protein. *Jurnal American Society of Nephrology* 18, 2885–2893. Smart, L., 2016. Kerusakan glikokaliks pada sepsis Dalam: *Dokter Hewan Internasional ke-22 Simposium Perawatan Darurat dan Kritis, Grapevine, TX, USA.*
- Smart, L., Boyd, CJ, Claus, MA, Bosio, E., Hosgood, G., Raisis, A., 2018. Volume besar cairan kristaloid dikaitkan dengan peningkatan penumpahan hialuronan dan peradangan pada model syok hemoragik anjing. *Peradangan* 41, 1515–1523.
- Steppan, J., Hofer, S., Funke, B., Brenner, T., Henrich, M., Martin, E., Weitz, J., Hofmann, U., Weigand, MA, 2011. Sepsis dan operasi perut besar menyebabkan pengelupasan glikokaliks endotel. *Jurnal Penelitian Bedah* 165, 136–141. Stulc, T., Vrablik, M., Kasalová, Z., Marinov, I., Svobodová, H., Ceska, R., 2008. Leukosit dan molekul adhesi endotel pada pasien dengan hiperkolesterolemia: Efek pengobatan atorvastatin. *Penelitian Fisiologis* 57, 185–194.
- Torres, LN, Sondeen, JL, Ji, L., Dubick, MA, Torres Filho, I., 2013. Evaluasi cairan resusitasi pada glikokaliks endotel, aliran darah venular, dan fungsi koagulasi setelah syok hemoragik pada tikus. *Jurnal Bedah Trauma dan Perawatan Akut* 75, 759–766.
- Uchino, S., Bellomo, R., Morimatsu, H., Sugihara, M., Prancic, C., Stephens, D., Wendon, J., Honore, P., Mulder, J., Turner, A., 2006. Kateter arteri pulmonal versus analisis kontur nadi: Sebuah studi epidemiologi prospektif. *Jurnal Perawatan Kritis* 10, R174.
- Ueda, A., Shimomura, M., Ikeda, M., Yamaguchi, R., Tanishita, K., 2004. Pengaruh glycolyx pada serapan albumin yang bergantung pada geser dalam sel endotel. *American Journal of Physiology: Fisiologi Jantung dan Peredaran Darah* 287, H2287–H2294.

- Ueno, M., Sakamoto, H., Tomimoto, H., Akiguchi, I., Onodera, M., Huang, CL, Kanenishi, K., 2004. Penghalang darah-otak terganggu di hippocampus tikus dewasa muda secara spontan hipertensi. *Acta Neuropathologica* 107, 532-538.
- Veraldi, N., Guerrini, M., Urso, E., Risi, G., Bertini, S., Bensi, D., Bisio, A., 2018. Baik karakterisasi struktural sulodeksida. *Jurnal Analisis Farmasi dan Biomedis* 156, 67-79
- Vink, H., Duling, BR, 1996. Identifikasi domain luminal yang berbeda untuk makromolekul, eritrosit, dan leukosit dalam kapiler mamalia. *Penelitian Sirkulasi* 79, 581-589.
- Vlahu, CA, Lemkes, BA, Struijk, DG, Koopman, MG, Krediet, RT, Vink, H., 2012b. Kerusakan glikokaliks endotel pada pasien dialisis. *Jurnal Masyarakat Nefrologi Amerika* 23, 1900-1908.
- Xia, F., Liu, G., Shi, Y., Zhang, Y., 2015. Dampak mikroalbuminuria pada insiden penyakit jantung koroner, kardiovaskular dan semua penyebab kematian: Sebuah meta-analisis studi prospektif. *Jurnal Internasional Kedokteran Klinis dan Eksperimental* 8, 1-9.
- Yabuki, A., Mitani, S., Mizukami, K., Yamato, O., 2012. Identifikasi segmen nefron pada ginjal anjing normal dengan menggunakan histokimia lektin. *Penelitian dalam Ilmu Kedokteran Hewan* 93, 560-564.
- Yang, CY, Huynh, T., Johnson, M., Gong, H., 2014. Lapisan glikokaliks endotel di jalur aliran air mata sapi dan manusia. *Penelitian Mata Eksperimental* 128, 27-33.
- Yini, S., Heng, Z., Xin, A., Xiaochun, M., 2015. Pengaruh heparin tak terfraksi pada glikokaliks endotel dalam model syok septik. *Journal of the Scandinavian Society of Anesthesiology and Intensive Care Medicine* 59, 160-169.
- Yozova, ID, London, LA, Millar, KK, Sano, H., Weidgraaf, K., Thomson, NA, Munday, JS, 2021. Evaluasi sisi pasien yang cepat dari ketebalan glikokaliks endotel pada kucing yang dibius sehat menggunakan perangkat lunak Glycocheck. *Perbatasan dalam Ilmu Kedokteran Hewan* 8, 727063.
- Zdolsek, M., Hahn, RG, Sjöberg, F., Zdolsek, JH, 2020. Ekspansi volume plasma dan kebocoran kapiler albumin 20% pada pasien luka bakar dan sukarelawan. *Perawatan Kritis* 24, 191.



Daftar isi tersedia di [SainsLangsung](#)

Jurnal Kedokteran Hewan

beranda jurnal: www.elsevier.com/locate/tvj



Dinamika *Mycoplasma bovis* di peternakan sapi perah Belanda selama wabah klinis akut

PM Penterman^a, M. Holzhauser^b, E. van Engelen^b, D. Smits^c, AGJ Velthuis^{c,d}

^aDepartemen Kesehatan Ruminansia, GD Animal Health, PO Box 9, 7400 AA Deventer, Belanda

^bDepartemen Penelitian dan Pengembangan, GD Animal Health, PO Box 9, 7400 AA Deventer, Belanda

^cDepartemen Bakteriologi, Interaksi Host-Patogen & Pengembangan Diagnostik, Penelitian BioVeteriner Wageningen, PO Box 65, 8200 AB Lelystad, Belanda

^dManajemen Kesehatan Bovine, Aeres University of Applied Sciences, PO box 374, 8250 AJ, Dronen, Belanda

INFO ARTIKEL

Kata kunci:

Ternak
M. bovis
Mycoplasma bovis
Dinamika pertanian
Penularan

ABSTRAK

Mycoplasma bovis (*M. bovis*) dapat menyebabkan penyakit serius pada sapi, seperti radang sendi dan mastitis pada sapi perah dan pneumonia, radang sendi dan otitis media pada anak sapi. Penelitian ini bertujuan untuk memberikan wawasan tentang dinamika *M. bovis* dalam ternak sapi perah, mengalami wabah akut pada sapi perah. Dua puluh peternakan diikuti dengan pengujian laboratorium terhadap sapi perah yang dicurigai. Setiap peternakan wabah diambil sampelnya lima kali, pada interval 2-3 minggu, pengambilan sampel darah dan susu dan cairan konjungtiva dari sapi perah yang dicurigai secara klinis dan hewan sehat dari tiga kelompok umur yang berbeda: sapi perah, ternak muda (7-24 bulan) dan anak sapi (1-6 bulan). Selain itu, susu tangki curah diambil sampelnya setiap kunjungan dan sampel lingkungan diambil pada kunjungan pertama dan terakhir. Kehadiran dari *M. bovis* diuji dengan mengevaluasi titer antibodi dalam darah, DNA bakteri dalam cairan konjungtiva dan sampel lingkungan dan bakteri hidup dalam sampel susu. Semua data dianalisis menggunakan model regresi logistik, dikoreksi untuk pengambilan sampel berulang dan korelasi dalam kawanan.

Enam puluh persen (12/20) dari ternak menunjukkan kombinasi radang sendi dan mastitis, sementara ternak lainnya hanya mengalami mastitis klinis (20/3) atau radang sendi (20/5). Sejak wabah dikonfirmasi, *M. bovis* infeksi tidak hanya terjadi pada sapi perah, tetapi juga pada ternak muda dan anak sapi (80% dari peternakan). Tes laboratorium juga mengkonfirmasi adanya *M. bovis* pada hewan yang sehat. Itu *M. bovis* tingkat PCR anak sapi dan anakan sangat berkorelasi pada semua kunjungan ($r_{total}=0.81, P < 0.01$). Lebih-lebih lagi, *M. bovis* hadir di lingkungan hewan. Pada akhir periode studi 3 bulan, tidak satu pun dari 20 peternakan wabah klinis yang *M. bovis*-negatif, berdasarkan pengujian laboratorium, meskipun hampir tidak ada kasus klinis yang diamati pada waktu itu.

1. Perkenalan

Mycoplasma bovis (*M. bovis*) dapat menyebabkan penyakit serius pada sapi, antara lain arthritis, mastitis, pneumonia dan gangguan reproduksi pada sapi perah (Maunsell dkk., 2011; Haapala dkk., 2018; Hazelton dkk., 2018) dan pneumonia, arthritis dan otitis pada betis (Maunsell dan Donovan, 2009). *Mikoplasmasp.* dapat hadir dalam mikrobioma saluran pernapasan bagian atas (Lima et al., 2016) dan mungkin ada dalam air mani sapi jantan dan dalam vagina sapi perah (Haapala dkk., 2018; Hazelton dkk., 2020). Tidak semua hewan yang terinfeksi menunjukkan gejala klinis; pembawa asimtomatik dapat melepaskan patogen untuk waktu yang lama (Nicholas dkk., 2016; Punyapornwithaya dkk., 2010; Wilson dkk., 2007). *M. bovis* bakteri dapat dideteksi dengan kultur mikrobiologi (misalnya, susu) dan metode reaksi berantai polimerase (PCR) (misalnya konjungtiva

penyeka). Tes imunoserben terkait-enzim tidak langsung (ELISA) menunjukkan adanya antibodi yang ditujukan terhadap *M. bovis* dalam, misalnya, sampel serum dan susu. Ketiga metode diagnostik ini direkomendasikan untuk penggunaan pelengkap karena semua menunjukkan keterbatasan (Parker dkk., 2018). Faktor-faktor seperti adanya infeksi sub-klinis dan pelepasan intermiten juga memperumit diagnosis. Oleh karena itu pengambilan sampel individu yang berulang direkomendasikan untuk meningkatkan kemungkinan *M. bovis* deteksi pada hewan yang terinfeksi secara klinis dan sub-klinis (Hazelton dkk., 2018; Parker dkk., 2018; Petersen dkk., 2018).

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk memberikan wawasan baru tentang dinamika *M. bovis* penularan antara dan di dalam kelompok umur pada ternak sapi perah yang mengalami wabah klinis akut pada sapi perah.

* Penulis yang sesuai.

Alamat email: p.penterman@gdanimalhealth.com (PM Penterman).

<https://doi.org/10.1016/j.tvj.2022.105841>

Diterima 23 April 2021; Diterima dalam bentuk revisi 30 April 2022; Diterima 30 April 2022

Tersedia online 11 Mei 2022

1090-0233/© 2022 Para Penulis. Diterbitkan oleh Elsevier Ltd. Ini adalah artikel akses terbuka di bawah lisensi CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

2. Bahan-bahan dan metode-metode

Antara Februari 2016 dan April 2017, GD Animal Health (GD) melakukan studi longitudinal di mana kohort dari 20 peternakan sapi perah Belanda diikuti dengan cermat, yang mengalami gejala klinis akut. *M. bovis* wabah pada sapi perah. Penelitian dilakukan sesuai dengan Arahan 2010/63/EU tentang perlindungan hewan yang digunakan untuk tujuan ilmiah, dan persetujuan diberikan oleh Otoritas Pusat Belanda untuk Prosedur Ilmiah tentang Hewan (nomor lisensi 2015300) dan Badan Kesejahteraan Hewan GD.

2.1. Pemilihan peternakan

Praktisi diminta untuk melaporkan peternakan sapi perah dengan beberapa sapi perah dengan *M. bovis*-tanda-tanda klinis mastitis atau artritis terkait dalam periode 2 minggu, dikonfirmasi oleh hasil tes laboratorium konfirmasi untuk *M. bovis* (ELISA, PCR atau biakan dari setidaknya dua ekor sapi). Hanya peternakan yang lebih besar dari 50 sapi perah yang dimasukkan yang tidak memiliki *M. bovis* hewan yang dicurigai secara klinis dalam 12 bulan sebelumnya.

2.2. Desain studi

Peternakan wabah dikunjungi lima kali; dalam waktu seminggu setelah konfirmasi wabah (v0) dan setelah 2 (v2), 5 (v5), 8 (v8) dan 11 (v11) minggu. Sapi perah dengan gejala klinis mastitis atau artritis ('diduga secara klinis') diikutsertakan dalam penelitian, dengan maksimal lima ekor sapi per kunjungan. Hewan yang sehat secara klinis dari tiga kelompok umur (selanjutnya: 'hewan sehat') dipilih secara acak sebelum kunjungan pertama, menggunakan daftar pilihan dengan nomor acak yang dihasilkan untuk setiap hewan di peternakan ('berbentuk seragam' di Stata14/SE; StataCorp, Perangkat Lunak Statistik Stata, 2015, Rilis 14). Sapi dengan nomor seleksi terendah dipilih untuk dimasukkan dalam penelitian. Kelompok termasuk kohort maksimal 13 sapi perah yang lebih tua dari 24 bulan, 13 ekor muda antara 7 dan 24 bulan dan 10 anak sapi antara 1 dan 6 bulan dan diambil sampelnya selama setiap kunjungan. Ketika hewan mangkir karena pemusnahan, pengeringan atau melahirkan, hewan sehat yang berikutnya pada daftar seleksi atau hewan baru yang dicurigai secara klinis, dimasukkan selama kunjungan berikutnya.

Sampel dikumpulkan oleh dokter hewan terlatih sesuai dengan prosedur operasi standar. Sampel darah serum dikumpulkan dari vena coccygeal. Sampel cairan konjungtiva dari sudut mata medial kedua mata dikumpulkan dengan swab flokulasi steril kering (Eswab, Copan, Italia) dan langsung disimpan dalam media transportasi standar. Sampel lingkungan dikumpulkan dan disimpan hanya selama v0 dan v11, dengan sistem Eswab yang sama. Sampel susu komposit dari empat perempat dan BTM dikumpulkan dalam tabung steril 10-mL dan 50-mL, masing-masing. Semua sampel disimpan dingin dan segera dikirim ke laboratorium untuk analisis diagnostik.

2.3. Pemrosesan sampel di laboratorium

Sampel serum dianalisis dengan kit ELISA tidak langsung yang tersedia secara komersial untuk *M. bovis* deteksi antibodi (Diagnostik BioX K260, Rochefort, Belgia) sesuai dengan instruksi pabrik. Berdasarkan instruksi ini, hasil dilaporkan dalam enam kategori: - (tidak ada antibodi yang terdeteksi) dan 1 + hingga 5 + (meningkatkan jumlah antibodi yang terdeteksi), di mana 1 + dan 2 + dianggap sebagai respons positif yang rendah dan 3 + atau lebih tinggi sebagai respon positif yang tinggi.

M. bovis DNA dideteksi oleh PCR dalam cairan konjungtiva menggunakan PCR real-time spesifik alel yang kompetitif. Secara singkat, DNA diisolasi menggunakan ABI MagMAX™ Kit Isolasi Asam Nukleat Total pada mesin MagMax Express. Itu *M. bovis* primer spesifik adalah Fw primer 5_{kan}-GAA GGT GAC CAA GTT CAT GCT GGC AAA CTT ACC TAT CGG TGA C-3_{kan} dan Rev primer 5_{kan}-AGG CAA AGT CAT TTC TAG GTG CAA-3_{kan}. *M. bovis* DNA divisualisasikan setelah serangkaian reaksi di mana quencher dipisahkan dari fluorofor setelah itu fluorescent

sinyal diukur dengan mesin ABI-7500. *M. bovis* DNA dianggap hadir pada nilai ambang siklus (Ct) ≤ 42. Semakin rendah nilai Ct, semakin tinggi konsentrasi *M. bovis* DNA dalam sampel, dikategorikan sebagai - (Ct > 42), dan 1 + hingga 5 + (meningkatkan jumlah *M. bovis* DNA). Ct < 42: 1, Ct < 40: 2, Ct < 38: 3, Ct < 35: 4 dan Ct < 32: 5). Sampel dengan nilai Ct > 40 (kategori 1 +) dianggap di luar kisaran linieritas dan di bawah batas bawah kuantifikasi PCR; oleh karena itu, hasil ini memiliki ketidakpastian pengukuran yang lebih tinggi dan diinterpretasikan dengan hati-hati.

Untuk *Mikoplasmabudaya*, susu individu (10 µL) atau BTM (100 µL) dibagikan ke agar pleuropneumonia-like organism (PPLO), yang merupakan standar *Mikoplasmamedia* yang digunakan di banyak laboratorium. Pelat PPLO-agar yang diinokulasi diinkubasi dalam kondisi atmosfer normal tetapi kelembaban lebih tinggi (100%) selama maksimal 10 hari pada suhu 37°C. Pertumbuhan koloni mikro yang khas dinilai pada hari ke 3, 6 dan 10 dengan menggunakan mikroskop bedah.

2.4. Ukuran sampel

Ukuran sampel untuk deteksi penyakit di peternakan yang terkena dihitung dengan menggunakan asumsi berikut: rata-rata peternakan Belanda (100 sapi perah, 25 anak muda dan 15 anak); wabah di mana 20% hewan menunjukkan serokonversi (asumsi berdasarkan pengalaman sebelumnya dengan wabah di Belanda), ukuran sampel tujuan yang dihitung adalah 13 sapi perah, 13 ekor muda dan 10 anak sapi. Desain ini memastikan kemampuan untuk mendemonstrasikan transmisi *M. bovis* dengan kepercayaan 95% (WinEpi).²

2.5. Analisis statistik

Perbedaan prevalensi pada kelompok usia diperiksa sepanjang waktu menggunakan model regresi logistik. Data dikoreksi karena fakta bahwa hewan dalam peternakan yang sama lebih mirip daripada hewan di peternakan yang berbeda. Deskripsi situasi wabah per peternakan pada kunjungan pertama (v0; Tabel 1) disediakan. Tercatat di mana hewan ditempatkan pada awal infeksi (sejauh mungkin), sejauh mana hewan sehat di semua kelompok umur terinfeksi, berdasarkan ELISA, PCR dan, jika ada, hasil kultur, sejauh mana hasil tes dari hewan yang dicurigai secara klinis mengandung *M. bovis* antibodi selama penelitian dan jalur serta faktor risiko yang mungkin berperan. Semua analisis dilakukan dengan menggunakan perangkat lunak STATA/SE versi 14. Kesalahan kehadiran *M. bovis* yang ditemukan pada periode sebelumnya dimodelkan menggunakan persamaan estimasi umum (opsi yang diulang pada PROC GENMOD, SAS, versi 9.4).

3. Hasil

3.1. Statistik deskriptif

Statistik deskriptif dari 20 peternakan tercantum di Tabel 1. Dua belas dari kawanan ini (60%) mengalami mastitis dan radang sendi pada sapi perah. Lima kawanan mengalami arthritis klinis dan mastitis, sementara *M. bovis* hanya ditemukan dalam susu curah. Satu kawanan tidak mengalami mastitis selama wabah dan tiga kawanan hanya mengalami *M. bovis* mastitis terkait tanpa artritis. Dua kawanan mengalami gejala pernapasan pada sapi perah dan empat kawanan mengalami gejala pernapasan pada anak sapi.

Jumlah sapi perah yang dicurigai secara klinis per peternakan bervariasi dari 1% hingga lebih dari 10%. Peternakan tersebar di Belanda. Ukuran lahan rata-rata (minimum, maksimum) adalah 30 anak sapi (10, 129), 67

¹Lihat: Laboratory Handbook on Bovine Mastitis, NMC, 2017 halaman 119. https://www.academia.edu/50651208/Laboratory_Handbook_on_Bovine_Mastitis (Diakses 30 April 2022)

²Lihat: WinEpi: Bekerja DI Epidemiologi. <http://www.winepi.net/uk/sample/indice.htm>. (Diakses 30 April 2022).

Tabel 1

Statistik deskriptif dari 20 peternakan dengan wabah klinis akut M. bovis.

Ternak peternakan PENGENAL	M. bovis-tanda klinis terkait pada produk susu Jumlah hewan per kelompok umur (V0) sapi	Pembelian sapi selama 5 tahun sebelumnya			Rata-rata produksi susu karakteristik			
		1-6 bulan	7-24 bulan	> 24 bulan	kg susu/hari	lemak %	Protein %	
SEBUAH	SAYA	20	58	117	Ya	29.9	4.29	3.51
B	SAYA	61	97	231	Ya	23.5	4.44	3.74
C	SAYA	13	46	96	Tidak	26.6	4.33	3.49
D	SAYA	12	12	60	Tidak	22.2	4.60	3.62
E	SAYA	20	69	140	Ya	27.2	4.76	3.56
G	SAYA	14	80	123	Tidak	30.2	4.67	3.54
Saya	SAYA	129	253	572	Ya	29.3	4.37	3.53
L	SAYA	17	32	51	Tidak	30.7	4.48	3.48
N	SAYA	22	58	102	Ya	26.0	4.55	3.60
R	SAYA	40	78	254	Ya	29.6	4.32	3.47
S	SAYA	12	32	92	Tidak	28.9	4.19	3.60
T	SAYA	18	48	129	Ya	27.9	4.43	3.57
J	SAYA)	43	85	251	Ya	27.5	4,54	3.46
HAI	SAYA) a, b dan c	26	74	166	Ya	28.9	4.28	3.45
M	SAYA)	22	46	165	Ya	30.0	4.20	3.53
P	SAYA)	63	118	325	Ya	28.6	4,52	3.72
H	M	28	66	147	Tidak	25.6	4.01	3.46
F	M	18	46	143	Ya	25.9	4.49	3.48
K	M	10	17	50	Tidak	30.1	3.87	3.42
Q	SEBUAH	10	29	92	Tidak	23.2	4.49	3.65

ID, Identifikasi; V0, kunjungan pertama; A, radang sendi; M, mastitis.

sebuah Sampel susu dari masing-masing sapi dan susu curah semuanya negatif kultur (yaitu mastitis terkait M. bovis tidak ditunjukkan).

b Sampel susu individu dari semua sapi yang dicurigai M. bovis semuanya negatif, tetapi sampel susu individu dari sapi yang dipilih secara acak berbeda dan sampel BTM positif.

c Sampel susu individu semuanya negatif kultur, tetapi sampel BTM adalah kultur positif.

sapi muda (12, 253) dan 165 sapi perah (50, 572) per peternakan. Selama 5 tahun terakhir, 12 peternakan memasukkan hewan ke dalam kawanan. Rata-rata produksi susu adalah 27,6 kg susu/hari dengan kandungan lemak 4,39% dan protein 3,54%

isi.

Secara total, 116 yang dicurigai secara klinis dan 808 hewan sehat diambil sampelnya pada v0. Angka-angka ini menurun menjadi 89 yang diduga secara klinis

Meja 2

Hasil ELISA (serum) dan hasil PCR (cairan konjungtiva) dari hewan yang dicurigai secara klinis sebuah dan ternak sehat menurut kelompok umur per putaran (dikelompokkan menjadi 0 = 'negatif', 1/2 + = rendah 'positif' dan 3/4/5 + = tinggi 'positif'), termasuk jumlah sampel.

Kelompok usia	Waktu pengambilan sampel	hasil ELISA			hasil PCR			Jumlah sampel
		0	1/2 +	3/4/5 +	0	1/2 +	3/4/5 +	
Sapi yang dicurigai secara klinis:	V0	41,9%	22,6%	35,5%	34,8%	35,9%	29,3%	93
	V2	45,8%	27,7%	26,5%	38,1%	36,9%	25,0%	83
	V5	54,0%	28,7%	17,2%	71,3%	23,0%	5,7%	87
	V8	67,8%	24,1%	8,0%	71,3%	21,8%	6,9%	87
	V11	72,3%	22,9%	4,8%	81,9%	14,5%	3,6%	83
	Rata-rata	56,1%	25,2%	18,7%	59,1%	26,6%	14,3%	433
Sapi perah yang sehat	V0	52,3%	31,6%	16,2%	34,1%	41,3%	24,6%	266
	V2	57,1%	32,3%	10,5%	38,2%	43,4%	18,4%	266
	V5	65,8%	27,4%	6,8%	70,3%	24,0%	5,7%	263
	V8	74,7%	21,5%	3,8%	69,8%	20,4%	9,8%	265
	V11	80,1%	18,8%	1,1%	77,8%	18,4%	3,8%	261
	Rata-rata	65,9%	26,3%	7,7%	58,0%	29,5%	12,5%	1321
Stok muda sehat	V0	73,8%	20,7%	5,5%	66,0%	23,8%	10,2%	256
	V2	67,8%	27,1%	5,1%	71,4%	21,2%	7,5%	255
	V5	76,5%	16,9%	6,7%	81,6%	11,8%	6,7%	255
	V8	80,0%	17,3%	2,7%	76,5%	17,6%	5,9%	255
	V11	81,3%	16,8%	2,0%	80,1%	14,1%	5,9%	256
	Rata-rata	75,9%	19,7%	4,4%	75,1%	17,7%	7,2%	1277
Anak sapi yang sehat	V0	76,5%	18,7%	4,8%	43,3%	33,2%	23,5%	187
	V2	70,7%	23,9%	5,4%	55,4%	29,9%	14,7%	184
	V5	70,7%	25,5%	3,7%	73,4%	19,1%	7,4%	188
	V8	60,8%	34,4%	4,8%	71,4%	22,2%	6,3%	189
	V11	58,0%	36,7%	5,3%	75,0%	18,6%	6,4%	188
	Rata-rata	67,3%	27,9%	4,8%	63,8%	24,6%	11,6%	936
Sapi sehat (total)	V0	66,4%	24,3%	9,3%	48,1%	32,8%	19,1%	709
	V2	64,5%	28,2%	7,2%	54,7%	31,9%	13,5%	705
	V5	71,0%	23,1%	5,9%	75,2%	18,3%	6,5%	706
	V8	72,9%	23,4%	3,7%	72,6%	19,9%	7,5%	709
	V11	74,6%	22,8%	2,6%	77,9%	16,9%	5,2%	705
	Rata-rata	69,9%	24,4%	5,7%	65,7%	23,9%	10,4%	3534

V, nomor kunjungan, misalnya V0, kunjungan pertama dll.

sebuah 90% dari hewan yang dicurigai secara klinis adalah sapi perah (388/433 sampel).

hewan dan 784 sehat pada v11, terutama karena pemindahan sapi. Total 9625 sampel dikumpulkan dan hewan diambil sampelnya rata-rata 4,3 kali untuk darah dan cairan konjungtiva dan 3,7 kali untuk susu.

3.1.1. Penularan *Mycoplasma bovis* dalam kelompok umur dari waktu ke waktu Sejak wabah dikonfirmasi, *M. bovis* infeksi tidak hanya terjadi pada sapi perah, tetapi juga pada ternak muda dan anak sapi (80% dari peternakan).

3.1.2. Sapi perah

Pada v0, 58,1% dari yang dicurigai secara klinis dan 47,8% dari sapi perah sehat adalah ELISA-positif (1 + 5 +; Meja 2). Respon serologis menurun dari waktu ke waktu baik pada sapi yang dicurigai secara klinis maupun sapi yang sehat (Gambar 1A), tetapi tidak mencapai nol. Seroprevalensi turun dari waktu ke waktu (v5 ke v11) dari 45,9% menjadi 27,7% untuk dugaan klinis dan dari 34,2% menjadi 19,9% untuk sapi perah yang sehat (Meja 2). Penurunan ini paling tinggi pada kelompok dengan reaksi terkuat (>2+). Dalam sapi perah, tingkat ELISA berkorelasi dalam tiga kunjungan berturut-turut sementara pada kelompok umur yang tersisa, tingkat ELISA berkorelasi tinggi dalam dua kunjungan berturut-turut.

Secara keseluruhan, sedikit penurunan dalam tes 'positif' PCR terlihat pada tiga kunjungan pertama, diikuti oleh sedikit peningkatan antara v5 dan v8 (Gambar 1SEBUAH). Pada v0, 65,2% dan 65,9% sapi perah yang dicurigai secara klinis dan sehat, masing-masing diuji 'positif' untuk adanya *M. bovis* DNA dalam cairan konjungtiva (Meja 2). Di antara sapi yang sehat, angka ini menurun menjadi 29,7% pada v5 dan 22,2% pada v11 (Meja 2). Persentase hasil 'positif' pada v0 lebih tinggi pada sapi daripada pada anakan dan anak sapi, tetapi prevalensinya sebanding untuk semua kelompok umur pada v11. Sebagian besar sampel pada v11 mengandung kadar rendah (1 +, 2 +) dari

M. bovis DNA kemungkinan besar merupakan cerminan dari rendahnya tingkat *M. bovis* DNA di lingkungan peternakan. Jumlah positif rendah yang sama diamati ketika membandingkan sapi yang dicurigai secara klinis dan sehat ($P=0,40$). PCR 'positif' yang lebih kuat (3 +, 4 + atau 5 +) lebih sering ditunjukkan pada hewan yang dicurigai secara klinis (14,3%) dibandingkan dengan hewan yang sehat (10,4%; $P=0,03$). Seperti halnya serologi, persentase responden yang kuat (>2 +) menunjukkan penurunan paling tajam dari waktu ke waktu, sebuah temuan juga diamati pada kelompok lain. Korelasi antara tingkat PCR pada periode pengambilan sampel berturut-turut dalam kelompok usia minimal.

3.1.3. Stok muda

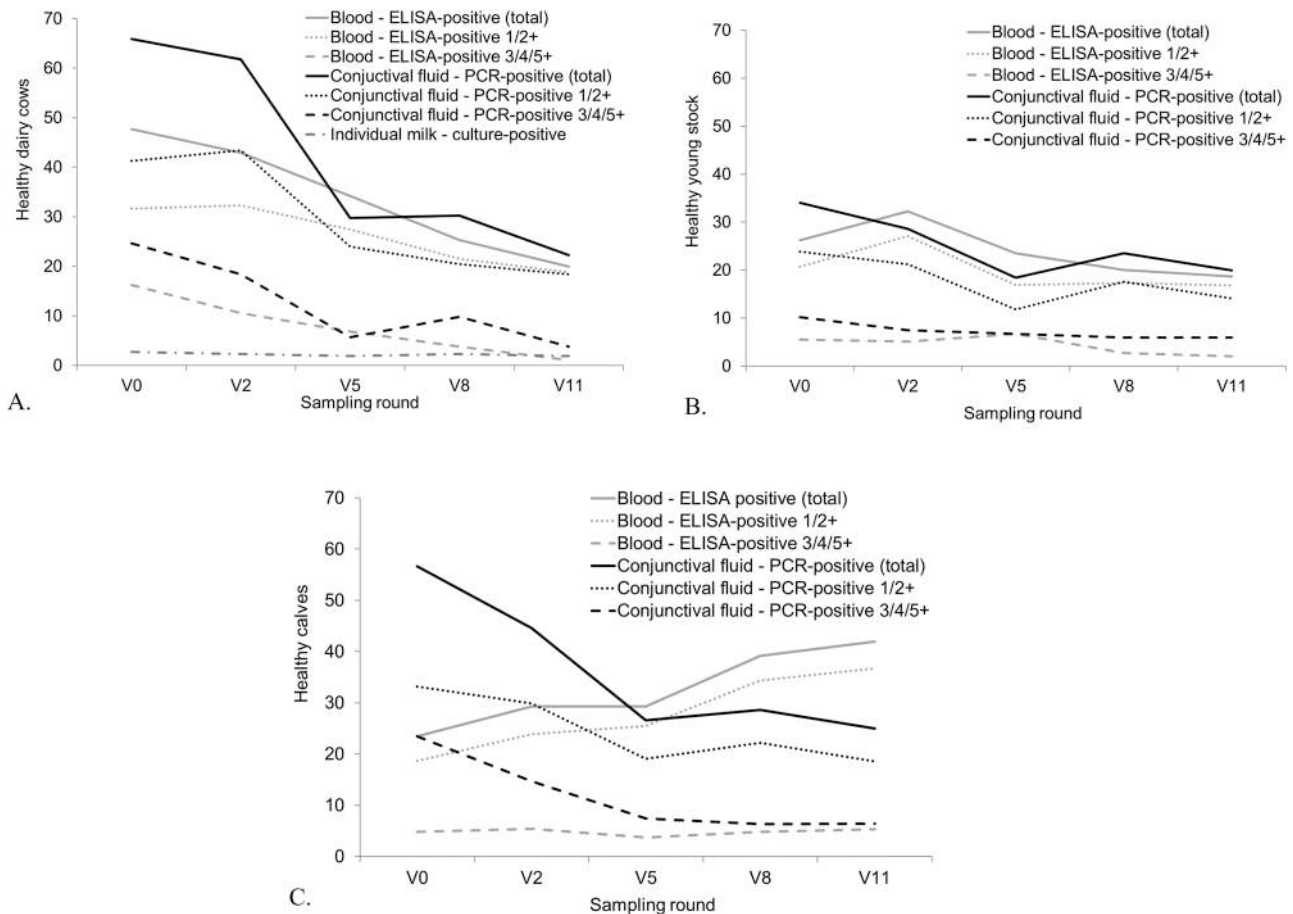
Stok muda menunjukkan pada v0 seroprevalensi 26,2%, yang meningkat menjadi 32,2% pada v2 dan menurun menjadi 18,7% pada v11. Prevalensi PCR cairan konjungtiva positif pada stok muda adalah 34,0% pada v0 dan menurun menjadi 20,0% pada v11 (Meja 2 dan Gambar 1B).

3.1.4. betis

Rata-rata, 32,7% pedet menunjukkan respons serologis yang meningkat dari 23,5% (v0) menjadi 42,0% (v11). Peningkatan nyata menjadi 39,2% terjadi pada v8 terutama karena meningkatnya jumlah positif rendah (<2 +) sampel (Meja 2). Persentase sampel cairan konjungtiva positif PCR menunjukkan pola yang berbeda dari waktu ke waktu. Pada v0, 56,7% pedet sehat positif PCR turun menjadi 25,0% pada v11 (Gambar 1C).

3.2. Penularan *Mycoplasma bovis* antar kelompok umur dari waktu ke waktu

Respon serologis sapi perah, ternak muda dan anak sapi tidak berkorelasi dalam peternakan pada berbagai waktu sampel, tetapi



Gambar 1.A - CM. *bovis* prevalensi pada sapi perah sehat (A), ternak muda (B) dan pedet (C) di peternakan wabah berdasarkan ELISA (serum), PCR (cairan konjungtiva) dan, jika berlaku, kultur (sampel susu individu). V, nomor kunjungan misalnya, V0, kunjungan pertama, V2, kunjungan pada minggu ke-2, dst.

Tabel 3 Hasil uji PCR Mycoplasma bovis sampel lingkungan pada v0 dan v11, dikelompokkan berdasarkan peternakan dan kelompok umur. Angka 0-5 menunjukkan jumlah DNA *M. bovis* yang terdeteksi (0 = 'negatif', 1/2 = rendah, positif dan 3/4/5 = tinggi 'positif').

Ternak/peternak	Waktu pengambilan sampel v11														
	- Minum ember betis	- Air palung betis 1-6 bulan	- Air palung stok muda 7-12 bln.	- Air palung stok muda 12-24 bln.	- Air palung sapi perah	- Behong bilik sapi perah	- Air palung sapi	- Air palung kering sapi	- Minum ember betis	- Air palung betis 1-6 bulan	- Air palung stok muda 7-12 bln.	- Air palung stok muda 12-24 bln.	- Air palung sapi perah	- Behong bilik sapi perah	- Air palung sapi
SEBAH	2	3	0	0	2	2	1	3	1	0	0	0	1	0	0
B	5	4	3	0	4	3	0	0	0	0	0	0	0	1	0
C	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	3
Saya	1	0	0	0	1	3	0	0	1	1	0	0	0	0	0
J	0	2	1	0	0	0	0	0	1	3	0	0	0	0	0
K	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
L	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M	3	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
N	2	1	0	0	1	1	0	3	0	0	0	0	0	0	0
HAI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P	2	3	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Q	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
R	4	3	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
S	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0

V0, kunjungan pertama; V11, kunjungan pada minggu ke-11.

korelasi hasil ELISA antara pedet dan sapi muda menunjukkan kecenderungan ($r^2 = 0,39; P=0,09$). Korelasi antara hasil sapi perah dan kelompok lain tidak diamati.

Berdasarkan hasil PCR, jumlah pedet yang terinfeksi berkorelasi dengan jumlah pedet muda jika dibandingkan antar kunjungan. Itu *M. bovis* jumlah ct PCR pada anak sapi dan ternak muda sangat berkorelasi pada semua kunjungan ($r_{total} = 0,81; P < 0,01$). Tidak ada korelasi antara *M. bovis* Tingkat PCR sapi perah dan anak sapi, sapi perah dan ternak muda terlihat.

3.3. Sampel lingkungan

M. bovis DNA terdeteksi dalam setidaknya satu sampel lingkungan di 80% dari peternakan di v0 dan di 45% dari peternakan di v11 (Tabel 3).

3.4. sampel susu

Sebagian besar peternakan (17/20) memiliki setidaknya satu sampel susu di mana *mikoplasmadibudidayakan* (yaitu, 15 peternakan dengan sampel susu individu positif dan 12 peternakan dengan sampel BTM positif). *mikoplasmadibiakkan* dalam 54/1692 sampel susu individu. Selama seluruh periode, *mikoplasmadibudidayakan* dalam susu rata-rata 6,5% dari yang dicurigai secara klinis dan 2,2% dari sapi perah yang sehat (Tabel 4). Prevalensi sampel susu kultur-positif dari sapi perah yang dicurigai secara klinis ($n=50$) turun dari 14,5% (v0) menjadi 3,8% di v5 dan 5,3% di v11. Prevalensi sampel susu kultur-positif dari sapi perah sehat tetap sama selama penyelidikan (1,9-2,7%). Sapi perah sehat dengan sampel susu kultur-'positif' pada v0 lebih sering positif-kultur pada v11 ($r=0,70; P < 0,01$). Pada v0, BTM adalah *mikoplasmabudaya* positif di 50% peternakan; persentase menurun menjadi 15% pada v11.

Pada akhir masa studi tiga bulan (v11), setidaknya satu serum, cairan konjungtiva atau sampel susu diuji positif di 100%, 90% dan 30% dari peternakan, masing-masing.

4. Diskusi

Peternakan yang dipilih dikaitkan dengan fase awal *M. bovis* wabah, yang diharapkan memungkinkan pemantauan penularan di dalam dan di antara kelompok umur hewan. Deteksi *M. bovis* wabah didasarkan pada pengamatan petani, pemeriksaan klinis oleh dokter hewan dan diagnosis laboratorium. Namun, berdasarkan hasil pengujian, ternyata hanya empat peternakan (A, I, Q dan T) yang tidak melakukan sosialisasi. *M. bovis* untuk kelompok usia lain di v0 belum dan mungkin mengalami wabah akut pada inisiasi periode sampling. Di semua peternakan yang tersisa, prevalensi sapi positif ELISA sudah tertinggi pada v0, yang mungkin menyiratkan bahwa *mikoplasmadibudidayakan* sudah ada di peternakan. Hasil ini tidak berkorelasi dengan kesadaran petani atau dokter hewan tentang tanda-tanda klinis, memungkinkan

Tabel 4 Kultur mikoplasma menghasilkan persentase sampel susu individu dari sapi perah yang dicurigai secara klinis dan sapi perah yang sehat selama lima kunjungan untuk menyelidiki kegigihan dan transmisi bakteri setelah pengenalan.

Kelompok hewan	Contoh waktu	Hasil budaya		Jumlah sampel
		Negatif	Positif	
Diduga secara klinis sapi perah	v0	85,5%	14,5%	83
	v2	96,0%	4,0%	75
	v5	96,0%	4,0%	75
	v8	96,2%	3,8%	78
	v11	94,7%	5,3%	75
	Rata-rata	93,5%	6,5%	
Sapi perah yang sehat	v0	97,3%	2,7%	257
	v2	97,7%	2,3%	265
	v5	98,1%	1,9%	262
	v8	97,7%	2,3%	263
	v11	98,1%	1,9%	259
	Rata-rata	97,7%	2,2%	

V0, kunjungan pertama; V2, kunjungan pada minggu ke-2, dst.

infeksi menyebar secara substansial di antara sapi perah dan lebih lanjut. Pengenalan mungkin juga terjadi pada kelompok usia lain yang mungkin telah dikaburkan oleh kriteria inklusi yang digunakan dalam penelitian ini.

Respon serologis ditemukan sebelum kunjungan terakhir di v11, sesuai dengan harapan kami dan orang lain, bahwa serokonversi membutuhkan waktu 2-3 minggu setelah paparan (Wawegama dkk., 2014). Anderson dkk. 2019 menunjukkan bahwa kit Elisa tidak langsung yang digunakan untuk penelitian ini memiliki sensitivitas yang lebih rendah daripada yang lain dalam percobaan baru-baru ini, menunjukkan bahwa hasil dalam penelitian ini mungkin telah meremehkan jumlah sampel sero-positif yang sebenarnya. Karena ekskresi intermiten dan hilangnya bakteri selama transfer sampel ke laboratorium lebih banyak sapi yang serologis positif daripada kultur-positif (Nunez dkk., 2008; Akan et al., 2014). Tidak adanya *Mikoplasma* Tanda-tanda klinis terkait pada sapi yang terinfeksi sejalan dengan laporan kasus tentang kawanan sapi perah yang besar. Secara khusus, 13 sapi telah dikonfirmasi terinfeksi, di antaranya hanya delapan sapi yang menunjukkan radang sendi, dan satu menderita mastitis (Punyapornwithaya et al., 2011). Serokonversi sapi tanpa gejala menunjukkan bahwa beberapa sapi mengalami *M. bovis* infeksi atau terpapar tanpa mengembangkan penyakit, suatu kejadian yang tidak normal untuk penyakit menular (Morris et al., 1994).

Berdasarkan hasil PCR, *M. bovis* ditemukan pada tingkat yang sebanding dalam sampel konjungtiva dari hewan yang dicurigai secara klinis dan hewan yang sehat. Melalui duktus nasolakrimalis, cairan lakrimal bersentuhan langsung dengan selaput lendir di bagian atas saluran pernapasan, di mana *Mikoplasma* tinggal. Hal ini dapat mengakibatkan adanya *M. bovis* dalam cairan konjungtiva dan mungkin menjadi alasan lokasi ini disarankan sebagai situs predileksi untuk *Mikoplasma* sampel diagnostik (Maeda dkk., 2003; Kleinschmidt dkk., 2013; Oliveira dkk., 2019). Itu *M. bovis* Tingkat PCR dari ternak muda dan pedet berkorelasi tinggi pada semua kunjungan, menunjukkan bahwa pedet dan pedet muda kemungkinan besar terinfeksi pada tingkat yang sama pada waktu yang sama.

Bertentangan dengan rekomendasi umum *Mikoplasma* di kultur di bawah CO₂ ambien konsentrasi yang bisa memberikan beberapa hasil negatif palsu. Namun, *M. bovis* diketahui relatif tidak sensitif terhadap CO₂ perbedaan konsentrasi (Gourlay dkk., 1979; Lowe et al., 2018). Lowe dkk. (2018) membahas bukti CO₂ pengayaan dan menyarankan bahwa penggunaan ambien CO₂ kondisi mungkin menjadi keuntungan bagi budaya. Akhirnya, dalam kultur rutin dari kasus dugaan pneumonia anak sapi yang dilakukan selama lebih dari 10 tahun, lebih dari 50% hasil positif diamati, mengkonfirmasi bahwa kultur yang berhasil dapat dilakukan di bawah CO ambien kondisi. Untuk alasan ini, budaya yang tidak berhasil tidak dipandang sebagai penyebab signifikan dari hasil negatif palsu. *Mikoplasma* sp. Kultur positif tidak dikonfirmasi dengan analisis sekuens dan juga dapat menyiratkan *Mikoplasma* spp lainnya, seperti *Mycoplasma bovirhini*, *Mycoplasma bovigenitalium*, *Mycoplasma bovoculata* atau *Acholeplasma spp.* (Parker dkk., 2018). Namun, literatur mendukung bahwa *M. bovis* adalah yang paling penting dan sering terisolasi *Mikoplasma* sp. terkait dengan penyakit pada sapi di seluruh dunia (Panciera dan Berunding, 2010; Rubah, 2012).

Hebatnya, hanya dua kawanan yang mengalami tanda-tanda pernapasan pada beberapa sapi perah dan empat kawanan pada anak sapi, mengingat transmisi aerogenik dianggap sebagai rute utama penularan pada anak sapi dan sapi perah dewasa (Nicholas dkk., 2016).

Studi ini menunjukkan penularan antar kelompok umur dalam berbagai derajat di semua peternakan. *M. bovis* dapat menyebar dengan mudah antara ternak muda dan anak sapi. *M. bovis* infeksi pada pedet berkorelasi dengan stok muda, yang mungkin mengindikasikan penularan yang mudah di antara kelompok-kelompok ini. Ini bisa jadi karena kontak langsung, penularan oleh karyawan, dan pengenalan hewan muda ke dalam kelompok usia yang lebih tua. Hal ini sesuai dengan penelitian Swiss sebelumnya di mana penularan berkorelasi dengan susu yang terkontaminasi. Mekanisme penularan tidak diselidiki dalam penelitian kami. Apakah penurunan tingkat infeksi merupakan konsekuensi dari penghapusan shedding aktif atau tindakan pertanian lainnya, masih belum jelas (Aebi dkk., 2015). Sebuah studi sebelumnya dari Washington State University mengamati bahwa pemusnahan segera *Mikoplasma* sapi mastitis terkait tidak terkait dengan percepatan akhir infeksi baru (Punyapornwithaya, et al., 2010, 2012). Sebuah faktor yang

penularan yang dipengaruhi adalah pemberian kolostrum atau susu mastitis mentah ke anak sapi (Gille dkk., 2020), yang dipraktekkan di sekitar 30% dari kawanan yang diselidiki dalam penelitian ini.

Sejauh pengetahuan kami, ini adalah studi pertama yang bertujuan untuk memantau secara dekat klinis akut *M. bovis* wabah di sejumlah besar peternakan (20). Hasilnya mendukung hipotesis bahwa *M. bovis* menginfeksi semua kelompok umur selama tahap awal wabah meskipun kandang terpisah dan hewan, yang tidak menunjukkan tanda-tanda klinis, tetap dapat membawa *M. bovis* bakteri. Temuan juga menunjukkan bahwa *M. bovis* tidak mungkin diberantas dari peternakan wabah dalam waktu 3 bulan setelah timbulnya tanda-tanda klinis. Konsisten dengan laporan yang diterbitkan sebelumnya (Nicholas dkk., 2016) penelitian ini menunjukkan bahwa *Mikoplasma* infeksi secara klinis membatasi diri pada tingkat kawanan dalam banyak kasus. Namun, pola penyakit setelah periode penyelidikan 3 bulan tidak diketahui.

5. Kesimpulan

Berdasarkan investigasi klinis dan laboratorium, kesimpulan utama dari studi ini tentang dinamika *M. bovis* di peternakan sapi perah Belanda yang mengalami wabah klinis akut adalah bahwa infeksi sudah menyebar ke seluruh peternakan. Terjadinya dan perjalanan tanda-tanda klinis seolah-olah tidak dapat diprediksi; meskipun kehadiran agen yang jelas 3 bulan setelah dimulainya wabah klinis, hampir tidak ada masalah klinis baru yang diamati.

Pernyataan konflik kepentingan

Studi ini didukung secara finansial oleh Dutch Dairy Industry (Zuivel NL), tetapi organisasi tersebut tidak memainkan peran apapun dalam desain studi atau dalam pengumpulan, analisis dan interpretasi data, atau dalam keputusan untuk menyerahkan naskah untuk publikasi. Penulis tidak memiliki hubungan keuangan atau pribadi apa pun yang dapat memengaruhi atau membiaskan isi makalah secara tidak tepat.

Ucapan Terima Kasih

Penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada petani yang berpartisipasi dan dokter hewan terkait, rekan-rekan Royal GD Animal Health lainnya yang mendukung (Ms Geralda Hop untuk laporan sebelumnya dan Mr. Wim Swart untuk dukungan statistik), siswa, yang berpartisipasi dalam penelitian ini, Cambridge Proofreading LLC, untuk memeriksa bahasa yang benar, staf Laboratorium ilmiah untuk menafsirkan hasil teknis dan pemasok dana Zuivel NL.

Referensi

- Aebi, M., van den Borne, BH, Raemy, A., Steiner, A., Pilo, P., Bodmer, M., 2015. *Mycoplasma bovis* infeksi pada sapi perah Swiss: penyelidikan klinis. Dokter Hewan Akta. Pinda. 57, 10.
- Akan, M., Babacan, O., Torun, E., Mütak, HK, ncel, T., 2014. Diagnosa Infeksi *Mycoplasma bovis* pada sapi dengan ELISA dan PCR. Kafkas Üniversitesi Dokter Hewan Fakültesi Dergisi 20, 249-252.
- Andersson, A., Aspán, A., Wisselink, HJ, Smid, B., Ridley, A., Pelkonen, S., Autio, T., THailbHaill-Lauritsen, K., KensHaiJ., Gaurivaud, P., et al., 2019. Uji coba antar laboratorium Eropa untuk mengevaluasi kinerja tiga metode serologis untuk diagnosis *Mikoplasma* infeksi bovis pada sapi menggunakan analisis kelas laten. Dokter Hewan BMC. Res. 15, 369.
- Fox, LK, 2012. *Mikoplasma* mastitis: Penyebab, penularan, dan pengendalian. Dokter hewan. Klinik N.A. Makanan Anim. Praktek. 28, 225-237.
- Gourlay, RN, Howard, CJ, Thomas, LH, Wyld, SG, 1979. Patogenesis beberapa *Mikoplasma* dan *Akoleplasma* spesies di paru-paru anak sapi gnotobiotik. Res. Dokter hewan. Sci. 27, 233-237.
- Gille, L., Evrard, J., Callens, J., Supré, K., Grégoire, F., Boyen, F., Haesebrouck, F., Deprez, P., Pardon, B., 2020. Kehadiran *Mycoplasma bovis* dalam kolostrum. Dokter hewan. Res. 511, 54.
- Haapala, V., Pohjanvirta, T., Vhänikkilä, N., Halkilahti, J., Simonen, H., Pelkonen, S., Soveri, T., Simojoki, H., Autio, T., 2018. Semen sebagai sumber *Mycoplasma bovis* mastitis pada sapi perah. Dokter hewan. Mikrobiol. 216, 60-66.
- Hazelton, MS, Sheehy, PA, Bosward, KL, Parker, AM, Morton, JM, Dwyer, CJ, Niven, PG, House, JK, 2018. Komunikasi singkat: pelepasan *Mycoplasma bovis* dan respon antibodi pada sapi yang baru didiagnosis dengan infeksi klinis. J. Ilmu Susu. 101, 584-589.

- Hazelton, MS, Morton, JM, Bosward, KL, Sheehy, PA, Parker, AM, Dwyer, CJ, Niven, PG, House, JK, 2020. *Mycoplasma* spesies dalam vagina sapi perah sebelum dan sesudah terpapar sapi jantan dan hubungannya dengan pembuahan. J. Ilmu Susu. 103, 11795–11805.
- Kleinschmidt, S., Spergser, J., Rosengarten, R., Hewicker-Trautwein, M., 2013. Panjang-istilah kelangsungan hidup *M. bovis* dalam lesi nekrotik dan dalam sel fagosit seperti yang ditunjukkan oleh transmisi dan mikroskop elektron imunogold di jaringan paru-paru dari anak sapi yang terinfeksi secara eksperimental. Dokter hewan. Mikrobiol. 162, 949–953.
- Lima, SF, Teixeira, AGV, Higgins, CH, Lima, FS, Bicalho, RC, 2016. Atas mikrobioma saluran pernapasan dan peran potensialnya dalam penyakit pernapasan sapi dan otitis media. Sci. Rep. 6, 29050.
- Lowe, JL, Fox, LK, Enger, BD, Progar, AA, Gay, JM, 2018. Pengaruh atmosfer konsentrasi karbon dioksida pada budidaya sapi *Mycoplasma* jenis. J. Ilmu Susu. 101, 4660–4666.
- Maeda, T., Shibahara, T., Kimura, K., Wada, Y., Sato, K., Imada, Y., Ishikawa, Y., Kadota, K., 2003. *Mycoplasma bovis*-otitis media supuratif terkait dengan pneumonia pada sapi jantan. J. Kom. Patol. 129, 100–110.
- Maunsell, FP, Donovan, GA, 2009. *Mycoplasma bovis* infeksi pada anak sapi muda. Dokter hewan. klinik N.A. Animasi Besar. Praktek. 25, 139–177.
- Maunsell, FP, Woolums, AR, Francoz, D., Rosenbusch, RF, Langkah, DL, Wilson, DJ, Janzen, ED, 2011. *Mycoplasma bovis* infeksi pada sapi. J. Dokter hewan. magang. Med. 25, 772–783.
- Morris, RS, Pfeiffer, DU, Jackson, R., 1994. Epidemiologi *Mycobacterium bovis* infeksi. Dokter hewan. Mikrobiol. 40, 153–177.
- Nicholas, RAJ, Fox, LK, Lysnyansky, I., 2016. *Mycoplasma* mastitis pada sapi: untuk memusnahkan atau untuk tidak memilah. Dokter hewan. J. 2016, 142–147.
- Nunez, C., Salinas, EM, Maya, JJM, Hernandez, L., 2008. Deteksi subklinis mastitis sapi yang disebabkan oleh mikoplasmosis dengan uji ELISA tidak langsung dan isolasi. Dokter hewan. Meksiko 39, 161–171.
- Oliveira, TES, Pelaquim, IF, Flores, EF, Massi, RP, Jiménez Valdiviezo, MJ, Pretto-Giordano, LG, Alfieri, AA, Saut, JPE, Headley, SA, 2019. *Mycoplasma bovis* dan agen virus yang terkait dengan perkembangan penyakit pernapasan sapi pada sapi perah dewasa. Transbound. muncul. Dis. 10, 111.
- Panciera, RJ, Berunding, AW, 2010. Patogenesis dan patologi pneumonia sapi. Dokter hewan. klinik N.A. Animasi Besar. Praktek. 26, 191–214.
- Parker, AM, Sheehy, PA, Hazelton, MS, Bosward, KL, House, JK, 2018. Ulasan tentang *Mycoplasma* diagnostik pada sapi. J. Dokter hewan. magang. Med. 32, 1241–1252.
- Petersen, MB, Pedersen, J., Holm, DL, Denwood, M., Nielsen, LR, 2018. Sebuah studi observasional longitudinal dari dinamika *Mycoplasma bovis* antibodi pada sapi perah yang terpapar dan sakit secara alami. J. Ilmu Susu. 101, 7383–7396.
- Punyapornwithaya, V., Fox, LK, Hancock, DD, Gay, JM, Alldredge, JR, 2010. Hubungan antara strain wabah yang menyebabkan *Mycoplasma bovis* mastitis dan pembawa asimtomatik dalam kawanan: studi kasus dari Idaho, AS. sebelumnya Dokter hewan. Med. 93, 66–70.
- Punyapornwithaya, V., Fox, LK, Hancock, DD, Gay, JM, Wenz, JR, Alldredge, JR, 2011. Insiden dan penularan *Mycoplasma bovis* mastitis pada sapi perah Holstein di kandang rumah sakit: studi kasus. sebelumnya Dokter hewan. Med. 98, 74–78.
- Punyapornwithaya, V., Fox, LK, Hancock, DD, Gay, JM, Alldredge, JR, 2012. Waktu untuk membersihkan *Mycoplasma* mastitis: Pengaruh faktor manajemen termasuk kebersihan waktu pemerahan dan pemusnahan preferensial. Bisa. Dokter hewan. J. 53, 1119–1122.
- Wawegama, NK, Browning, GF, Kanci, A., Marenda, MS, Markham, PF, 2014. Pengembangan uji immunosorben terkait-enzim berbasis protein rekombinan untuk diagnosis *Mycoplasma bovis* infeksi pada sapi. klinik Vaksin Imunol. 21, 196–202.
- Wilson, DJ, Skirpstunas, RT, Trujillo, JD, Cavender, KB, Bagley, CV, Harding, RL, 2007. Riwayat yang tidak biasa dan tanda-tanda klinis awal dari *Mycoplasma bovis* mastitis dan arthritis pada sapi laktasi pertama dalam kawanan susu komersial tertutup. Selai. Dokter hewan. Med. Asosiasi 230, 1519–1523.

Pengobatan ovarium Cystik folikel pada sapi perah

AF Majeed, QM T, MS Hasan, AR Muhammad

dokter hewan. Med. / Univ.
dari AL-Anbar

ABSTRAK

Penelitian dilakukan pada 48 Friesian-Holstein. sapi yang menderita ovarium kistik folikel, disajikan di stasiun alfayha Babel Governorate, usia hewan berkisar antara 5-7 tahun dan jumlah melahirkan berkisar antara 3-5 kali. Palpasi rektal merupakan kriteria diagnosis. Hewan-hewan tersebut dibagi secara acak menjadi empat kelompok yang sama (masing-masing kelompok berisi 12 ekor sapi). Kelompok pertama diberi HCG (3000 IUIM). Kelompok kedua diberi GnRH IM 0,5 mg. Kelompok ketiga diobati dengan GnRH (0,5 MG IM) ditambah 20 mg PGF2 α IM. Kelompok keempat mendapat perlakuan plasebo (5 cc air suling) sebagai kelompok kontrol. Semua sapi dilakukan palpasi rektal 14 hari setelah penyuntikan terapi untuk mengetahui pengaruh perlakuan yang berbeda. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kelompok ketiga (GnRH+PGF2 α) memberikan hasil terbaik (91. 6%) diikuti dengan pengobatan dengan GnRH saja (75%) atau pengobatan dengan HCG (50%) .Disimpulkan dari penelitian ini bahwa GNRH plus PGF2 α dapat digunakan untuk pengobatan kistik ovarium folikular dengan tingkat keberhasilan yang tinggi.

PENDAHULUAN

Ovarium kistik folikel (FCO) merupakan penyebab penting infertilitas pada sapi perah. Hal ini masih bertanggung jawab atas kerugian ekonomi yang cukup besar pada sapi perah (1) perpanjangan interval melahirkan dan biaya pengobatan FCO mengakibatkan kerugian ekonomi bagi peternak sapi perah (2) . Mereka didefinisikan sebagai struktur folikel, dengan diameter minimal 2,5 cm yang bertahan lebih dari sepuluh hari tanpa adanya jaringan luteal (CL) (3,4,5,6). Telah dilaporkan bahwa defisiensi pelepasan dari LH saat estrus dari kelenjar hipofisis. Ini mungkin merupakan cerminan dari kegagalan pelepasan GnRH hipotalamus atau mungkin karena sekresi FSH yang berlebihan (7,8,9). Adabeberapa metode yang digunakan untuk perawatan ovarium kistik folikular termasuk ruptur manual dan berbagai rejimen hormonal (1,3,10). Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan efek terapi hormonal yang berbeda seperti HCG , GnRH saja dan GnRH dengan PGF2m dalam pengobatan FCO pada sapi perah.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan pada 48 ekor sapi Friesian-Holstein yang menderita folikel kistik ovarium yang disajikan di stasiun AL- FAYHA. Umur sapi berkisar antara 5-7 tahun dan jumlah nifas 3-5 kali. Palpasi rektal merupakan kriteria diagnosis yang meliputi adanya satu atau lebih kista dengan diameter 2,5 cm pada salah satu atau

kedua ovarium. Hewan- dibagi secara acak menjadi empat kelompok dengan jumlah yang sama ($n = 12$ sapi). kelompok pertama diobati dengan human chorionic Gonadotropine (HCG) (3000 IUIM); Kelompok kedua diobati dengan 0,5 mg im dari pelepasan Gonadotropik hormone (GnRH); Kelompok ketiga diberi GnRH 0,5 mg im diikuti dengan 20 mg Prostaglandin F₂α (PGF₂) setelah 9 hari; Kelompok keempat mendapat perlakuan plasebo (5 cc air suling) sebagai kelompok kontrol. Semua sapi dilakukan palpasi rektal 14 hari setelah penyuntikan terapi untuk mengetahui pengaruh perlakuan yang berbeda. Hasilnya disebut positif bila kista mengalami regresi dan negatif bila tidak ada perubahan bentuk dan ukuran kista. Hasilnya ditabulasi dan dianalisis statistik menggunakan uji Chi-kuadrat dengan probabilitas 5% (11).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Semua sapi yang diteliti memiliki kista unilateral, mempengaruhi ovarium kanan (36/48-75%) lebih banyak daripada kiri (12/48-25%). Jumlah kista bervariasi dari satu sampai tiga sedangkan ukuran kista bervariasi dari 2,7 sampai 3,5 cm. Dari 36 ekor sapi yang diobati dengan terapi hormonal yang berbeda, 26 ekor merespon positif terhadap pengobatan. Pengobatan dengan GnRH diikuti 9 hari dengan PGF₂ memberikan hasil terbaik (91,66%) diikuti oleh GnRH saja (75%), dan HCG (50%). sedangkan kelompok kontrol menunjukkan pemulihan spontan pada dua kasus (16,66%). Terdapat perbedaan bermakna ($P < 0,05$) antara perlakuan hormonal yang berbeda. Hasil yang diperoleh dengan GnRH ditambah PGF₂α dengan respon tinggi sesuai dengan pengamatan beberapa penulis (1,9). Hal ini mungkin karena efek GnRH yang dapat menyebabkan leutinisasi kista atau ovulasi folikel (3,12,13). GnRH juga memiliki berat molekul kecil yang dapat diulang tanpa respon imun seperti yang kadang-kadang dihasilkan oleh LH atau HCG eksogen (3). PGF₂ injeksi telah digunakan sebagai agen luteolitik yang melibatkan semua jaringan lutein dalam struktur ovarium kistik (14,15).

Tabel 1. Respon Hormon Terhadap Pengobatan Cistik Folikel

JENIS PERLAKUAN	Sampel (n)	RESPON	KEBERHASILAN (%)
HCG 3000 iu	12	6	50%*
GnRH 0,5 mg	12	9	75%*
GnRH 0,5 mgi.m+PGF ₂ α 20 mg saya setelah 9 hari	12	11	91,66%*
Air suling sc.c (Kontrol)	12	2	16,66%*

Hasil penelitian ini selaras dengan (1,10,13). Sapi yang tidak menanggapi pengobatan GnRH mungkin disebabkan oleh degenerasi lapisan sel teka dan granulosa (14). Pengamatan serupa telah dilakukan oleh Majeed dan Ali (13) , Kesler dan Garverick (3) dan Garverick(1). Respon yang diperoleh dengan HCG sesuai dengan laporan sebelumnya (10,13,14). Respon yang rendah terhadap pengobatan HCG mungkin karena tidak adanya iritasi uterus yang dilaporkan meningkatkan suplai darah ke endometrium dan dengan demikian meningkatkan regenerasinya (16). Dari penelitian ini, disimpulkan bahwa GnRH plus PGF2 dapat digunakan untuk pengobatan ovarium kistik folikel dengan tingkat keberhasilan yang tinggi.

DAFTAR PUSTAKA

1. Garverick ,H.A., 2007.Ovarian follicular cysts, in:current Therapy in large Animal Theriogenology by R.S. Youngquist and W.R. Threlfall ED. Saunders, Elgevier P.379.
2. Vanholder ,.T., Opsomer ,G and Dekruif,A., 2006. Etiology follicles in dairy cattle :a review. *Reprod.Nytr.Dev*-46:105-119.
3. Kesler, D.J. and Garverick ,H.A., 1982. ovarian Cysts in dairy cattle: a review.*J.Anim.Sci.*,55:1147-1159.
4. Youngquist, R.S., 1986. Cystic Follicular degeneration in the cow .In: Morrow ,D.(Ed). *Current Therapy intheriogenology* ,2nd ed ,WB Saunders Co.,Philadelphia ,P.243-246.
5. Day,N.,1991. The diagnosis ,differentiation ,and pathogenesis of cystic ovarian disease, *Vet.Med.*,86:753-760
6. Woolums ,A.R. and Peter ,A.T., 1994.Cystic ovarian Condition in cattle .Prt I .folliculogenesis and ovulation. *Compend Contain .Edu . Pract. Vet.(Food Animal)*, 16:935-942.
7. Noakes ,D.E.,2008.,Infertility in the cow. In:*Vet.Reprod. and Obstet.Arthur,G.H., Noakes ,D.E., Pearson, H.and Parkinson,T.J.ed.,7th ed .PP.345-388.W.B.Saunders,Co.,London.*
8. Opsomer ,G., Wensing, Th,Lavens, H., Coryn, M ,and Dekruif. 1999,Insulin resistance: The link between metabolic disorders and Cystic ovarian disease in high yielding dairy cows. *Anim.Reprod.SCI.*,56:211-222 .
9. Nobele, K.M., Tebble, J.E., Harvey, D. and Dobson,tl., 2000. Ultrasonography Dobson,tl., 2000. Ultrasonography.
10. Nanda,A.S.,ward,W.R.,Williams,P.C.Wetal.,1988. Retrospectivean alysis of the efficacy of different hormone treatments on Cystic ovarian disease in cattle.*Vet.Rec.*,122:155.
11. Steele,R.D. and Torrie ,J.H.,1980. *Principles and Procedures of Statistics* , Toronto, Mc Graw Hill Inc.
12. Grunert,B.,Hoffman,B.and Ahlers ,D.,1981.Treatment of Cystic varies in Cattle .*Dt.tieraztl. Wschr.* 81:373
13. Majeed,A.F. and Ali, J.B., 1987. Treatment of follicular Cystic ovaries in dairy cattle. *Indian Vet.J .*,64:340-342.
14. Roberts, S.J.,1986. Cystic ovaries. In : *Vet ,Obstet.and Genit.Dis.* Robert, S.J.ed ., 3rd ed .PP.478-492. Edward Bros ., In'c ,Ann Arobor MI.
15. Ndossi,D.,Kamimura,S.,Ando,T.etal.,2004. Efficacy of CIDR Treatment against ovarian Follicular Cyst in cows *Mem. Fac. Agr. Kagoshima Univ.*, 39:45.56.

16. Fathalla ,M.A. and Fahmi ,H., 1979.Treatment of follicular Cyst in beef cattle. Case report, Iraqi vet. med,J .,3:1

Dikirim: 30/11/2021

Diterima: 20/03/2022

Diterbitkan: 04/04/2022

Pembuatan vaksin inaktif untuk patogen unggas *Escherichia coli* menggunakan microarrays: Pendekatan yang lebih rasional untuk desain vaksin yang tidak aktif

Xiangmei Zhou^{1,2†}, Philip Richards^{1,3†}, Daniel Windhorst⁴, Ariel Imre^{1,5}, Agnes Bukovinski¹, Jessica Ruggeri⁶,
Altayeb Elazomi⁷ , dan Paul Barrow^{1,8*} 

¹Fakultas Kedokteran dan Sains Hewan, Universitas Nottingham, Kampus Sutton Bonington,
Loughborough, Inggris Raya

²Departemen Patologi Hewan, Sekolah Tinggi Kedokteran Hewan, Universitas Pertanian Cina, Beijing, Cina

³Sekolah Biosains, Universitas Nottingham, Kampus Sutton Bonington, Loughborough, Inggris

⁴Nutrisi Hewan Cargill, Rotterdam, Belanda

⁵CEVA Phylaxia, Budapest, Hongaria

⁶Layanan Kedokteran Hewan, ATS Brescia, Brescia, Italia

⁷Departemen Laboratorium Medis, Fakultas Teknologi Kedokteran, Universitas Zawia, Zawia, Libya

⁸Sekolah Kedokteran Hewan, Universitas Surrey, Guildford, Inggris

† dan *Kedua penulis berkontribusi sama untuk pekerjaan ini

Abstrak

Latar belakang: *Escherichia coli* tetap menjadi patogen utama unggas. Kebanyakan vaksin tidak aktif dan diproduksi secara empiris. Meskipun tidak aktif *Salmonella* vaksin telah diproduksi oleh kultur dalam kondisi kekurangan Fe, tidak ada vaksin yang diproduksi yang mungkin mengekspresikan semua protein yang diekspresikan selama infeksi sel penyaji antigen.

Tujuan: Tujuannya adalah untuk menghasilkan vaksin inaktif yang lebih protektif dengan membudidayakan unggas *E. coli* dalam media sintesis yang menyerupai lingkungan fagolisosom.

Metode: Ekspresi gen global pada unggas patogen galur O78:K80 dari *E. coli*, dipanen dari sel HD11 seperti makrofag unggas yang terinfeksi, dibandingkan dengan microarray dengan bakteri yang dikultur dalam media kultur jaringan. Media sintesis cair diproduksi berdasarkan kondisi lingkungan yang diidentifikasi di mana bakteri terpapar secara intraseluler. Sebuah bakterin diproduksi dari strain ini dan kemampuan protektifnya dinilai pada ayam.

Hasil: Perubahan dalam *E. coli* ekspresi gen yang diamati termasuk penggunaan akseptor elektron dan sumber karbon yang berbeda seperti etanolamin, -glukosida, galaktonat, asam dikarboksilat, dan asam amino, up-regulasi gen yang terkait dengan penyerapan Fe dan Mn, dan up-regulasi tipe-1 dan curli fimbriae, gen adhesi lainnya dan down-regulation gen sintesis asam sialat. Bakterin yang diproduksi dalam media sintesis secara statistik lebih protektif daripada bakteri yang dibuat dari bakteri yang dikultur dalam kaldu nutrisi ketika diuji pada ayam yang divaksinasi yang ditantang dengan virulen yang berbeda. *E. coli* O78: K80 strain.

Kesimpulan: Pendekatan menggunakan ekspresi gen untuk menghasilkan media sintesis untuk generasi bakteri yang lebih efektif dapat digunakan untuk sejumlah bakteri patogen intraseluler termasuk Enteroinvasif. *E. coli*, *Salmonella*, dan *Pasteurella/Riemerella/Mannheimi* kelompok organisme. **Kata kunci:** Microarray, Vaksin, Ayam, Ekspresi gen, Media sintesis.

pengantar

Patogen unggas *Escherichia coli* (APEC) adalah patogen unggas utama yang menyebabkan septikemia dan poliserositis pada periode segera setelah penetasan (Noland *dkk.*, 2013) atau setelah infeksi bronkitis (Dho-Moulin dan Fairbrother, 1999) atau infeksi metapneumovirus rinotrakheitis kalkun (Picault *dkk.*, 1987). Sebagai takson, APEC terdiri dari kelompok strain terkait yang mengekspresikan berbagai penentu virulensi yang terkait dengan sindrom individu (Gyles dan Fairbrother, 2010). Tidak ada kombinasi tunggal dari penentu virulensi yang mencirikan virulensi. Penentu yang diidentifikasi meliputi:

fimbriae individu dan adhesin dan invasin lainnya, faktor resistensi serum, dan racun (Noland *dkk.*, 2013). Ketersediaan beberapa urutan genom beranotasi (Johnson *dkk.*, 2007; Dziva dan Stevens, 2008; Dziva *dkk.*, 2013; mangiamele *dkk.*, 2013), telah memfasilitasi identifikasi kandidat gen virulensi baru. Beberapa serotipe berhubungan dengan infeksi unggas dan manusia (Johnson *dkk.*, 2007). Meskipun septikemia merupakan karakteristik dari banyak infeksi unggas, jumlah bakteri tertinggi diisolasi dari limpa, selain organ lain, kemungkinan besar terletak di dalam makrofag (Smith *dkk.*, 1985; Gerobak dorong *dkk.*, 1998). Perilaku mikroba di

* Penulis yang sesuai: Paul Barrow. Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Surrey, Guildford, Inggris.
Surel: paul.barrow@surrey.ac.uk

situs ini dan di dalam sel penyaji antigen (APC) juga penting dalam memulai respon imun. Pengendalian infeksi dengan kemoterapi pasti memilih resistensi antibiotik, terutama di negara-negara di mana peraturannya kurang ketat (Wang dkk., 2010). Vaksin yang tidak aktif (bakteri) umumnya dianggap kurang efektif daripada vaksin hidup yang dilemahkan karena yang terakhir merangsang imunitas humoral dan seluler. Namun, isu-isu termasuk penggunaan vaksin yang dimanipulasi secara genetik menunjukkan bahwa vaksin yang tidak aktif akan digunakan di masa mendatang. Upaya telah dilakukan untuk mengembangkan vaksin bakteri nonaktif yang lebih rasional (Woodward dkk., 2002) dengan membiakkan bakteri di bawah kondisi pembatasan besi. Namun, studi dengan *Salmonella typhimurium* menginfeksi makrofag tikus (Eriksson dkk., 2003) dan dengan serovar unggas dalam makrofag ayam (Imredkk., 2013) menunjukkan bahwa pembatasan Fe bukan satu-satunya fitur yang mencirikan lingkungan intraseluler. Kami berhipotesis bahwa analisis kondisi di dalam makrofag menggunakan data yang dihasilkan oleh analisis transkripsi bakteri dapat mengarah pada pengembangan media yang mereproduksi kondisi tersebut secara lebih akurat. Bakteri yang diproduksi dengan cara ini seharusnya lebih mirip bakteri dalam makrofag dan APC lain secara antigenik daripada bakteri yang dikultur dalam kaldu nutrisi (NB) dan harus lebih protektif. Oleh karena itu Tujuannya adalah untuk menginfeksi garis sel mirip makrofag unggas HD11 dengan strain APEC, melakukan analisis transkripsional pada bakteri yang dipanen dengan microarray dan mengidentifikasi dari pola ekspresi gen kondisi lingkungan tempat bakteri menjadi sasaran intraseluler.

Bahan dan metode

Strain dan kultur bakteri

Escherichia coli O78:K80 strain F31 dan F135 diisolasi dari kasus avian colibacillosis. Keduanya virulen untuk ayam ketika diinokulasi secara parenteral (Barrow, hasil tidak dipublikasikan; Smith dkk., 1985). Kultur NB (Oxoid, CM67) diinkubasi pada suhu 37^{Hai}C selama 24 jam. Ini berisi antara 1 dan 3 × 10⁹cfu/ml. Pencacahan bakteri dilakukan dengan menggunakan metode Miles dkk. (1938) kultur pada pelat agar MacConkey (Oxoid CM0007).

Kultur sel dan model infeksi in vitro

Sel HD11 seperti makrofag unggas (Beug dkk., 1979) ditanam dalam media RPMI-1640 yang dilengkapi dengan 20 mM L-glutamin (Gibco), 2,5% serum janin sapi (Gibco), 2,5% serum ayam (Sigma) dan 10% kaldu triptosa fosfat (Sigma). Untuk setiap infeksi bakteri, total 3 × 10⁷Sel HD11 diunggulkan di masing-masing dari tiga labu kultur jaringan (175 cm², Nn).

Kultur NB dari strain bakteri F31 semalam diencerkan 20 kali lipat dalam media kultur sel yang dijelaskan di atas dan ditumbuhkan secara statis selama 2 jam (5% CO₂), kemudian ditambahkan ke sel HD11 pada Multiplisitas Infeksi 100. Setelah inkubasi bersama selama 1 jam di bawah kondisi di atas, media diganti dengan media yang dilengkapi dengan 100 g/ml gentamisin (Gm, Gibco). Setelah inkubasi 1 jam pertama, media diganti dengan media yang mengandung 15 g/ml Gm. Titik pengambilan sampel berada pada 0, 4, 8, 12, 24 dan 48 jam pasca infeksi. Sel dilisiskan (Barrow dan Lovell, 1989) untuk penghitungan bakteri.

Ekstraksi dan pemrosesan RNA

Protokol ekstraksi RNA untuk bakteri F31 yang diekstraksi dari sel yang terinfeksi dan kultur kaldu adalah protokol Eriksson dkk. (2003) dan digunakan oleh Imredkk. (2013). Pada 4 dan 8 jam setelah infeksi, sel dilisis dengan 0,1% SDS, 1% fenol, dan etanol 19% dalam air selama 30 menit di atas es. Bakteri dikumpulkan dengan sentrifugasi (5.000 g, 10 menit, 4°C), diperlakukan dengan lisozim pelindung dan Proteinase K, dan RNA total disiapkan menggunakan RNeasy Mini Kit (Qiagen). RNA bakteri juga dipanen dari bakteri yang dikultur dalam RPMI selama 2 jam, yang telah diinokulasi dengan pengenceran 20 kali lipat dari biakan NB semalam, untuk menghasilkan jumlah bakteri yang serupa dengan yang diterapkan pada sel monolayer. RNA dari bakteri yang ditumbuhkan dalam media kultur sel diisolasi menggunakan kit pemurnian RNA yang sama. Kualitas RNA bakteri dan kontaminasi RNA inang diperiksa dengan 2100 Bioanalyzer (Agilent). RNA diamplifikasi menggunakan MessageAmp™ II-Bacteria Kit (Ambion), menghasilkan RNA amplifikasi berlabel aminoallyl-UTP (aRNA). Untuk pelabelan, 6 g aliquot sampel aRNA digabungkan dengan pewarna fluoresen Cy3 dan Cy5 (Amersham). Cy3 digabungkan ke *in vitro* mengontrol RNA, sementara Cy5 digunakan untuk memberi label RNA bakteri yang diekstraksi dari makrofag. **Desain microarray dan analisis data**

Urutan yang digunakan untuk desain array adalah strain referensi APEC O1:K1:H7 (NC_008563) (Johnson dkk., 2007). Semua ORF yang diprediksi dirancang untuk desain probe. Sistem Agilent eArray berbasis web (Agilent Technologies, <https://earray.chem.agilent.com/earray/>) digunakan dengan pengaturan berikut selama desain probe microarray: Metodologi pencocokan T_m (70 °C), 60-mer panjang probe, 3 probe/target. Protokol, pengaturan eksperimental, ekstraksi RNA, amplifikasi, pelabelan, dan hibridisasi dijelaskan secara rinci di <http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/>. Analisis data dilakukan dengan menggunakan GeneSpring GX 10.0 (Agilent). Tujuan akhir dari analisis ini adalah untuk mengembangkan media sintesis yang mereproduksi kondisi ini sedekat mungkin. Untuk alasan ini, analisis lengkap ekspresi gen tidak dilakukan oleh kelas gen COG. Mereka dikelompokkan menurut gen yang mungkin mempengaruhi kelangsungan hidup intraseluler, respons terhadap stres, dan ekspresi gen virulensi seperti yang ditunjukkan di bawah ini.

Medium Makrofag Sintetis (SMM-1)

Komposisi SMM-1 adalah: 100 mM Tris-Cl, pH 5.0, 2 mM D-glukosa, 2 mM D(+)-galaktosa, 20 mM gliserol, 20 mM gliserol-3-fosfat, 20 mg/l L-valin, 50 mg/l L-leusin, 50 mg/l L-isoleusin, 65 mg/l L-sistein 2HCl, 5 mg/l L-triptofan, 1 mM MgCl₂, 200 μM 2,2-dipiridil, 500 μM CaCl₂, 3 mM ZnSO₄, 50 mM K₂SO₄, 100 mM NaCl, 7,5 mM (NH₄)₂SO₄ dalam 100 ml air ultra murni. PH diatur menjadi 5 dengan asam klorida dan filter media akhir disterilkan.

Produksi bakteri

Sebuah aliquot 5 ml dari kultur NB semalam dari *E. coli* F31 ditambahkan ke media 95 ml RPMI1640 (Invitrogen Ltd., Paisley, UK) yang telah dihangatkan hingga 37°C. Ini diinkubasi secara statis selama 2 jam pada suhu 37°C dalam 5% CO₂. Sel-sel bakteri dipulihkan dan dicuci dua kali dalam media SMM-1 segar atau NB sebelum masing-masing disuspensi kembali dalam SMM-1 atau NB segar. Kultur ini diinkubasi secara statis pada suhu 37 °C dalam kondisi aerobik selama 4 jam dan jumlah yang layak diperkirakan pada nutrient agar (NA). Sebuah aliquot 0,2 ml formalin 40% ditambahkan ke 10 ml kultur SMM-1 dan NB dan dibiarkan selama kurang lebih 12 jam pada suhu kamar diikuti dengan periode 24 jam pada suhu 4 jam. Kedua sediaan yang diformalkan disentrifugasi pada 1.500 g selama 30 menit dan kedua pelet disuspensikan kembali secara terpisah dalam 10 ml PBS. 100 l aliquot dikeluarkan dan dikultur dalam NB (37°C, semalaman) untuk menentukan sterilitas. Suspensi sel yang diberi perlakuan formalin ini disesuaikan dengan kepadatan yang setara dengan ~ 1 × 10⁹ CFU/ml sebelum digunakan sebagai vaksin. **Studi vaksinasi**

Tiga kelompok (A, B, dan C) dari 25 lapisan Hy-Line berumur 1 hari ditempatkan di ruang terpisah di lantai padat dengan serutan. Pada kelompok umur 4 dan 18 hari, A dan B diinokulasi dengan bakterin tanpa bahan pembantu. Burung divaksinasi secara bersamaan secara oral (100 l dengan jarum berujung tumpul) dan intramuskular (100, 50 l ke setiap otot dada), dalam kasus kelompok A, dengan bakteri SMM-1, kelompok B dengan bakteri NB dan grup C dengan PBS. Pada usia 29 hari, semua burung ditantang secara intravena dengan 1 × 10⁵ cfu dari kultur NB 24 jam dari O78:K80 *E. coli* regangan F135. Pada umur 30, 31, 33 hari, 5 ekor, dan 36 hari, 10 ekor ayam dibunuh dari masing-masing kelompok dan jumlah galurantang yang diinokulasi dalam sampel hati, limpa, dan darah yang dihomogenisasi dihitung pada agar MacConkey. Efek perlindungan diukur sebagai pengurangan keparahan frekuensi morbiditas jika ini terjadi atau dengan pengurangan jumlah bakteri dalam darah, hati, dan limpa.

Persetujuan etis

Eksperimen hewan dilakukan di bawah Proyek Rumah Kantor Pemerintah Inggris dan Lisensi Pribadi yang dipegang oleh Prof. Barrow dan ditinjau secara internal oleh Badan Peninjauan Etis dan Kesejahteraan Hewan Universitas Nottingham sebelum dimulainya pekerjaan.

Hasil

Jumlah strain F31 yang layak dalam sel HD11 yang dikultur turun dari Log 3,8 pada 4 jam menjadi 3,7 pada 12 jam. RNA karena itu pulih 8 jam pasca infeksi.

Profil transkripsi bakteri yang diambil dari sel HD11

Pola ekspresi gen strain F31 di lingkungan intramakrofag 8 jam setelah infeksi dan dikelompokkan berdasarkan aktivitas, ditunjukkan pada Tabel 1 dan 2. Gen yang menunjukkan peningkatan signifikan secara statistik dalam ekspresi lebih dari 10 kali lipat ditunjukkan pada Tabel 1. Lebih terbatas seleksi gen mikrobiologis yang sama secara signifikan diregulasi ke bawah ditunjukkan pada Tabel 2. Tujuan akhir dari analisis ini adalah untuk mengembangkan media sintetik yang mereproduksi kondisi ini sedekat mungkin. Untuk alasan ini, analisis lengkap ekspresi gen tidak dilakukan oleh kelas gen COG. Mereka dikelompokkan menurut gen yang mungkin mempengaruhi kelangsungan hidup intraseluler, respon terhadap stres dan ekspresi gen virulensi seperti yang ditunjukkan di bawah ini (i – vi).

- (i) Transpor elektron. Upregulasi oksidoreduktase dan dehidrogenase diduga bertepatan dengan penurunan regulasi nitrat dan nitrit reduktase termasuk *nirBD* (nitrit reduktase), *narGHI* (nitrat reduktase), dan *tidur siang* (nitrat reduktase dengan fungsi tambahan). Piruvat kinase I (*pykF*) dan format dehidrogenase sub-unit I (*fdnG*) juga diatur ke bawah. Hal ini menunjukkan bahwa lingkungan fagolisosom makrofag memiliki nilai redoks yang relatif tinggi seperti yang ditunjukkan oleh Turner dkk. (2003).
- (ii) Sumber karbon. Sejumlah lokus yang berbeda terkait dengan sumber karbon yang dimanfaatkan oleh bakteri menunjukkan perubahan ekspresi meskipun tidak ada gambaran yang jelas. Ada bukti bahwa dikarboksilat digunakan sebagai sumber karbon yang disarankan oleh peningkatan regulasi *dcuB* gen transporter dan regulator diacid *cdar*. Itu *gntR* gen yang mengatur *gnt1* operon yang terkait dengan pemanfaatan glukonat diatur ke atas. Keterlibatan glukonat ditekankan oleh up-regulasi *idnK*, glukonat kinase. Ekspresi dari *glcD* diregulasi. Ini adalah penggerak *glc* operon yang terkait dengan transformasi glikolat menjadi glioksalat, dan karena itu juga dapat dikaitkan dengan tekanan osmotik daripada sumber karbon utama (Núñez dkk., 2001). Regulasinya membutuhkan Integrasi Host Factor yang mempengaruhi virulensi dan respons terhadap kondisi stres. Glyoxalate juga merupakan perantara penting dalam bypass glioksalat yang terlibat dalam asetat atau asam lemak sebagai sumber energi utama (Pellicer dkk., 1999). Karbohidrat lain seperti etanolamin, manosa, dan xilan mungkin juga penting meskipun bukti melalui peningkatan regulasi gen tunggal *eutA*, *gmd*, dan *yieL*, masing-masing tidak kuat seperti yang ditunjukkan oleh perubahan ekspresi gen yang rendah.

Tabel 1. Perubahan ekspresi gen pada *E. coli* F31 dikultur dalam sel HD11 diukur dengan microarray yang diregulasi lebih dari 10 kali lipat setelah 8 jam kultur dalam sel HD11.

Kelas gen	gen	Fungsi atau produk	Berarti perubahan dalam
			ekspresi 8 jam
Transpor elektron	<i>nadaA</i>	Quinolate sintetase A	13,65
	<i>norV</i>	Flavorubredoksin oksidoreduktase	35.2
	<i>SDHA</i>	Subunit flavoprotein suksinat dehidrogenase	11.17
	<i>ycdW</i>	dehidrogenase diduga	21.26
	<i>ydiR</i>	Flavoprotein transfer elektron yang diprediksi, pengikatan FAD	12.13
	<i>ydjG</i>	Oksidoreduktase diduga	13.57
	<i>yehL</i>	ATPase diduga	14.96
	<i>ygcU</i>	FAD diduga mengandung dehidrogenase	11.41
	-	Dihidrolipoamida dehidrogenase diduga	10.68
Sumber karbon	<i>astA</i>	Arginin N-suksiniltransferase	11.69
	<i>atoA</i>	Asetil-KoA: asetoasetil-KoA transferase, subunit beta	10.79
	<i>bglH</i>	Porin membran luar spesifik karbohidrat, samar	19
	<i>cdaR</i>	Pengatur asam karbohidrat	14,79
	<i>ayahX</i>	Alanine racemase 2, katabolik	15.39
	<i>dcuB</i>	Pengangkut C4-dikarboksilat anaerobik DcuB	19.76
	<i>dgoD</i>	2-okso-3-deoksialgalaktonat 6-fosfat aldolase/galaktonat dehidratase	13.05
	<i>eutA</i>	Protein pemanfaatan etanol EutA	15.23
	<i>gclR</i>	Protein pengatur diduga GclR	13.01
	<i>glcC</i>	Aktivator transkripsi operon Glc	14
	<i>gltA</i>	Sitrat sintase	13.18
	<i>gmd</i>	GDP-mannose 4,6-dehidratase	13.11
	<i>idnK</i>	glukonokinase termosensitif	10.84
	<i>bertemu</i>	5,10-metilenatetrahidrofolat reduktase	11.66
	<i>rbsA</i>	Diduga ribosa mengangkut protein pengikat ATP RbsA	13.98
	-	Pengangkut hexuronate diduga	15.61
	<i>wzb</i>	Tirosin fosfatase	13.49
	<i>xapR</i>	Protein pengatur operon santhosine	12.77
	<i>ybbA</i>	Protein transpor tipe ABC diduga YbbA	14,75
	<i>ydjH</i>	Diduga gula kinase	10.84
	<i>ygfT</i>	Diduga rantai beta glutamat sintase bergantung NADPH	18.55
	<i>ygjK</i>	Diduga glikosil hidrolase	13.39
	<i>yieL</i>	Xilanase diduga	13.72
	<i>yphF</i>	Sistem transportasi gula tipe ABC, komponen periplasma YphF	15.39
	-	Protein pengatur diduga, keluarga GntR	20.87
	-	dehidrogenase laktat diduga	10.93

Lanjutan

Kelas gen	gen	Fungsi atau produk	Berarti perubahan dalam
			ekspresi 8 jam
Ion dan transportasi lainnya	<i>cniT</i>	Pengangkut karnitin diduga CniT	11.34
	<i>cysA</i>	Pengangkutan sulfat protein pengikat ATP CysA	11.56
	<i>cysW</i>	Subunit transporter sulfat/tiosulfat CysW	10.66
	<i>entS</i>	Pengangkut MFS EntS/YbdA	10.33
	<i>fepC</i>	Enterobaktin besi mengangkut protein pengikat ATP FepC	13.5
	<i>fes</i>	Enterochelin esterase	12.13
	<i>hidupj</i>	Prekursor protein pengikat Leu/Ile/Val	12.22
	<i>mgIC</i>	Sistem transportasi galaktosida permease protein MglC	23.74
	<i>mntH</i>	Protein transpor mangan MntH	18.8
	<i>tidak ada</i>	Na ⁺ /H antiporter, tergantung pH	10.86
	<i>sbp</i>	Protein pengikat sulfat periplasma	10.39
	<i>tauC</i>	Sistem transportasi taurin menyerap protein TauC	19.85
	<i>ybtU</i>	Protein biosintetik yersiniabactin	17.66
	<i>ydjE</i>	Protein transpor metabolit diduga	13.9
	Fungsi regulasi utama	<i>yejB</i>	Subunit transporter oligopeptida yang diprediksi
<i>bgIJ</i>		BglJ 2-komponen pengatur transkripsi	17.08
<i>rseA</i>		Faktor Sigma-E, protein pengatur negatif	12.6
<i>ycdT</i>		Diguanilat siklase yang diprediksi	22.83
<i>ygaA</i>		Regulator transkripsi yang bergantung pada sigma-54, YgaA	23.69
Permukaan dan virulensi fungsi	<i>bfr</i>	Bakterioferitin, penyimpanan zat besi dan protein detoksifikasi Bfr	17.69
	<i>csgE</i>	Komponen perakitan / transportasi dalam produksi curli	11.24
	<i>eaeH</i>	Melampirkan dan menghapus protein, faktor patogenesis EaeH	12.16
	<i>filmD</i>	Prekursor FimD protein pengantar membran luar	13.79
	<i>sinH</i>	Diduga intimin/invasin (protein mirip SinH)	17.4
	<i>yfcV</i>	Prekursor Yfc fimbriae subunit YfcV diduga	19.6
	-	Prekursor protein FimF	11.67
	<i>wcaF</i>	Diduga biosintesis asam colanic acetyltransferase	11.11
	<i>yohK</i>	Pengangkut seritonin diduga	10.25
	<i>taruhanB</i>	Betaine aldehida dehidrogenase, tergantung NAD	10.58
Respon stres	<i>bertaruh</i>	Protein pengatur BetI	13.57
	<i>cpxP</i>	Penekan periplasma dari regulasi cpx melalui interaksi dengan CpxA	28.27
	<i>htrA</i>	Protease serin periplasma Do, protein kejutan panas HtrA	19.53
	<i>osmC</i>	Protein OsmC yang dapat diinduksi secara osmotik	13.14
	<i>menopang</i>	Pengangkut prolin/betaine	15.89
	<i>pspA</i>	Protein kejut fag A	28.09
	<i>pspE</i>	Prekursor protein E kejutan fag	20.53

Lanjutan

Kelas gen	gen	Fungsi atau produk	Berarti perubahan dalam
			ekspresi 8 jam
Respon stres	<i>recA</i>	Pertukaran untai DNA dan protein rekombinasi dengan aktivitas protease dan nuklease	11.57
	<i>recN</i>	Rekombinasi DNA dan perbaikan protein RecN	14.4
	<i>recX</i>	Protein pengatur untuk RecA	12.03
	<i>rseA</i>	Faktor Sigma-E, protein pengatur negatif	12.6
	<i>rspA</i>	Protein penginderaan kelaparan RspA	10.89
	<i>umuC</i>	Mutagenesis dan perbaikan protein UmuC	33.2
	<i>umuD</i>	Mutagenesis dan perbaikan protein UmuD	17.42
	-	Lisin fag diduga	54.63
	<i>ygaA</i>	Regulator transkripsi yang bergantung pada sigma-54, YgaA	23.68
Aneka ragam	<i>marA</i>	Beberapa protein resistensi antibiotik MarA	12,75
	<i>psiA</i>	PsiA—penghambatan SOS plasmid	10.72
	<i>tran</i>	TraN—protein stabilisasi pasangan kawin	12.8
	<i>traR</i>	TraR—penginderaan kuorum dan plasmid	14.39
	<i>traW</i>	TraW—transfer perakitan pilus F plasmid	15.02

- (iii) Transportasi. Banyak gen transpor yang diregulasi dalam makrofag dikaitkan dengan penyerapan karbohidrat dan sumber karbon potensial lainnya. Ini termasuk permease transportasi galaktosida (*mglC*), protein pengikat C4-dikarboksilat (*dcuB*, disebutkan di atas), pengangkut hexuronate diduga, dan protein transpor untuk oligopeptida (*yejB*), dan asam lemak rantai panjang (*model*). Peningkatan regulasi gen yang mengkode protein transpor ion untuk sulfat (*cysA*, *cysW*, *sbp*, *tauC*), mangan (*mntH*), dan besi ferri (*fepC*, *entS*, *fes*, *ybtU*), dan penyimpanan besi (*bfi*) menunjukkan pembatasan untuk ion-ion ini.
- (iv) Stres. Dibandingkan dengan pertumbuhan NB, bakteri mengalami stres osmotik yang lebih tinggi seperti yang ditunjukkan oleh sejumlah gen yang terkait dengan biosintesis betaine (*taruhanAB*), pengaturnya (*taruhanL*), menopang yang mengangkut baik prolin dan betaine dan *osmC*. Protein terkait stres panas *htrA* dan *cpxP* diatur ke atas. Penekanan pada DNA ditunjukkan oleh up-regulasi *recA* dan pengaturnya *recX*, *recN*, dan *umuC*, dan *umuD*. Ini mungkin juga terkait dengan peningkatan aktivitas profag dengan sejumlah gen yang diatur ke atas termasuk *pspA* dan *pspE*, integrase profag, *intD* dan lisin fag diduga.
- (v) Protein permukaan dan virulensi. Gen virulensi utama up-regulated dikaitkan dengan elaborasi fimbriae (*csgE*, *fimD*, *fimF*, dan *yfcV*) dan adhesin/invasin (*eaeH* dan *sinH*). Salah satu gen biosintesis asam colanic *wcaF* diregulasi. Perubahan ini disertai dengan penurunan regulasi gen yang terkait dengan pembentukan kapsul asam sialat. Gen yang mengkode porin permukaan

OmpF, NmpC, dan prekursor OmpN juga diatur ke bawah.

Konfirmasi tingkat ekspresi gen oleh qRT-PCR tidak dilakukan. Meskipun ada beberapa batasan dalam kisaran intensitas sinyal yang dapat diperoleh dengan microarray, sebagian besar publikasi menunjukkan korelasi yang sangat baik antara tingkat ekspresi yang diukur dengan microarray dan dengan qRT-PCR atau metode kuantitatif lainnya, termasuk *E. coli in vitro* (Richmond dkk., 1999), Enterohaemorrhagic *E. coli* kontak dengan sel kelinci (Dahan dkk., 2004), *S. typhimurium* dalam makrofag murine (Eriksson dkk., 2003), pada sel epitel manusia dan anjing (Hautefort dkk., 2008), usus ayam (Dhawi dkk., 2011; Harvey dkk., 2011) dan dengan empat yang berbeda *Salmonella enterica* serovar dalam sel HD11 (Imre dkk., 2013). **Media sintesis dan pengembangan vaksin**

Hasil microarray menunjukkan perubahan ekspresi gen yang menunjukkan ketersediaan glukonat, suksinat, dan sistein dengan restriksi Fe dan Mn serta cekaman osmotik dan panas, meskipun sumber karbon yang disukai belum jelas. Informasi ini dikombinasikan dengan literatur yang diterbitkan, menunjukkan pH fagosom yang rendah, (Rathman dkk., 1996), digunakan untuk mengembangkan media sintesis (SMM-1), komposisi lengkap yang dijelaskan dalam Bahan dan Metode. Ini digunakan untuk menghasilkan bakterin dari *E. coli* F31 untuk studi vaksinasi. **Percobaan vaksinasi**

Efek perlindungan dari bakteri F31 yang dihasilkan oleh kultur dalam medium SMM-1 terhadap tantangan intravena dari strain O78:K80 F135 dibandingkan dengan yang diinduksi oleh bakteri yang dibuat menggunakan strain yang sama yang dikultur dalam NB ditunjukkan pada Tabel 3.

Meja 2.Perubahan ekspresi gen pada *E. coli*/F31 dikultur dalam sel HD11 diukur dengan microarray yang diatur ke bawah lebih dari 10 kali lipat setelah 8 jam kultur dalam sel HD11.

Kelas gen	gen	Fungsi atau produk	Berarti perubahan dalam ekspresi 8 jam
Transpor elektron dan metabolisme	<i>fdnG</i>	FdnG, subunit alfa dari format dehidrogenase-N	13.92
	<i>tidur siang</i>	Prekursor periplasmik nitrat reduktase	20.72
	<i>tidur siang</i>	Nitrat reduktase, sitokrom c-type, periplasmic	15.05
	<i>narG</i>	Nitrat reduktase 1, subunit alfa	16.09
	<i>narH</i>	Nitrat reduktase 1, subunit beta (Fe-S)	10.38
	<i>tidak</i>	Respirasi nitrat reduktase 1 rantai gamma	11.15
	<i>nirB</i>	Nitrit reduktase, subunit besar, pengikatan NAD(P)H	17.43
	<i>nirD</i>	Subunit nitrit reduktase (NAD(P)H)	20.94
	<i>pykF</i>	Piruvat kinase 1	15.72
Permukaan dan virulensi fungsi	<i>kpsC</i>	Kapsul polisakarida ekspor protein KpsC	13.53
	<i>kpsM</i>	Protein transpor asam polisialat KpsM	14.68
	<i>kpsS</i>	Protein sintesis kapsul asam polisialat KpsS	12.56
	<i>kpsT</i>	Asam polisialat mengangkut protein pengikat ATP KpsT	16.01
	<i>nuA</i>	Asilneuraminat cytidyltransferase	50.32
	<i>neuB</i>	Sintase asam sialat NeuB	24.04
	<i>nuC</i>	Protein biosintesis asam polisialat	45,91
	<i>nuD</i>	Sintase asam sialat NeuD	32.51
	<i>nuS</i>	Poly-alpha-2,8 sialosyl sialyltransferase NeuS	42,5
	<i>nmpC</i>	Prekursor NmpC	41.75
	<i>ompF</i>	OmpF	38.29
<i>ompN</i>	Prekursor protein N membran luar	34.26	

Tak satu pun burung menunjukkan tanda-tanda penyakit. Sampel jaringan dari proporsi unggas baik dari unggas yang tidak divaksinasi maupun yang telah divaksinasi dengan bakterin yang dibuat dari NB tetap terinfeksi sementara unggas yang divaksinasi dengan bakterin yang dikultur dalam media SMM-1 sintetis telah membersihkan bakteri tantangan dari jaringannya hampir pada hari ke-4 pasca-tantangan.

Perbandingan jumlah sampel dari mana galurantang diisolasi mengungkapkan perbedaan yang signifikan secara statistik antara kelompok kontrol yang tidak divaksinasi dan kelompok vaksin NB ($\chi^2= 3,75, p=0,05$), dan antara kelompok media kontrol dan sintetis ($\chi^2= 8.45, p < 0,01$) tetapi tidak ada perbedaan yang signifikan secara statistik antara kedua kelompok nutrisi dan kelompok medium sintetis ($\chi^2= 1.01, p=0.4$). Perbedaannya lebih terlihat pada sampel darah dan limpa daripada jumlah bakteri di hati. Dibandingkan dengan kelompok kontrol, tingkat signifikansi untuk kelompok medium sintetis lebih tinggi daripada kelompok bakterin NB.

Diskusi

Vaksinasi lebih diinginkan daripada kemoterapi untuk mengendalikan APEC. Perlindungan dini dimediasi oleh high

titer antibodi spesifik yang bersirkulasi mungkin penting seperti yang ditunjukkan oleh perlindungan terhadap unggas parenteral *Salmonella* infeksi menggunakan vaksin Salenvac komersial yang merangsang antibodi titer tinggi (Woodward dkk., 2002). Antibodi titer tinggi berkorelasi sampai batas tertentu dengan perlindungan ditunjukkan oleh fakta bahwa antibodi yang ditransfer secara pasif dapat melindungi terhadap tantangan dengan strain homolog (Arp, 1980; Bolin dan Jensen, 1987; Kariyawasam dkk., 2004).

Tujuan akhir dari analisis ini adalah untuk mengembangkan media sintetis yang mereproduksi kondisi ini sedekat mungkin. Untuk alasan ini, analisis lengkap ekspresi gen tidak dilakukan oleh kelas gen COG. Mereka dikelompokkan menurut gen yang mungkin mempengaruhi kelangsungan hidup intraseluler, respon terhadap stres, dan ekspresi gen virulensi.

Studi microarray kami di sini dirancang untuk mengidentifikasi gen yang mungkin memengaruhi kelangsungan hidup intra-seluler, respons terhadap stres, dan ekspresi gen virulensi. Meskipun analisis rinci ekspresi gen tidak dilakukan, jelas bahwa percobaan menunjukkan bahwa *E. coli*/O78:K80 ketika terbentuk di dalam makrofag unggas, menunjukkan pola fisiologi yang berbeda dari pertumbuhan di

Tabel 3. Pengaruh vaksinasi dengan bakterin yang dihasilkan oleh kultur di NB atau SMM-1 pada jumlah *E. coli* F135 dalam jaringan ayam yang ditantang secara intravena. Catatan (\bar{x} + SD) dari *E. coli* F135 dalam darah, hati atau limpa bersama dengan jumlah ayam pada setiap kelompok dari mana galur tantang diisolasi.

Hari	Sedang			Sintetis			Kontrol		
	Darah	Limpa	Hati	Darah	Limpa	Hati	Darah	Limpa	Hati
Hari 1	Berarti	0,93± 1,92	3,29± 0,31	0,94± 1,93	1,49± 1,08	2,97± 0,99	1,27± 1,66	1,93± 1,10	3,53± 0,55
	Tidak +ves	1 dari 5	5 dari 5	1 dari 5	3 dari 5	5 dari 5	2 dari 5	4 dari 5	5 dari 5
Hari ke-2	Berarti	<1+ 0,00	1,9± 0,69	1,08± 2,23	1,16± 1,84	2,15± 1,70	1,01± 1,88	0,9± 1,16	2,56± 1,04
	Tidak +ves	0 dari 5	5 dari 5	1 dari 5	2 dari 5	4 dari 5	2 dari 5	2 dari 5	5 dari 5
Hari 4	Berarti	<1+ 0,00	<1+ 0,00	<1+ 0,00	<1+ 0,00	0,58± 0,72	0,88± 1,79	0,69± 1,36	0,78± 1,56
	Tidak +ves	0 dari 5	0 dari 5	0 dari 5	0 dari 5	2 dari 5	1 dari 5	1 dari 5	1 dari 5
Hari 7	Berarti	<1+ 0,00	<1+ 0,00	<1+ 0,00	0,32± 0,70	0,27± 0,54	0,22± 0,40	1,08± 1,50	0,37± 0,85
	Tidak +ves	0 dari 10	0 dari 10	0 dari 10	1 dari 10	1 dari 10	1 dari 10	4 dari 10	1 dari 10
Total +ve/organ		1 Of 25	10 dari 25	2 dari 25	6 dari 25	10 dari 25	6 dari 25	11 dari 25	12 dari 25
TOTAL +ve			12 dari 75		18 dari 75			29 dari 75	

media RPMI cair. Perubahan ini termasuk kecenderungan menuju respirasi dengan oksigen sebagai akseptor elektron terminal yang menunjukkan bahwa oksigen tersedia sebagai akseptor elektron yang disukai. Ada indikasi dari gen individu (*gntR*, *gmd*, *glcC*, *ylieL*, dan *dcuB*) bahwa karbohidrat yang berbeda (glukonat, manosa, glikolat, xilan, dan asam dikarboksilat, masing-masing) mungkin telah digunakan tetapi gambarannya tidak jelas dari sejumlah kecil gen yang terlibat dalam setiap kasus. Stres osmotik ditunjukkan oleh ekspresi *osmY* dan *osmC* (Yim dan Villarejo, 1992) dan the *proU* operon yang mengkodekan sistem transpor untuk glisin, betaine, dan prolin, dua senyawa osmoprotektan (Haardt dkk., 1995). Dengan tidak adanya informasi yang solid tentang pentingnya asam amino untuk *E. coli* dalam makrofag, informasi diambil dari literatur dan dari Imre dkk. (2013) untuk mengembangkan SMM-1. Mangan dihilangkan dan ketersediaan besi dibatasi dengan penambahan 2, -2-dipiridil. Osmolaritas disesuaikan dengan K dan Na untuk aktivitas air kurang dari itu di RPMI.

Media SMM-1 jelas tidak mencerminkan semua kondisi di dalam makrofag. Ini adalah perkiraan karena sumber karbon utama tidak jelas dan kami memodelkan ini untuk memasukkan pengurangan ketersediaan glukosa. Studi lebih lanjut dapat mengevaluasi ini secara lebih rinci dan memasukkan inkubasi pada suhu yang lebih dekat dengan suhu burung (41,5 °C) yang juga dapat menyebabkan imunogenisitas dan perlindungan yang lebih baik. Bakterin yang dihasilkan oleh kultur dalam media sintetik menghasilkan tingkat perlindungan di atas kontrol yang lebih signifikan secara statistik daripada bakterin yang dihasilkan oleh kultur di NB. Kami mengusulkan bahwa pendekatan tersebut dapat digunakan untuk beberapa bakteri patogen yang vaksin inaktifnya masih diproduksi secara teratur dan pendekatan ini memerlukan penyelidikan lebih lanjut.

Pendanaan

Penulis yang bersangkutan ingin mengucapkan terima kasih atas dukungan keuangan dari Pemerintah Federal Lower Saxony (SLP137) dan Dewan Penelitian Bioteknologi dan Ilmu Biologi (BBSRC), Penghargaan Kemitraan Cina Inggris (CPA 1497) kepada Barrow. **Konflik kepentingan**

Para penulis tidak memiliki konflik kepentingan yang terkait dengan pekerjaan ini.

Kontribusi penulis

Semua penulis setuju untuk berpartisipasi dalam karya dan publikasinya. Barrow dan Windhorst menyusun studi dan Barrow dan Elazomi menulis dan mengedit naskah. Pekerjaan itu dilakukan oleh Zhou, Imre, Bukovinski dan Ruggeri (pekerjaan microarray), Richards (pengembangan vaksin) dan Barrow (pekerjaan hewan).

Referensi

Arp, LH 1980. Konsekuensi dari aktif atau pasif imunisasi kalkun terhadap *Escherichia coli* O78. Avian Dis. 24, 808–815.

- Barrow, PA dan Lovell, MA 1989. Invasi Vero sel oleh *Salmonella* maraga. J. Med. Mikrobiol. 28, 59–67.
- Barrow, PA, Lovell, MA dan Berchieri, A. Jnr. 1998. Penggunaan bakteriofag litik untuk kontrol eksperimental *Escherichia coli* septikemia dan meningitis pada ayam dan anak sapi. klinik Diagnosa. Laboratorium. kekebalan. 5, 294–298.
- Beug, H., von Kirchbach, A., Doderlein, G., Hati Nurani, JF dan Graf, T. 1979. Sel-sel hematopoietik ayam yang ditransformasikan oleh tujuh galur virus leukemia unggas yang rusak menunjukkan tiga fenotipe diferensiasi yang berbeda. Sel 18, 375–390.
- Bolin, CA dan Jensen, AE 1987. Pasif imunisasi dengan antibodi terhadap protein membran luar yang diatur besi melindungi kalkun dari *Escherichia coli* keracunan darah. Menulari. kekebalan. 55, 1239–1242.
- Dahan, S., Knutton, S., Shaw, RK, Crepin, VF, Dougan, G. dan Frankel, G. 2004. Transkriptome Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157 melekat pada membran plasma eukariotik. Menulari. kekebalan. 72, 5452–5459.
- Dhawi, AA, Elazomi, A., Jones, M., Lovell, MA, Li, H., Emes, RD dan Barrow, PA 2011. Adaptasi usus ayam pada *Salmonella* Enteritidis PT4 dipelajari dengan analisis transkripsi. Dokter hewan. Mikrobiol. 153, 198–204.
- Dho-Moulin, M. dan Fairbrother, JM 1999. Avian patogen *Escherichia coli* (APEC). Dokter hewan. Res. 30, 299–316.
- Dziva, F., Hauser, H., Connor, TR, van Diemen, PM, Prescott, G., Langridge, GC, Eckert, S., Chaudhuri, RR, Ewers, C., Mellata, M., Mukhopadhyay, S., Curtiss II, R., Dougan, G., Wieler, LW, Thomson, NR, Pickard, DJ dan Stevens, MP 2013. Urutan dan anotasi fungsional dari strain *Escherichia coli* serogrup O78 patogen unggas mengungkapkan evolusi garis keturunan *E. coli* patogen untuk unggas melalui mekanisme yang berbeda. Menulari. kekebalan. 81, 838–849.
- Dziva, F. dan Stevens, MP 2008. Colibacillosis di unggas: mengungkap dasar molekuler virulensi patogen unggas *Escherichia coli* dalam inang alami mereka. Avian Pathol. 37, 355–366.
- Eriksson, S., Lucchini, S., Thompson, A., Rhen, M. dan Hinton, JC 2003. Mengungkap biologi infeksi makrofag dengan profil ekspresi gen intraseluler *Salmonella enterica*. mol. Mikrobiol. 47, 103–118.
- Gyles, CL dan Fairbrother, JM 2010 *Escherichia coli*. Dalam: Patogenesis infeksi bakteri pada hewan. Eds., Gyles, CL, Prescott, JF, Songer, JG dan Thoen, CO Ames, IO: Wiley-Blackwell, hlm: 267–308.
- Haardt, M., Kempf, B., Faatz, E. dan Bremer, E. 1995. Prolin betaine osmoprotektan adalah a substrat utama untuk sistem transportasi yang bergantung pada protein pengikat ProU of *Escherichia coli* K-12. mol. Gen. Genetika 246, 783–786.
- Harvey, PC, Watson, M., Hulme, S., Jones, MA, Lovell, MA, Berchieri, A. Jr., Young, J., Bumstead, N. dan Barrow, PA 2011. *Salmonella enterica* serovar typhimurium yang menjajah lumen usus ayam tumbuh perlahan dan meningkatkan regulasi gen virulensi dan metabolisme yang unik. Menulari. kekebalan. 79, 4105–4121.
- Hautefort, I., Thompson, A., Eriksson-Ygberg, S., Parker, ML, Lucchini, S., Danino, V., Bongaerts, RJ, Ahmad, N., Rhen, M. dan Hinton, JC 2008. Selama infeksi sel epitel *Salmonella enterica* serovar typhimurium mengalami adaptasi transkripsi tergantung waktu yang menghasilkan ekspresi simultan dari tiga sistem sekresi tipe 3. Sel. Mikrobiol. 10, 958–984.
- Imre, A., Bukovinski, A., Lovell, MA, Li, H., Zhou, X. dan Barrow, PA 2013. Analisis ekspresi gen *Salmonella enterica* SPI dalam makrofag menunjukkan perbedaan antara serovar yang menginduksi penyakit sistemik dari yang biasanya menyebabkan enteritis. Dokter hewan. Mikrobiol. 167, 675–679.
- Johnson, TJ, Kariyawasam, S., Wannemuehler, Y., Mangiamele, P., Johnson, SJ, Doetkott, C., Skyberg, JA, Lynne, AM, Johnson, JR dan Nolan, LK 2007. Urutan genom patogen unggas *Escherichia coli* strain O1:K1:H7 memiliki kesamaan yang kuat dengan patogen ekstraintestinal manusia *E. coli* genom. J. Bakteri. 189, 3228–3236.
- Kariyawasam, S., Wilkie, BN dan Gyles, CL 2004. Ketahanan ayam broiler terhadap *Escherichia coli* infeksi saluran pernapasan yang disebabkan oleh antibodi kuning telur yang ditransfer secara pasif. Dokter hewan. Mikrobiol. 98, 273–284.
- Mangiamele, P., Nicholson, B., Wannemuehler, Y., Seemann, T., Logue, CM, Li, G., Tivendale, KA dan Nolan, LK 2013. Urutan genom lengkap patogen unggas *Escherichia coli* strain APEC O78. Pengumuman Genom. 1(2), e0002613; doi: 10.1128/genomA.00026-13
- Miles, AA, Misra, SS dan Irwin, JO 1938. The perkiraan kekuatan bakterisida darah. J. Kebersihan (Lond) 38, 732–749.
- Nolan, LK, Barnes, HJ, Vaillancourt, JP, Abdul-Aziz, T. dan Logue, CM 2013. Colibacillosis. Dalam: Penyakit unggas. Ed. Swayne, DE edisi ke-13. Ames, IO: Wiley-Blackwell. hal: 751–805.
- Núñez, MF, Pellicer, MT, Badía, J., Aguilar, J. dan Baldomà, L. 2001. Gen yghK terkait dengan operon glc dari *Escherichia coli* mengkode permease untuk glikolat yang secara struktural dan fungsional mirip dengan permease L-laktat. Mikrobiologi 147, 1069–1077.

- Pellicer, MT, Fernandez, C., Badía, J., Aguilar, J., Lin, EC dan Baldom, L. 1999. Induksi silang operon glc dan ace dari *Escherichia coli* disebabkan oleh persimpangan jalan. Karakterisasi promotor glc. *J. Biol. Kimia* 274, 1745-1752.
- Picault, JP, Giraud, P., Drouin, P., Guittet, M., Bennejean, G., Lamande, J., Toquin, D. dan Gueguen, C. 1987. Isolasi virus seperti TRTV dari ayam dengan sindrom kepala bengkak. *Dokter hewan. Rek.* 121, 35.
- Rathman, M., Sjaastad, MD dan Falkow, S. 1996. Pengasaman fagosom yang mengandung *Salmonella typhimurium* dalam makrofag murine. *Menulari. kekebalan.* 64, 2765–2773.
- Richmond, CS, Glasner, JD, Mau, R., Jin, H. dan Blattner, FR 1999. Pembuatan profil ekspresi genom di *Escherichia coli* K-12. *Asam Nukleat Res.* 27, 3821–3835.
- Smith, HW, Cook, JKA dan Parsell. ZE 1985 infeksi eksperimental ayam dengan campuran virus bronkitis menular dan *Escherichia coli*. *J. Gen. Virol.* 66, 777–786.
- Turner, AK, Barber, LZ, Wigley, P., Muhammad, S., Jones, MA, Lovell, MA, Hulme, S. dan Barrow, PA 2003. Kontribusi protein translokasi proton terhadap virulensi *Salmonella enterica* serovar typhimurium, *S. gallinarum* dan *S. Dublin* pada ayam dan tikus. *Menulari. kekebalan.* 71, 3392–3401.
- Wang, XM, Liao, XP, Zhang, WJ, Jiang, HX, Sun, J., Zhang, MJ 2010. Prevalensi serogrup, genotipe virulensi, resistensi antimikroba, dan latar belakang filogenetik patogen unggas *Escherichia coli* di selatan Cina. *Patogen bawaan makanan Dis.* 7, 1099-1106.
- Woodward, MJ, Gettinby, G., Breslin, MF, Corkish, JD dan Houghton, S. 2002. Kemanjuran Salenvac, a *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* serotype Enteritidis iron-restricted bacterin vaksin, pada ayam petelur. *Avian Pathol.* 31, 383–392.
- Yim, HH dan Villarejo, M. 1992. osmY, baru gen yang dapat diinduksi secara hiperosmotik, mengkode protein periplasma dalam *Escherichia coli*. *J. Bakteri.* 174, 3637–3644.

JURNAL ASLI
(DOKUMEN
SUMBER)



Contents lists available at ScienceDirect

The Veterinary Journal

journal homepage: www.elsevier.com/locate/tvj

Characteristics (sensitivity and specificity) of herd-level diagnostic tests for *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in cattle — A systematic review

N.L. Field^{a,b,*}, J.F. Mee^a, C.G. McAloon^b^a Animal and Bioscience Research Department, Dairy Production Research Centre, Teagasc, Moorepark, Fermoy, Co. Cork, P61 P302, Ireland^b Section of Herd Health and Animal Husbandry, School of Veterinary Medicine, University College Dublin, D04 W6F6, Ireland

ARTICLE INFO

Keywords:

Cattle
Diagnostic tests
Herd sensitivity
Herd specificity
Paratuberculosis

ABSTRACT

Diagnostic tests for Johne's disease in cattle are characterised by poor sensitivity and often imperfect specificity at the animal level. Because farmers and veterinarians have limited assurance or confidence from results of testing individual animals for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP), control programmes based on whole herd-level testing provide the best framework for classifying herds. At the herd level, there is a diverse range of testing options for MAP based on both direct and indirect testing of individual and pooled samples. The most common measures of herd test performance, herd sensitivity (HSe) and herd specificity (HSp), are important for decision-making in herd test selection, for estimating prevalence and as inputs for simulation studies. This systematic review investigated the results of herd test evaluations for MAP in cattle, through a comprehensive search of the literature and a systematic four-stage screening process to identify relevant publications.

Forty-six publications with relevant results were eligible for inclusion in the final review, containing evaluations of whole-herd ELISA serological testing, bulk milk tank ELISA, culture, PCR and phage testing, pooled faecal testing and environmental sample testing. Data extracted from each publication included sample populations, methods of analysis, reference tests, cut-off points, HSe and HSp. Direct comparisons between the reported HSe and HSp estimates of different studies is challenging due to the variations in herd prevalence and test protocols used. The data in this systematic review will benefit decision-makers and researchers and highlights knowledge gaps requiring further research.

Introduction

Johne's disease is a bacterial infection affecting both ruminants and non-ruminants caused by *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP). Cattle are usually infected as calves and can develop clinical signs as adults, including progressive diarrhoea, weight loss and eventual death (Sweeney, 2011). Johne's disease is of concern to dairy industries worldwide due to its impact on animal health and economic losses from reduced productivity (Ott et al., 1999; Garcia and Shalloo, 2015; McAloon et al., 2016b), but also due to reported associations with Crohn's disease in humans (Feller et al., 2007; Waddell et al., 2015). Although a causative link between MAP and Crohn's disease has not been established, there is evidence that MAP can survive the pasteurisation process (Grant et al., 2002). Dairy industries have therefore

applied the precautionary principle to protect both public health and maintain consumer confidence in dairy products, by acting to control MAP at the farm-level.

Control of MAP relies on a combination of testing, culling and management strategies to break the cycle of transmission between and within herds. The performance of diagnostic tests for MAP at the individual animal level was comprehensively reviewed by Nielsen and Toft (2008), who described the change in sensitivity and specificity of tests for MAP as the disease progresses through infected, infectious and affected stages. In that review, ELISA tests were reported to have a sensitivity (Se) and specificity (Sp) of 7–22% and 85–100% respectively, while faecal culture was reported as having a Se and Sp of 23–29% and 98% respectively. The low Se of available tests in individual animals provides low assurance of the presence or absence of MAP infection.

* Corresponding author.

E-mail address: Niamh.field@teagasc.ie (N.L. Field).<https://doi.org/10.1016/j.tvj.2022.105786>

Available online 10 January 2022

1090-0233/© 2022 The Authors. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Control programmes therefore emphasise testing and classification at the herd level rather than at the individual level, and most national control programmes have adopted strategies based on both herd testing and on-farm controls to reduce prevalence (Geraghty et al., 2014).

Testing for MAP at the herd level is important for case (herd) detection, herd assurance (or confidence of freedom), and herd-level (national) prevalence estimations. There are various testing strategies for these objectives and the key test performance parameters at the herd level are herd sensitivity (HSe) and herd specificity (HSp). Numerous field studies and simulation models have evaluated different test methods for MAP at the herd level. However, to the authors knowledge there has been no published review of the synthesis of outcomes from these studies. This systematic review aims to summarise the estimates of HSe and HSp from previously published test evaluations for the various herd-level test methods.

Materials and methods

Inclusion and exclusion criteria

Publications from any year were included if they were written in English, available in full-text or conference abstracts form, had cattle as the species of interest (either dairy or beef) and contained an evaluation of herd sensitivity and/or herd specificity of a diagnostic test method for MAP. If articles were not based upon original research data (reviews and meta-analyses) they were removed after searching their reference lists for additional relevant articles. Any article published after completion of the literature search (31 July 2020) was not included in the systematic review.

Search strategy

Web of Science (WoS) and Scopus were used to conduct a comprehensive search online. Slightly different keywords were used for each search engine, due to the varying relevance of results between them. The search terms were selected through consultation with co-authors and are fully described in the Supplementary material for this paper. Conference proceedings from all years of the International Colloquium on Paratuberculosis (ICP),¹ were also manually searched for relevant abstracts and papers.

Selection process

The results from WoS and Scopus were combined into a four-stage evaluation process:

Stage 1: Duplicate articles were removed. The titles of all results were scanned. Titles that were obviously irrelevant, or those referring to a species other than cattle, were excluded.

Stage 2: The abstracts of the remaining articles were read. Articles not written in English, articles with an obviously irrelevant subject, and articles referring to a species other than cattle, were excluded.

Stage 3: Reference lists of the remaining relevant articles were mined and ICP proceedings manually searched to identify additional relevant abstracts and papers.

Stage 4: The remaining articles and conference abstracts were read fully. Any publications that did not have numerical test evaluation results for herd sensitivity or herd specificity were excluded. Publications that used simulated or artificial samples were excluded. Publications evaluating a herd screening strategy that merged two different test methods were excluded if results could not be interpreted for each test separately. Publications evaluating test methods that are no longer available, such as radiometric culture were also excluded. All simulation

modelling studies with relevant results were included.

Data extraction

The following data were recorded for each publication, where applicable: author/s, year, country of origin, test(s) under evaluation, method of analysis, reference test, reference test cut-off point, sample population and evaluation result (HSe, HSp). Some articles contained more than one test evaluation. Test evaluations in a publication were considered unique if they involved the use of separate test methods/kits or different reference tests. Methods of analysis for each test evaluation were divided into three categories: classical test evaluation methods, latent class analysis and simulation modelling. Many studies reported multiple estimates for HSe and HSp, corresponding to a range of cut-off points or thresholds of within-herd prevalence of infection (WHP). Therefore, if an overall estimate for HSe and/or HSp was given in the results this was extracted, otherwise the most relevant estimates were extracted with footnotes specifying the reason for this in each case. Calculations of HSe and HSp were performed where the publication did not explicitly report these parameters but data in results allowed for derivation, and this was noted in footnotes where applicable.

Results

Results of the four-stage evaluation process are described in Fig. 1. Briefly, online searches using WoS and Scopus returned 531 publications. Subsequently 471 publications were excluded (duplicates, irrelevant title, irrelevant abstract, wrong species). Five additional relevant publications were mined from the reference lists of remaining papers and eight relevant publications were identified in a manual search of ICP proceedings. Seventy-three publications were then read fully and assessed for eligibility, with 27 subsequently excluded. The final review included 46 publications, containing 83 relevant test evaluations.

Serology-based test methods

Whole-herd ELISA testing

Herd sensitivity (HSe) and herd specificity (HSp) estimates from studies using whole-herd ELISA testing (WHT-ELISA) are summarised in Table 1. HSe ranged from 40% to 100%, and HSp from 0 to 96%. Field studies using a case definition of at least one seropositive animal to define a herd as positive reported HSe estimates between 83 and 100% (Table 1). A simulation study evaluating WHT-ELISA (Tavornpanich et al., 2008) reported the HSe and HSp of two different serum ELISAs, stratified across various sample sizes and levels of WHP. The model determined that HSe of WHT-ELISA was relatively high compared to other herd testing strategies, but HSp did not increase above 91% in any scenario.

In all other studies with a minimum of one seropositive animal as the case definition, HSp estimates ranged from 0 to 65.5% (Table 1). Changing the case definition of a positive herd to require more seropositive animals increased the HSp, but only up to 96% (Lavers et al., 2014). Lombard et al. (2006a) and Lavers et al. (2014) were similar studies in terms of sample population, and used a case definition of $\geq 2\%$ seroprevalence and whole-herd faecal culture as the standard reference test. The reported HSe from these two studies were similar (approximately 60%). Studies that estimated HSe from the results of whole-herd individual ELISA testing reported higher estimates for HSe than those using faecal culture as a reference test (Hendrick et al., 2005; Chaffer et al., 2008). Using a Bayesian latent class analysis, Cook et al. (2009) estimated a HSe and HSp of 95–100% and 47–53%, respectively, for WHT-ELISA.

¹ See: International Association for Paratuberculosis. www.paratuberculosis.net (Accessed 21 December 2021).

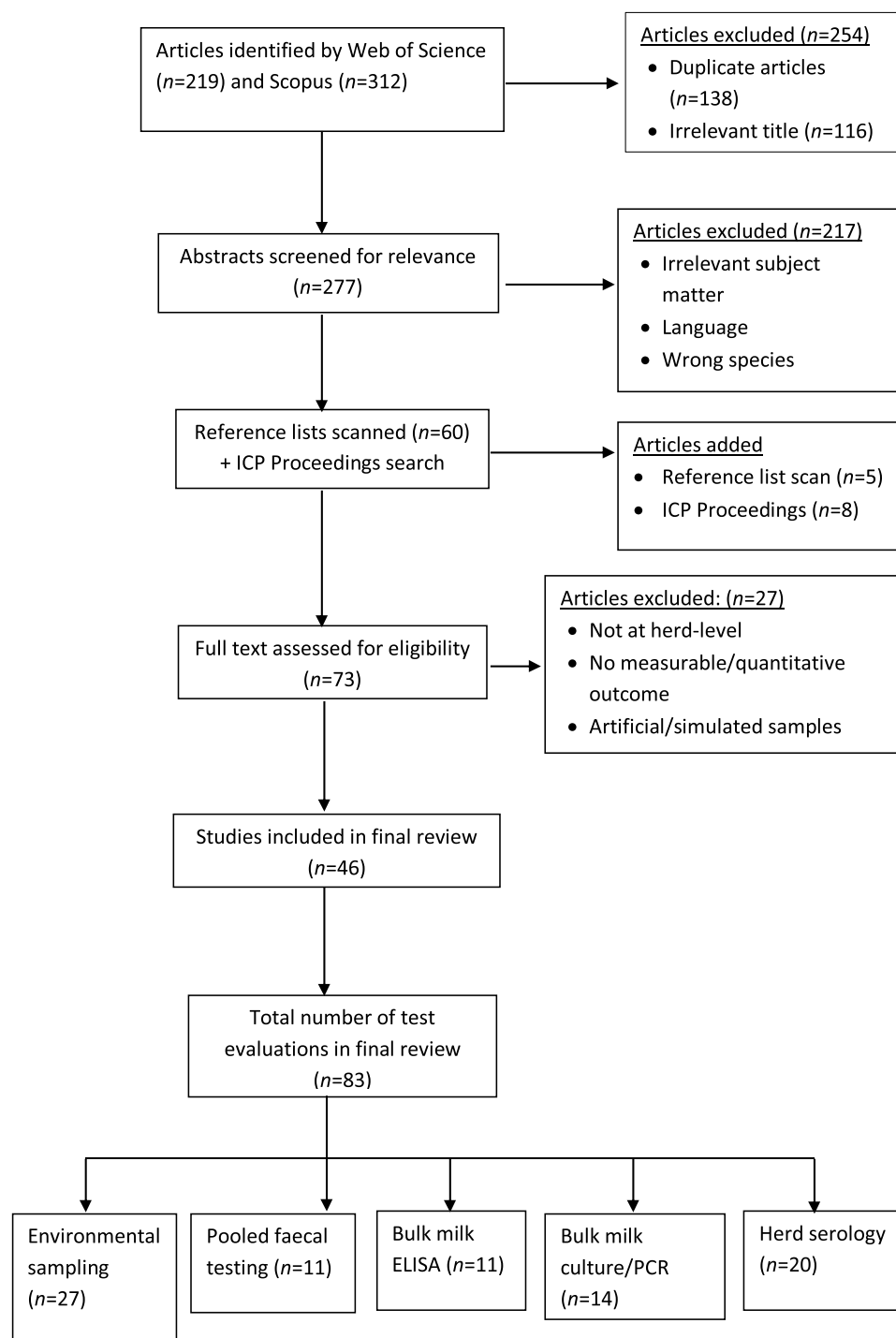


Fig. 1. Flowchart showing the screening and appraisal process for publications identified in the literature search.

Whole-herd ELISA testing with follow-up faecal culture or PCR of seropositive animals

To overcome the imperfect HSp of WHT-ELISA, some studies evaluated the strategy of testing seropositive animals in series with faecal culture or faecal PCR. The sensitivity of individual faecal culture (IFC) at the animal level has been reported to be 25% for the target condition “infected” (Nielsen and Toft, 2009) and IFC is assumed to have 100% HSp. The low sensitivity of IFC leads to a reduced HSe compared to WHT-ELISA, particularly in low-prevalence herds, as demonstrated by Tavornpanich et al. (2008): at 5% WHP, HSe ranged from 9% to 38% but as WHP increased to 16%, HSe increased ranging from 22% to 73%.

Wells et al. (2002) evaluated this strategy in a field study of 64 dairy herds and estimated a HSe of 86%. This is a small decrease on the estimate of 95% for HSe of WHT-ELISA in that study. Using a simulation model evaluating various national herd screening strategies for Irish dairy herds, Sergeant et al. (2019) estimated the HSe of milk-based ELISA (mELISA) and serum-based ELISA (sELISA) with follow-up faecal testing to be >60% for both sample types.

Targeted or random serological sampling

Wells et al. (2002) evaluated the HSe of an ELISA for a random sample of 30, 40 or 50 animals in a herd with follow-up faecal culture of

Table 1
Published herd sensitivities (HSe) and herd specificities (HSp) for whole herd MAP milk (mELISA) and serum (sELISA) ELISAs.

Test evaluated	Positive herd definition	Type of analysis	Sample population	Reference Test	Reference test cut-off	HSe (%)	HSp (%)	Country	Author(s)
sELISA (HerdChek, IDEXX)	≥1 seropositive animal	Classical test evaluation	64 dairy herds, convenience sample	IFC ^a (HEYM)	≥1 positive faecal culture	95	Mis-classified all 8 culture-negative herds	USA	Wells et al. (2002)
sELISA (HerdChek, IDEXX)	≥1 seropositive animal	Classical test evaluation	50 dairy herds, stratified random selection	sELISA (HerdChek, IDEXX)	≥1 seropositive animal	88.9	42.8	Canada	Hendrick et al. (2005)
	≥2 seropositive animals				≥2 seropositive animals	82.8	79.5		
mELISA (Antel Biosystems)	≥1 seropositive animal	Classical test evaluation		mELISA (Antel Biosystems)	≥1 seropositive animal	91.9	65.5		
	≥2 seropositive animals				≥2 seropositive animals	86.9	94.4		
sELISA (Not specified)	≥1 seropositive animal	Simulation model	5% WHP 10% WHP 15% WHP			40 48 56	69 69 69	Switzerland	Antognoli et al. (2005)
sELISA (Paracheck, CSL)	≥1 seropositive animal	Classical test evaluation	35 dairy herds – stratified random selection	IFC (multiple methods)	≥1 positive faecal culture	83.3		USA	Lombard et al. (2006a)
mELISA (Antel Biosystems)	≥1 seropositive animal				≥2% seroprevalence	≥1 positive faecal culture	61.1		
	≥2% seroprevalence	Classical test evaluation	35 dairy herds – stratified random selection		≥1 positive faecal culture	61.1			
sELISA (HerdChek, IDEXX)	3.16% seroprevalence (optimised cut-off point)	Classical test evaluation	74 dairy herds, convenience sample	sELISA (HerdChek, IDEXX) + confirmatory IFC ^a (HEYM)	≥1 positive faecal culture	70.4	83.3	Israel	Chaffer et al. (2008)
sELISA (HerdChek, IDEXX)	≥1 seropositive animal	Simulation model	19 dairy herds, convenience sample			82–100 ^b	≤21	USA	Tavornpanich et al. (2008)
sELISA (Paracheck, CSL)	≥1 seropositive animal					54–100 ^b	≤91		
sELISA (Pourquier)	≥1 seropositive animal	Bayesian analysis	136 dairy herds, convenience sample	BMT-PCR (IS900) + PFC ^a (Trek ESP)	≥1 positive test result	95–100	47–53	United Kingdom	Cook et al. (2009)
mELISA (Parachek2, Prionics)						59	80		Lavers et al. (2014)
mELISA (IDEXX)	≥2% seroprevalence ^c	Classical test evaluation	34 dairy herds, convenience sample	Repeated PFC (ESP Para-JEM)	≥1 positive faecal culture	56	96	Canada	
mELISA (IDVet)						63	92		

WHP, within-herd prevalence of infection; sELISA, serum-based ELISA; mELISA, milk-based ELISA; IFC, individual faecal culture; HEYM, Herrold's Egg Yolk Medium; BMT-PCR, bulk milk tank PCR; PFC, pooled faecal culture.

^a Confirmatory assay not used or not specified.

^b Range of results reported for three WHP levels (5%, 16% and 35%) and five sample sizes (30, 60, 90, 120 and 150 animals).

^c Results reported for three seroprevalence cut-offs (1%, 2% and 3%) in publication; 2% cut-off selected as this is the most common cut-off point reported in the literature.

seropositive animals. The HSe for sampling 30 animals was estimated to be 61%, increasing to 68% and 72% when 40 and 50 animals were sampled, respectively. A simulation study by Antognoli et al. (2005) estimated a HSe and HSp of 20–32% and 84% respectively, when 50% of cows over three years old were ELISA tested per herd.

Tavornpanich et al. (2006) reported a detection probability of 23% for a herd with true prevalence of 9%, when 30 cows were randomly selected for ELISA and follow-up faecal culture. This increased to 47% for a herd with 20% true prevalence. Detection probabilities increased 1.1- to 1.6-fold when conducting targeted sampling of 30 cows in the third lactation. The authors of the study did not use the term “herd sensitivity” as the output from the simulation was derived from a single herd. Similarly, a study by Hanks et al. (2014) compared random sampling to targeted sampling for milk serology and estimated the

probability of detecting a seropositive cow increased from 84% to 95% when using targeted sampling based on milk production data.

Bulk milk tank ELISA testing

HSe and HSp estimates from bulk milk tank (BMT) ELISA investigations are summarised in Table 2. With the exception of one study, the HSp of the BMT ELISA for MAP is reported to be between 95–100%, when using the sample to positive ratio (S/P) cut-off values recommended by the manufacturers. Pesqueira et al. (2017) reported low HSp estimates of 53 and 71% for two BMT ELISA kits, which may be explained by the case definition being any herd with >0% seroprevalence, and a cut-off point defined as a threshold value of corrected OD that corresponded to the 0% seroprevalence category. In contrast, Van

Table 2
Published herd sensitivities (HSe) and herd specificities (HSp) for bulk milk tank (BMT) ELISA testing.

Test evaluated	Test cut-off	Type of analysis	Sample population	Reference test	Reference test cut-off point	HSe (%)	HSp (%)	Country	Author(s)	
BMT ELISA (non-commercial adapted ELISA)	ODc: 0.02 ^a	Classical test evaluation	45 confirmed-infected and 96 presumed non-infected dairy herds	None		97	83	Denmark	Nielsen et al. (2000)	
	ODc: 0.08 ^a					56	100			
BMT ELISA (Pourquier)	Manufacturer's cut-off	Classical test evaluation	52 ELISA-positive dairy herds	sELISA (Pourquier)	None given	30.1		Italy	Arrigoni et al. (2007)	
BMT ELISA (Pourquier)	Theoretical cut-off: 95% Sp	Classical test evaluation	70 infected + 15 non-infected dairy herds	None		13		Australia	Gwozdz et al. (2007b)	
BMT ELISA (Prionics)	Theoretical cut-off: 99% Sp					8.6				
	Theoretical cut-off: 95% Sp					17				
	Theoretical cut-off: 99% Sp					8.6				
BMT ELISA (Pourquier)	30% S/P	Classical test evaluation	383 dairy herds random selection	mELISA (Pourquier)				The Netherlands	van Weering et al. (2007)	
						$\geq 2\%$ seroprevalence ^b	17			99
						$\geq 3\%$ seroprevalence ^b	28			99
						$\geq 2\%$ seroprevalence ^b	39			96
	$\geq 3\%$ seroprevalence ^b					85	96			
BMT ELISA (Pourquier)	30% S/P	Classical test evaluation	110 certified MAP-free dairy herds	None			100			
	12.5% S/P						100			
BMT ELISA (Pourquier)	0.1 optical density	Classical test evaluation	170 dairy herds, convenience sample	Combined BMT ELISA (Pourquier) + PCR (TaqMan)	≥ 1 positive test result for BMT	38.2 ^c		United States	Wilson et al. (2010)	
BMT ELISA (IDEXX/Pourquier)	Transformed optical density: >3	Classical test evaluation	203 dairy herds, convenience sample	sELISA (IDEXX + Parachek 2, Prionics)	>0% seroprevalence	76.1	70.5	Spain	Pesqueira et al. (2017)	
BMT ELISA (Parachek 2, Prionics)	Transformed optical density: >(-1.44)					78.9	53			
BMT ELISA (IDEXX/Pourquier)	20% S/P	Classical test evaluation	189 dairy herds, convenience sample	sELISA (IDEXX/Pourquier)	>0% seroprevalence ^d	16	95	France	Delafosse et al. (2019)	
	10% S/P					33	95			
	5% S/P					53	75			
BMT ELISA (Pourquier)	Manufacturer's cut-off	Simulation model	National dairy herd population			8		Republic of Ireland	Sergeant et al. (2019)	

S/P, sample to positive ratio; ODc, corrected optical density; BMT, bulk milk tank; WHP, within-herd prevalence of infection; sELISA, serum-based ELISA; mELISA, milk-based ELISA; Sp, Specificity.

^a Publication reported range of sensitivity estimates for different ODc cut-offs; extracted the estimates Sp for optimised ODc (0.02) and the lowest ODc to give 100% Sp (0.08).

^b Publication reported a range of sensitivity estimates for different WHP thresholds, selected estimates for two most commonly reported: 2% and 3%.

^c Calculated from Table 2 of publication.

^d Publication reported range of sensitivity estimates for different WHP ranges, overall sensitivity for each S/P category reported here.

Weering et al. (2007) reported 100% specificity with a very similar ELISA kit tested on 110 certified MAP-free herds.

Herd sensitivity estimates for BMT ELISA vary between 8–30% when using manufacturers' recommended S/P ratios (Table 1), and are usually reported relative to thresholds of WHP. Estimates derived from higher WHP thresholds are not included in Table 1 but HSe was >50% at WHP levels of >5% in two studies using the Pourquier ELISA kit (van Weering et al., 2007; Delafosse et al., 2019) that reported high Sp ($\geq 95\%$). HSe was reported to increase up to 85% when the S/P values were lowered, however this reduced HSp (Nielsen et al., 2000; van Weering et al., 2007; Delafosse et al., 2019). This effect was not uniform across all evaluations as both van Weering et al. (2007) and Delafosse et al. (2019) found a reduction in S/P cut-off value (leading to increased HSe) was not associated with a reduction in HSp.

Organism detection test methods

Individual faecal testing

Individual faecal culture (IFC) or PCR testing for MAP has often been used as the reference test to measure the performance of other diagnostic tests and few studies have measured the HSe of individual faecal testing. Tavornpanich et al. (2008) estimated the HSe of IFC to range from 44 to

100%, increasing as sample size and WHP increased. In a theoretical population of Swiss dairy herds containing 33 cows, the HSe of whole herd IFC was estimated to be 50%, 75% and 87% for WHP of 5%, 10% and 15% respectively (Antognoli et al., 2005).

Pooled faecal testing

HSe and HSp estimates from studies using pooled faecal testing (PFT) are summarised in Table 3. HSe estimates ranged from 26 to 100%, and HSp estimates ranged from 98 to 100%. Reported pool sizes varied but pools of five individual samples were most common (Kalis et al., 2000; Wells et al., 2003; Tavornpanich et al., 2008; Cook et al., 2009; Sergeant et al., 2019). HSe estimates from field studies using IFC as the reference test are relatively high, ranging from 50 to 100%, with a mean HSe of >70% (Kalis et al., 2000; Wells et al., 2003; Tavornpanich et al., 2004; van Schaik et al., 2007; Cook et al., 2009). Only one study (Keller et al., 2014) compared the use of PCR and culture for testing pooled faeces for MAP. In that investigation of 23 Swiss dairy herds, 18 were culture-positive using pooled faecal samples and 12/18 were also positive using pooled faecal PCR (66% relative sensitivity). In studies that compared multiple herd-level screening tests in the same sample population, pooled faecal testing had the highest reported HSe after individual faecal testing when considering tests with 100% HSp

Table 3

Published herd sensitivities (HSe) and herd specificities (HSp) for pooled faecal culture (PFC) and pooled faecal PCR (PF-PCR).

Test evaluated	Type of analysis	Sample population	Reference test	Reference test cut-off point	HSe (%)	HSp (%)	Country	Author(s)
PFC (pools of 5, modified Lowenstein–Jensen)	Classical test evaluation	11 dairy herds, confirmed infection	IFC (modified Lowenstein–Jensen)	≥1 culture-positive animal	73		The Netherlands	Kalis et al. (2000)
PFC (varying size pools, Trek ESP ^b)	Simulation model	≤5% WHP (100 cows)			53 ^a		Not specified	Van Schaik et al. (2003)
		≤5% WHP (250 cows)			88 ^a			
		≤5% WHP (≥500 cows)			≥90 ^a			
PFC (pools of 5, HEYM ^{b,c})	Classical test evaluation	24 dairy herds, convenience sample	IFC (HEYM ^b)	≥1 culture-positive animal	94		USA	Wells et al. (2003)
Partial herd PFC (pools of 10, HEYM ^b + ESP Para-JEM)	Classical test evaluation	29 dairy herds, convenience sample, 60 animals sampled per herd	IFC (HEYM ^b + ESP Para-JEM)	≥1 culture-positive animal	81		USA	Tavornpanich et al. (2004)
PFC (pools of 5, test not specified)	Simulation model	5% WHP 10% WHP 15% WHP			47 71 84		Switzerland	Antognoli et al. (2005)
Partial herd PFC (pools of 5, HEYM)	Classical test evaluation	12 dairy herds, convenience sample, 50 animals sampled per herd	IFC (HEYM)	≥1 culture-positive animal	50 ^d	100	Chile	van Schaik et al. (2007)
Partial herd PFC (pools of 10, HEYM)		5% WHP 16% WHP 35% WHP		≥1 positive test result	26–78 ^e 68–100 ^e 93–100 ^e	100		
PFC (pools of 5, HEYM ^b)	Simulation model	136 dairy herds, convenience sample	sELISA (Pourquier) + BMT-PCR (IS900)	≥1 positive test result	54–69	98–100	USA	Tavornpanich et al. (2008)
PFC (pools of 5, Trek ESP ^b)	Bayesian analysis	23 dairy herds, convenience sample	PFC (Lowenstein–Jensen + HEYM)	≥1 positive PCR result	66		United Kingdom	Cook et al. (2009)
PF-PCR (various pool size, f57 sequence-based PCR)	Classical test evaluation	National dairy herd population		≥1 positive test result	83	100	Switzerland	Keller et al. (2014)
PF-PCR/PF-PCR (pools of 5, test not specified)	Simulation model						Republic of Ireland	Sergeant et al. (2019)

WHP, within-herd prevalence of infection; IFC, individual faecal culture; HEYM, Herrold's Egg Yolk Medium; sELISA, serum-based ELISA; PFC, pooled faecal culture; PF-PCR, pooled faecal PCR; BMT-PCR, bulk milk tank PCR.

^a Results summarised from Table 2 of paper.

^b Confirmatory assay not used or not specified.

^c Partial herd pooled faecal sampling also evaluated in study, results not shown.

^d Calculated HSe from data in Table 1 of publication.

^e Summarised HSe results as ranges in bands of WHP across various herd sizes reported in article.

(Tavornpanich et al., 2008; Sergeant et al., 2019).

Bulk milk tank-culture, PCR and phage testing

Direct detection of MAP from BMT samples has been evaluated using culture, PCR and phage testing, and the results are summarised in Table 4. HSe estimates ranged from 0 to 85%, and HSp estimates ranged from 50 to 100%. These tests detect MAP shed into milk by infected cows and from faecal contamination during the milking process. Two studies evaluated the potential use of milk filters as a source for identifying MAP and reported relatively high HSe estimates of 85% using PCR (Slana et al., 2012) and 61.5% using culture (Cashman et al., 2008), although both studies had small sample sizes. Evaluations of BMT-PCR are most common and HSe results vary considerably, from 3 to 77% across five studies (Table 4). In a study by Stabel et al. (2002), BMT-PCR of 61 dairy herds had a HSe of 77% with IFC as the reference test, in comparison to BMT-culture which returned all negative results in the same herds. Foddai and Grant (2017) evaluated the performance of a phage-type assay for detecting MAP at the herd level. The sensitivities of three separate test methods to detect MAP in bulk milk samples (peptide-mediated magnetic separation with PCR, culture and a phage assay) were similar, ranging from 45 to 59%.

Environmental sampling

HSe and HSp results for environmental sampling (ES) are summarised in Table 5. ES involves testing of composite manure and slurry

samples using either faecal culture or PCR. The most common protocol used was collection of six composite samples from the main cow housing, manure storage and other areas such as the collecting yard and sick cow pens for testing by culture. HSe estimates for this six composite sample protocol ranged from 24% to 79%, and HSp in one study was 99%. The use of boot swabs has been investigated in a number of studies (Eisenberg et al., 2013; Wolf et al., 2016; Hahn et al., 2017), with HSe estimates ranging from 44 to 91%. Three studies reported estimates for HSe of ES using PCR and the results were variable. Khol et al. (2009) reported a HSe only up to 18% using PCR on environmental samples in 11 infected herds. However, the HSe of culture of environmental samples was also unusually low in this study compared with others. Hahn et al. (2017) evaluated two PCR kits on both boot swabs and liquid manure samples with HSe ranging between 61–68%, and HSp between 88–100%. Delafosse et al. (2019) in a large study of 192 dairy herds reported a HSe of 44% and 72% when using cycle thresholds (Ct) of 35 and 45, respectively, on one composite environmental sample per herd. HSp was relatively low at 90% and 75%, respectively.

Discussion

There is no single reference standard test for MAP, and the chosen herd testing strategy will depend on the objectives of the decision-makers (herd owners, veterinary practitioners and industry stakeholders) involved in disease control. Estimations of sensitivity and

Table 4
Published herd sensitivities (HSe) and herd specificities (HSp) for direct testing for MAP from bulk milk tank (BMT).

Test evaluated	Type of analysis	Sample population	Reference test	Reference test cut-off point	HSe (%)	HSp (%)	Country	Author(s)
BMT culture (HEYM ^a)	Classical test evaluation	61 seropositive dairy herds	Partial herd IFC (HEYM ^a)	≥1 positive faecal culture	No positive results	77	USA	Stabel et al. (2002)
BMT PCR (Nested PCR protocol)								
BMT PCR (IS900)	Classical test evaluation	29 dairy herds, convenience sample 70 infected dairy herds, triplicate samples from each	IFC (not specified)	≥1 positive faecal culture	21 ^b	50 ^a	USA	Jayarao et al. (2004)
BMT PCR (IS900)								
Milk filter culture (IMS + HEYM)	Classical test evaluation	20 dairy herds, convenience sample	sELISA (Pourquier)	≥1 seropositive animal	61.5 ^c		Ireland	Cashman et al. (2008)
BMT PCR (IS900)								
BMT PCR (IS900)	Bayesian LCA	136 dairy herds convenience sample	Repeated ES-culture (HEYM)	≥1 positive environmental sample	42		Denmark	Herthnek et al. (2008)
BMT PCR (IS900)								
BMT PCR (various real-time kits)	Classical test evaluation	37 seropositive bulk milk samples	BMT ELISA (IDVet)	None given	3		Italy	Ricchi et al. (2009)
BMT PCR (nested PCR)								
BMT PCR (TaqMan)	Classical test evaluation	170 dairy herds, convenience sample	Combined BMT ELISA (Pourquier) + PCR (TaqMan)	≥1 positive result on either test	29 ^d		USA	Wilson et al. (2010)
Milk filter and sieve scrapings PCR (TaqMan)								
BMT PMS-PCR (IS900 + f57)	Classical test evaluation	22 bulk milk samples from JD-affected herds	None		45.4		United Kingdom	Foddai and Grant (2017)
BMT PMS-culture (MGIT)								
BMT PMS-phage assay					59.1			

PMS, Peptide-mediated magnetic separation; BMT PCR, bulk milk tank PCR; IMS, Immunomagnetic separation; IFC, individual faecal culture; HEYM, Herrold's Egg Yolk Medium; MGIT, Mycobacteria Growth Indicator Tube; sELISA, serum-based ELISA.

^a Confirmatory assay not used or not specified.

^b Results from Table 2 of publication.

^c Result calculated from data contained in paragraph "Agreement between test results".

^d Result calculated from Table 2 of publication.

specificity of MAP diagnostic tests assist in the decision-making process and can be used by researchers as inputs for simulation modelling (Nielsen and Toft, 2008). HSe and HSp can be applied to estimates of herd-level confidence of freedom and herd-level prevalence of MAP infection in a population. The relative cost and practicalities of testing are also major factors influencing the choice of herd test method. While culture and PCR are more expensive than ELISA on a per sample basis, direct detection methods such as environmental sampling may be more cost-effective than serological screening in a national herd screening programme (Sergeant et al., 2019).

Individual milk samples and serum samples are commonly used for whole-herd testing for MAP, due to their relatively low cost compared to faecal culture or PCR and relatively high HSe estimates. However, the low estimated HSp and consequent many false positive results make this less practical as an option for identifying infected herds (Table 1). The choice of seroprevalence threshold to define a herd as infected can impact HSe and HSp, and in this systematic review, reported thresholds varied from one seropositive animal to 3% seroprevalence. The low specificity of herd serology can be overcome with serial faecal testing of seropositive animals, although this option has the disadvantage of requiring additional animal handling and sampling.

Bulk milk tank ELISA evaluations often assessed test performance using different S/P ratio cut-off points. When considering only those evaluations that used the manufacturer's recommended cut-offs, HSe was low ranging from 8% to 30% while HSp was relatively high (95–100%) across four studies (Table 2). Studies that investigated direct test methods in BMT samples mostly used PCR methods. HSe estimates for BMT PCR testing were generally under 50% and HSp estimates were

unexpectedly low at 50% and 57–82% (Jayarao et al., 2004; Cook et al., 2009). The low HSp may be due to low sensitivity of the reference test, low specificity of the PCR test or sample contamination. Only one report evaluated BMT phage testing at the herd level. As reviewed by Grant (2021) phage assays have potential for use as a novel diagnostic test, but more studies evaluating the sensitivity and specificity of these assays on various sample matrices are needed.

Individual faecal testing was often used as a reference test so it is unsurprising that pooled faecal testing has the highest reported estimates for HSe and HSp, in simulation studies that compare various testing methods (Table 3). The most common protocol for environmental sampling using faecal culture was six composite environmental samples and HSe estimates from field studies ranged from 40 to 79%. The majority of positive environmental samples have been found in manure storage areas and main cow housing alleyways (Raizman et al., 2004; Pillars et al., 2009) and most studies included these two locations in their sampling protocol. Relatively few studies used PCR testing when evaluating PFT or ES for herd-level testing. Despite this, PCR testing is frequently the preferred method of testing faecal samples over culture. It is also notable that there is only one publication identified in this systematic review that investigated the performance of a herd-level test for MAP in beef herds (Klawonn et al., 2016).

The majority of publications used assumed gold standard reference methods to estimate HSe and HSp, which are referred to in this systematic review as classical test evaluations. The disadvantages of this approach in paratuberculosis research have been well documented, and non-gold standard methods such as Bayesian latent class models are becoming more common to estimate sensitivity, specificity and

Table 5
Published herd sensitivities (HSe) and herd specificities (HSp) for environmental sampling (ES) for MAP.

Test evaluated	Type of analysis	Sample population	Reference test	Reference test cut-off point	HSe (%)	HSp (%)	Country	Author(s)
ES-culture (various number of samples per farm, HEYM ^a)	Classical test evaluation	108 dairy herds, convenience sample	Partial herd PFC (up to 100 animals, HEYM ^a) Previously identified MAP infection	≥1 positive PFC	94		USA	Raizman et al. (2004)
					78			
ES-culture (3 samples per farm, HEYM)	Classical test evaluation	23 dairy herds, convenience sample	Historical IFC + PFC (60 animals/herd, various culture methods) sELISA (≥60 animals per herd, HerdCheck, IDEXX)	≥1 positive test result	87.5 ^b		USA	Berghaus et al. (2006)
				≥2 seropositive animals	80 ^b			
ES-culture (5 samples per farm, various culture methods)	Classical test evaluation	98 dairy herds, convenience sample	IFC (various culture methods) sELISA (Paracheck) mELISA (Antel Biosystems)	≥1 positive test result	76		USA	Lombard et al. (2006b)
					76			
ES-culture (6 samples per herd, HEYM ^a)	Simulation model	5% WHP 16% WHP 35% WHP			71		USA	Tavornpanich et al. (2008)
					24			
ES-culture (various number of samples per herd, HEYM)					99			
ES-culture (various number of samples per herd, HEYM)					100			
ES-PCR (various number of samples per herd, Qiagen)	Classical test evaluation	11 infected dairy herds	Previous infection status		27.3–45.5		Austria	Khol et al. (2009)
ES-culture (various number of samples per herd, various culture methods)	Classical test evaluation	7 infected dairy herds	IFC repeated (various culture methods)	≥1 positive IFC result	≤18		USA	Pillars et al. (2009)
ES-culture (2 samples per herd, modified Lowenstein-Jensen ^a)	Classical test evaluation	246 dairy herds, convenience sample	mELISA (test not specified) + confirmatory IFC (modified Lowenstein-Jensen ^a)	≥1 positive IFC result	74 ^d		The Netherlands	Weber et al. (2009)
ES-culture (6 samples per herd, HEYM ^a)	Classical test evaluation	3 infected dairy herds	Repeated IFC (HEYM ^a)	≥1 positive result	40		USA	Smith et al. (2011)
ES-culture (various number of samples per herd, HEYM)	Classical test evaluation	4 infected dairy herds	Previous infection status based on IFC		90.8 ^e		Germany	Eisenberg et al. (2013)
ES-culture (6 samples per herd, Trek ESP)	Classical test evaluation	32 dairy herds, convenience sample	Repeated PFC (Trek ESP)	≥1 positive result	71	99	Canada	Lavers et al. (2013)
ES-culture (6 samples per farm, Trek ESP)	Classical test evaluation	82 dairy herds, convenience sample	ES repeated (combined results of 3 sampling events)	≥1 positive ES result	Assume 20% of negative herds are infected: 68–69 Assume no negative herds are infected: 73–74 Assume 50% of negative herds are infected: 62–63		Canada	Wolf et al. (2014)
ES-culture (1–14 samples per farm, culture method not specified)	Classical test evaluation	20 beef herds, convenience sample	IFC (culture method not specified)	≥1 positive IFC result	64.3		Germany	Klawonn et al. (2016)
ES-culture (6 samples per herd, Trek ESP)	Bayesian LCA	102 dairy herds, convenience sample	ES-culture (boot swabs, Trek ESP)	≥1 positive ES result	79		Canada	Wolf et al. (2016)
ES-culture (2 boot swabs per herd, Trek ESP)			ES-culture (Trek ESP)	≥1 positive ES result	44			
ES-culture (7 samples + 2 pooled faecal samples from sick/thin cows, MGIT)	Classical test evaluation	24 dairy herds, convenience sample	All IFC/ES results from previous 24 months Concurrent IFC only (MGIT)	≥1 positive IFC/ES result	32 ^f		Canada	Arango-Sabogal et al. (2016)
				≥1 positive IFC	50 ^f			
ES-PCR (3 boot swabs per herd, VetMAX)			Previous infection status based on IFC	≥1 positive IFC	61.4	100		
ES-PCR (3 boot swabs per herd, Adiavet)	Classical test evaluation	58 infected and 19 presumed non-infected dairy herds	Previous infection status based on IFC		65.5	94.4	Germany	Hahn et al. (2017)
ES-PCR (1 liquid manure sample, VetMAX)					62.8	94.1		
ES-PCR (1 liquid manure sample, Adiavet)			sELISA (Pourquier/IDEXX)		67.9	88.2		
					72	75	France	

(continued on next page)

Table 5 (continued)

Test evaluated	Type of analysis	Sample population	Reference test	Reference test cut-off point	HSe (%)	HSp (%)	Country	Author(s)
ES-PCR (Ct 45 threshold) (1 sample, Adiavet)	Classical test evaluation	192 dairy herds, convenience sample		≥ 1 seropositive animal	44	90		Delafosse et al. (2019)
ES-PCR (Ct 35 threshold) (1 sample, Adiavet)	ES-culture (6 samples, culture method not specified)	Simulation model	National herd population data			68		Republic of Ireland

Sergeant et al. (2019)

ES-culture, environmental sampling with culture; ES-PCR, environmental sampling with PCR; Ct, cycle threshold; IFC, individual faecal culture; PFC, pooled faecal culture; HEYM, Herrold's Egg Yolk Medium; MGIT, Mycobacteria Growth Indicator Tube; sELISA, serum-based ELISA; mELISA, milk-based ELISA.

^a Confirmatory assay not used or not specified.

^b Calculated HSe from data in Table 2 in publication.

^c Range of HSe results reported for ES, extracted data for 6 samples only as this is the most commonly reported sampling protocol for ES.

^d Calculated HSe from data in Table 2; based on cross-sectional comparison of sampling events across all herds.

^e Calculated HSe from data in Table 1, mean of percentages of positive boot swabs per herd.

^f Calculated HSe from data in Table 2, based on cross-sectional comparison of sampling events across all herds.

prevalence. While latent class methods require a different approach in study design than classical test evaluations to ensure the underlying assumptions of the model are met, they can provide more reliable and generalizable results. To improve the utility of test evaluations for MAP, latent class methods should be considered as the standard statistical approach to estimations of sensitivity and specificity. Simulation modelling is used infrequently to estimate HSe and HSp, and the robustness of the methods and inputs used for such models can affect the reliability of their results. Models based on robust population data such as the one published by Sergeant et al. (2019) provide reliable data in the absence of large field studies, whereas models that use largely theoretical input data may generate results that are less applicable for a population.

Test sensitivity and specificity estimates can vary for many reasons, including differences between sample populations (Greiner and Gardner, 2000), herd prevalence (Brenner and Gefeller, 1997), within-herd prevalence (Lavers et al., 2014) and animal-level factors such as stage of disease (Nielsen and Toft, 2008) or skin testing for bovine tuberculosis (Kennedy et al., 2014). This systematic review clearly shows the huge diversity in sample populations between studies. Many publications gave only limited information about the sample population for the test or are conducted using a convenience sample of herds that may not reflect the target population for the test. This contributes significantly to the variability in test sensitivity and specificity estimates seen between studies in this systematic review and makes it difficult to draw conclusions regarding the performance of a test in a specific population of unknown disease prevalence.

Lavers et al. (2014) showed differences in within-herd prevalence of infection will also affect estimates, with the HSe of whole-herd milk ELISA decreasing with declining within-herd prevalence. This is important when distinguishing between low prevalence herds and non-infected herds, as herds with <2% apparent prevalence on milk ELISA testing are likely to be false positives (Lavers et al., 2014). Furthermore HSe and HSp estimates will also be affected by the choice of reference test and the specific test protocols used for the reference test and the test under evaluation. For example, studies that used faecal culture methods may have opted for either solid or liquid media, with or without confirmatory PCR, and unfortunately some publications did not give any details of their test protocols. Direct comparisons between studies are only valid if the test protocols are uniform across each experiment.

There are some limitations in the methodology of this systematic review. A significant number of unique articles ($n = 393$) were identified by the initial keyword search using the two search engines. It was not feasible to scan the abstracts of all these articles and so titles were scanned to exclude those perceived as obviously irrelevant ($n = 116$), for

example animal level studies or risk factor studies. It is possible that some relevant results may have been missed in these excluded titles. The keywords used may have been too broad but the inclusion of the specific terms "herd sensitivity" or "herd specificity" in the searches would have led to publications with relevant results being missed. There were only five additional relevant papers added after scanning reference lists, which indicates that the number of relevant publications missed in the search was likely to be minimal.

Due to the large number of publications reviewed, a quality assessment was not performed. This is a weakness of our systematic review, considering the diversity in study design and methods between the various test evaluations. To compensate for this, all test evaluations in the systematic review have pertinent information relating to study methods and analysis contained in the tables of results, allowing readers to make their own assessment of the quality of the study and reliability of results.

Conclusions

Available herd-level test methods for MAP infection in cattle suffer from the same imperfect sensitivity and specificity as tests at the individual animal level. Selection of a suitable herd test method depends on the objectives of the decision-maker, the resources available, and consideration of the test characteristics of each method. This systematic review highlights knowledge gaps including the herd sensitivity of PCR testing of environmental samples and pooled faecal samples, the value of phage assays for herd-level testing and the performance of herd-level tests in beef herds.

Conflict of interest statement

None of the authors of this paper has a financial or personal relationship with other people or organisations that could inappropriately influence or bias the content of the paper.

Acknowledgements

We wish to acknowledge the financial support of the Irish Dairy Levy Trust for this study through funding provided for Teagasc project MKAB1170.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2022.105786>.

References

- Antognoli, M.C., Jemmi, T., Hill, A.E., Ochs, H., Salman, M.D., 2005. Evaluation of intervention strategies for control of Johne's Disease in Switzerland. In: Proceedings of the 8th International Colloquium on Paratuberculosis. Copenhagen, Denmark, 14th-17th August 2005, pp. 9–14.
- Arango-Sabogal, J.C., Côté, G., Paré, J., Labrecque, O., Roy, J.P., Buczinski, S., Doré, E., Fairbrother, J.H., Bissonnette, N., Wellemans, V., Fecteau, G., 2016. Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in tie-stall dairy herds using a standardized environmental sampling technique and targeted pooled samples. *Canadian Journal of Veterinary Research* 80, 175–182.
- Arrigoni, N., Cammi, G., Losini, I., Taddei, R., Tamba, M., Belletti, G.L., 2007. Diagnosis of bovine paratuberculosis: sensitivity of a commercial ELISA test on bovine bulk milk. In: Proceedings of the 9th International Colloquium on Paratuberculosis. Tsukuba, Japan, 28th October-2nd November 2007, pp. 89–90.
- Berghaus, R.D., Farver, T.B., Anderson, R.J., Jaravata, C.C., Gardner, I.A., 2006. Environmental sampling for detection of *Mycobacterium avium* ssp *paratuberculosis* on large California dairies. *Journal of Dairy Science* 89, 963–970.
- Brenner, H., Gefeller, O., 1997. Variation of sensitivity, specificity, likelihood ratios and predictive values with disease prevalence. *Statistics in Medicine* 16, 981–991.
- Cashman, W., Buckley, J., Quigley, T., Fanning, S., More, S., Egan, J., Berry, D., Grant, I., O'Farrell, K., 2008. Risk factors for the introduction and within-herd transmission of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) infection on 59 Irish dairy herds. *Irish Veterinary Journal* 61, 464–467.
- Chaffer, M., Rivas, A.L., Elad, D., Koren, O., Garazi, S., Chowell, G., Schwager, S.J., 2008. Receiver operating characteristic-based assessment of a serological test used to detect Johne's disease in Israeli dairy herds. *Canadian Journal of Veterinary Research* 72, 18–26.
- Cook, A., Vidal-Diez, A., Arnold, M., Sayers, R., Caldwell, G., McGoldrick, A., Donaghy, J., Strain, S., Gardner, I., 2009. Use of multiple tests to determine the status of UK dairy herds with respect to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. In: Proceedings of the 10th International Colloquium on Paratuberculosis. Minneapolis, Minnesota, 9th-14th August 2009, pp. 160.
- Delafosse, A., Meens, E., Rambaud, T., Hanoy, F., Achour, H., 2019. Sensitivities of a bulk-tank milk ELISA and composite fecal qPCR to detect various seroprevalence levels of paratuberculosis in cattle herds in Normandy, France. *Canadian Veterinary Journal* 60, 275–281.
- Eisenberg, T., Wolter, W., Lenz, M., Schlez, K., Zschock, M., 2013. Boot swabs to collect environmental samples from common locations in dairy herds for *Mycobacterium avium* ssp *paratuberculosis* (MAP) detection. *Journal of Dairy Research* 80, 485–489.
- Feller, M., Huwiler, K.M.D., Stephan, R.D.V.M., Altpeter, E.M.D., Shang, A.M.D., Furrer, H.M.D., Pfyffer, G.E.P., Jemmi, T.D.V.M., Baumgartner, A.P., Egger, M.P., 2007. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and Crohn's disease: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Infectious Diseases* 7, 607–613.
- Foddai, A.C.G., Grant, I.R., 2017. Sensitive and specific detection of viable *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in raw milk by the peptide-mediated magnetic separation-phage assay. *Journal of Applied Microbiology* 122, 1357–1367.
- García, A.B., Shalloo, L., 2015. Invited review: the economic impact and control of paratuberculosis in cattle. *Journal of Dairy Science* 98, 5019–5039.
- Geraghty, T., Graham, D.A., Mullowney, P., More, S.J., 2014. A review of bovine Johne's disease control activities in 6 endemically infected countries. *Preventive Veterinary Medicine* 116, 1–11.
- Grant, I.R., 2021. Bacteriophage-based methods for detection of viable *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and their potential for diagnosis of Johne's disease. *Frontiers of Veterinary Science* 8, 632498.
- Grant, I.R., Ball, H.J., Rowe, M.T., 2002. Incidence of *Mycobacterium paratuberculosis* in bulk raw and commercially pasteurized cows' milk from approved dairy processing establishments in the United Kingdom. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 2428–2435.
- Greiner, M., Gardner, I.A., 2000. Epidemiologic issues in the validation of veterinary diagnostic tests. *Preventive Veterinary Medicine* 45, 3–22.
- Gwozdz, J.M., Carajias, M., Mohammad, I., Ridge, S., Condrón, R., 2007a. Application of culture and PCR to bulk milk for detection of paratuberculosis in dairy cattle herds. In: Proceedings of the 9th International Colloquium on Paratuberculosis. Tsukuba, Japan, 28th October-2nd November 2007, p. 165.
- Gwozdz, J.M., Carajias, M., Mohammad, I., Ridge, S., Condrón, R., 2007b. Application of three ELISA kits to bulk milk for detection of paratuberculosis in dairy cattle herds. In: Proceedings of the 9th International Colloquium on Paratuberculosis. Tsukuba, Japan, 28th October-2nd November 2007, p. 167.
- Hahn, N., Failing, K., Eisenberg, T., Schlez, K., Zschock, P.M., Donat, K., Einax, E., Köhler, H., 2017. Evaluation of different diagnostic methods for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in boot swabs and liquid manure samples. *BMC Veterinary Research* 13.
- Hanks, J.D., Taylor, N.M., Kossaibati, M.A., 2014. Is targeted milk sampling an effective means of detecting Johne's disease in dairy herds? *Cattle Practice* 22, 26–34.
- Hendrick, S.H., Duffield, T.F., Kelton, D.F., Leslie, K.E., Lissemore, K.D., Archambault, M., 2005. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays performed on milk and serum samples for detection of paratuberculosis in lactating dairy cows. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 226, 424–428.
- Herthnek, D., Nielsen, S.S., Lindberg, A., Bolske, G., 2008. A robust method for bacterial lysis and DNA purification to be used with real-time PCR for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk. *Journal of Microbiological Methods* 75, 335–340.
- Jayarao, B.M., Pillai, S.R., Wolfgang, D.R., Griswold, D.R., Rossiter, C.A., Tewari, D., Burns, C.M., Hutchinson, L.J., 2004. Evaluation of IS900-PCR assay for detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in cattle using quarter milk and bulk tank milk samples. *Foodborne Pathogens and Disease* 1, 17–26.
- Kalis, C.H.J., Hesselink, J.W., Barkema, H.W., Collins, M.T., 2000. Culture of strategically pooled bovine fecal samples as a method to screen herds for paratuberculosis. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 12, 547–551.
- Keller, S.M., Stephan, R., Kuenzler, R., Meylan, M., Wittenbrink, M.M., 2014. Comparison of fecal culture and F57 real-time polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Swiss cattle herds with a history of paratuberculosis. *Acta Veterinaria Scandinavica* 56, 68.
- Kennedy, A.E., Da Silva, A.T., Byrne, M., Govender, R., MacSharry, J., O'Mahony, J., Sayers, R.G., 2014. The single intradermal cervical comparative test interferes with Johne's disease ELISA diagnostics. *Frontiers in Immunology* 5, 564.
- Khol, J.L., Vill, M., Dunser, M., Geisbauer, E., Tichy, A., Baumgartner, W., 2009. Environmental faecal sampling, a new approach in diagnosis and surveillance of paratuberculosis in Austrian cattle herds. *Wiener Tierärztliche Monatsschrift* 96, 279–285.
- Klawonn, W., Einax, E., Putzschel, R., Schmidt, M., Donat, K., 2016. Johne's disease: reliability of environmental sampling to characterize *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) infection in beef cow-calf herds. *Epidemiology and Infection* 144, 2392–2400.
- Lavers, C.J., McKenna, S.L.B., Dohoo, I.R., Barkema, H.W., Keefe, G.P., 2013. Evaluation of environmental fecal culture for *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* detection in dairy herds and association with apparent within-herd prevalence. *Canadian Veterinary Journal* 54, 1053–1060.
- Lavers, C.J., Barkema, H.W., Dohoo, I.R., McKenna, S.L.B., Keefe, G.P., 2014. Evaluation of milk ELISA for detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in dairy herds and association with within-herd prevalence. *Journal of Dairy Science* 97, 299–309.
- Lombard, J.E., Byrem, T.M., Wagner, B.A., McCluskey, B.J., 2006a. Comparison of milk and serum enzyme-linked immunosorbent assays for diagnosis of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in dairy cattle. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 18, 448–458.
- Lombard, J.E., Wagner, B.A., Smith, R.L., McCluskey, B.J., Harris, B.N., Payeur, J.B., Garry, F.B., Salman, M.D., 2006b. Evaluation of environmental sampling and culture to determine *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* distribution and herd infection status on US dairy operations. *Journal of Dairy Science* 89, 4163–4171.
- McAloon, C.G., Whyte, P., More, S.J., Green, M.J., O'Grady, L., Garcia, A., Doherty, M.L., 2016b. The effect of paratuberculosis on milk yield—a systematic review and meta-analysis. *Journal of Dairy Science* 99, 1449–1460.
- Nielsen, S.S., Toft, N., 2008. Ante mortem diagnosis of paratuberculosis: a review of accuracies of ELISA, interferon- γ assay and faecal culture techniques. *Veterinary Microbiology* 129, 217–235.
- Nielsen, S.S., Toft, N., 2009. A review of prevalences of paratuberculosis in farmed animals in Europe. *Preventive Veterinary Medicine* 88, 1–14.
- Nielsen, S.S., Thamsborg, S.M., Houe, H., Bitsch, V., 2000. Bulk-tank milk ELISA antibodies for estimating the prevalence of paratuberculosis in Danish dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine* 44, 1–7.
- Ott, S.L., Wells, S.J., Wagner, B.A., 1999. Herd-level economic losses associated with Johne's disease on US dairy operations. *Preventive Veterinary Medicine* 40, 179–192.
- Pesqueira, M.N., Yus, E., Factor, C., Mato, I., Sanjuan, M.L., Eiras, C., Arnaiz, I., Dieguez, F.J., 2017. Short communication: correlation between within-herd antibody-prevalence and bulk tank milk antibody levels to *Mycobacterium avium* ssp *paratuberculosis* using two commercial immunoassays. *Journal of Dairy Science* 100, 7544–7548.
- Pillars, R.B., Grooms, D.L., Kaneene, J.B., 2009. Longitudinal study of the distribution of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* in the environment of dairy herds in the Michigan Johne's disease control demonstration herd project. *Canadian Veterinary Journal* 50, 1039–1046.
- Raizman, E.A., Wells, S.J., Godden, S.M., Bey, R.F., Oakes, M.J., Bentley, D.C., Olsen, K.E., 2004. The distribution of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in the environment surrounding Minnesota dairy farms. *Journal of Dairy Science* 87, 2959–2966.
- Ricchi, M., Manini, F., Cammi, G., Donaghy, J., Arrigoni, N., 2009. Comparison of four different PCR methods for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk. In: Proceedings of the 10th International Colloquium on Paratuberculosis. Minneapolis, Minnesota, 9th-14th August, pp. 56–59.
- Sergeant, E.S.G., McAloon, C.G., Tratalos, J.A., Citer, L.R., Graham, D.A., More, S.J., 2019. Evaluation of national surveillance methods for detection of Irish dairy herds infected with *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*. *Journal of Dairy Science* 102, 2525–2538.
- Slana, I., Kralik, P., Kralova, A., Babak, V., Pavlik, I., 2012. Short communication: Examination of milk filters by real-time PCR as a herd-level indicator of the presence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in dairy herds. *Journal of Dairy Science* 95, 1162–1165.
- Smith, R.L., Schukken, Y.H., Pradhan, A.K., Smith, J.M., Whitlock, R.H., Van Kessel, J.S., Wolfgang, D.R., Grohn, Y.T., 2011. Environmental contamination with *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* in endemically infected dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine* 102, 1–9.
- Stabel, J.R., Wells, S.J., Wagner, B.A., 2002. Relationships between fecal culture, ELISA, and bulk tank milk test results for Johne's disease in US dairy herds. *Journal of Dairy Science* 85, 525–531.
- Sweeney, R.W., 2011. Pathogenesis of paratuberculosis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 27, 537–546.
- Tavornpanich, S., Gardner, I.A., Anderson, R.J., Shin, S., Whitlock, R.H., Fyock, T., Adaska, J.M., Walker, R.L., Hietala, S.K., 2004. Evaluation of microbial culture of

- pooled fecal samples for detection of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* in large dairy herds. American Journal of Veterinary Research 65, 1061–1070.
- Tavornpanich, S., Gardner, I.A., Carpenter, T.E., Johnson, W.O., Anderson, R.J., 2006. Evaluation of cost-effectiveness of targeted sampling methods for detection of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* infection in dairy herds. American Journal of Veterinary Research 67, 821–828.
- Tavornpanich, S., Muñoz-Zanzi, C.A., Wells, S.J., Raizman, E.A., Carpenter, T.E., Johnson, W.O., Gardner, I.A., 2008. Simulation model for evaluation of testing strategies for detection of paratuberculosis in Midwestern US dairy herds. Preventive Veterinary Medicine 83, 65–82.
- van Schaik, G., Pradenas F, M., Mella N, A., Kruze V, J., 2007. Diagnostic validity and costs of pooled fecal samples and individual blood or fecal samples to determine the cow- and herd-status for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Preventive Veterinary Medicine 82, 159–165.
- Van Schaik, G., Stehman, S.M., Rossiter, C.R., Shin, S.J., Schukken, Y.H., 2003. Simulation model to determine the optimal pool-size to detect *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* with fecal-culture. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 15, 233–241.
- van Weering, H., van Schaik, G., van der Meulen, A., Waal, M., Franken, P., van Maanen, K., 2007. Diagnostic performance of the Pourquier ELISA for detection of antibodies against *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in individual milk and bulk milk samples of dairy herds. Veterinary Microbiology 125, 49–58.
- Waddell, L.A., Rajić, A., StArk, K.D.C., McEwen, S.A., 2015. The zoonotic potential of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*: a systematic review and meta-analyses of the evidence. Epidemiology and Infection 143, 3135–3157.
- Weber, M.F., van Maanen, C., von Banniseht-Wijsmuller, T., Lam, T.J.G.M., 2009. Sensitivity of environmental sampling for paratuberculosis. In: Proceedings of the 10th International Colloquium on Paratuberculosis. Minneapolis, Minnesota, 9th–14th August, pp. 23–24.
- Wells, S.J., Whitlock, R.H., Wagner, B.A., Collins, J., Garry, F., Hirst, H., Lawrence, J., Saville, W.J.A., Larew Naugle, A.L., 2002. Sensitivity of test strategies used in the Voluntary Johne's Disease Herd Status Program for detection of *Mycobacterium paratuberculosis* infection in dairy cattle herds. Journal of the American Veterinary Medical Association 220, 1053–1057.
- Wells, S.J., Godden, S.M., Lindeman, C.J., Collins, J.E., 2003. Evaluation of bacteriologic culture of individual and pooled fecal samples for detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in dairy cattle herds. Journal of the American Veterinary Medical Association 223, 1022–1025.
- Wilson, D.J., Rood, K., Biswas, P., Byrem, T.M., 2010. Herd-level prevalence of Johne's disease in Utah and adjacent areas of the Intermountain West as detected by a bulk-tank milk surveillance project. Journal of Dairy Science 93, 5792–5797.
- Wolf, R., Barkema, H.W., De Buck, J., Slomp, M., Flaig, J., Haupstein, D., Pickel, C., Orsel, K., 2014. High herd-level prevalence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Western Canadian dairy farms, based on environmental sampling. Journal of Dairy Science 97, 6250–6259.
- Wolf, R., Orsel, K., De Buck, J., Kanevets, U., Barkema, H.W., 2016. Short communication: evaluation of sampling socks for detection of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* on dairy farms. Journal of Dairy Science 99, 2950–2955.



Contents lists available at ScienceDirect

The Veterinary Journal

journal homepage: www.elsevier.com/locate/tvj

Retrospective analysis of post-mortem findings in Thoroughbreds aged from birth to 18 months presented to a UK pathology laboratory

R. Mouncey^{a,*}, J.C. Arango-Sabogal^a, A.M. de Mestre^b, A.K. Foote^c, K.L. Verheyen^a

^a Department of Pathobiology and Population Sciences, Royal Veterinary College, Hawkshead Lane, Hatfield AL9 7TA, UK

^b Department of Comparative Biomedical Sciences, Royal Veterinary College, Hawkshead Lane, Hatfield AL9 7TA, UK

^c Rossdales Laboratories, High Street, Newmarket CB8 8JS, UK

ARTICLE INFO

Keywords:
Disease
Equine
Mortality
Pathology
Thoroughbred

ABSTRACT

Enhanced understanding of reasons for, and timings of, mortality in Thoroughbreds prior to entering race training is warranted to provide insight into this population's health status. The aims of this study were to describe pathologies diagnosed at post-mortem (PM) examination in Thoroughbreds aged from birth to 18 months and investigate associations between age and pathology. Reports from a pathology laboratory in Newmarket, UK, were used to identify eligible cases examined between January 2006 and December 2020. Reported pathologies were extracted and categorised where appropriate. Comorbidities and pathogens identified were reported where available. Associations between age and selected pathologies were assessed using logistic regression. Of 144 eligible Thoroughbreds presented for PM, 137 had an available report and pathologist's diagnosis. Congenital defects were most commonly reported (20%; $n = 28/137$; 95%CI 15–29), 69% of which ($n = 19/28$; 95%CI 49–82) were conformational manifestations of developmental orthopedic disease (DOD). Pneumonia was an important pathology (14%; $n = 20/137$; 95%CI 36–53) during the pre-weaning period, where *Rhodococcus equi* was identified in 50% ($n = 10/20$; 95% CI 29–70) of cases. Odds of congenital defects (OR 56.6; 95%CI 7.0–460.0; $P < 0.001$) were significantly greater in horses aged 0–2 days compared to 4–18 months at PM. Odds of pneumonia (OR 4.3; 95%CI 1.1–1.7; $P = 0.04$) were significantly greater in horses ages 1–4 months compared to 0–2 days at PM. This study shows that conformational manifestations of DOD are an important contributor to perinatal mortality, and that pathologies reported at PM vary with age in young Thoroughbreds.

1. Introduction

Current industry priorities include improving transparency and traceability of Thoroughbreds prior to entering training,¹ but there is a paucity of up-to-date information describing causes and timings of losses, in particular beyond the neonatal period, in the UK. An analysis of stud book authorities' outcomes of the 2014 and 2015 UK and Ireland (IRE) Thoroughbred foal crops (Arango-Sabogal et al., 2021) estimated that 2.1% of horses had died by 1 year of age and a further 0.7% between 1 and 2 years of age. However, of the 53% of horses reported not to have entered training by 3 years of age a significant proportion (35%; $n = 5049/11,403$) had no recorded fate (death, export or sales transaction). An Australian survey of Thoroughbred breeders of horses that failed to enter training found that breeders reported a mortality rate of 38% ($n =$

239/633) (Flash et al., 2020), suggesting potential underreporting of mortality in industry level estimates.

Retrospective analyses of post-mortem (PM) reports of Thoroughbreds have been used to enhance understanding of the reasons for losses occurring on racetracks (Lyle et al., 2011; DeLay, 2017) and to understand causes of abortion, stillbirth and neonatal death (Smith et al., 2003; Roach et al., 2020). Similar retrospective analyses of PM data have been used to describe causes of death in other equid populations (Baker and Ellis, 1981; Morrow et al., 2011). The analysis of such data can provide insight into the relative distribution of disease and reasons for euthanasia in a population.

The aims of this study were to describe pathologies diagnosed at PM examination in Thoroughbreds aged from birth to 18 months and investigate associations between age and reported pathology. This work

* Corresponding author.

E-mail address: rmouncey18@rvc.ac.uk (R. Mouncey).

¹ A life well lived: A new strategic plan for the welfare of horses bred for racing, 2020–2024. http://media.britishhorseracing.com/bha/Welfare/HWB/WELFARE_STRATEGY.pdf (Accessed 23 July, 2020)

<https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2022.105813>

Received 15 June 2021; Received in revised form 25 January 2022; Accepted 3 March 2022

Available online 5 March 2022

1090-0233/© 2022 The Authors. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

will update understanding of timings and causes of loss in the UK Thoroughbred breeding industry to inform future research priorities.

2. Materials and methods

2.1. Ethical approval

Ethical approval was granted by the Royal Veterinary College's Clinical Research Ethical Review Board (URN: 2018 1843-2; Approval date: 29 October, 2019).

2.2. Study design and period

A retrospective cross-sectional study was conducted, using PM records of Thoroughbreds examined between January 2006 and December 2020, at a pathology laboratory in Newmarket, UK.

2.3. Selection of cases

Cases were identified from the laboratory's practice management software (Eclipse PMS, Eclipse Veterinary Software Ltd) by searching PM procedure codes and a manual search of all recorded submissions by year. All eligible records were read by one author (RM) to identify cases meeting the inclusion criteria of (i) being Thoroughbred and (ii) aged between birth and 18 months at PM, in order to capture cases occurring between birth and the approximate age for entering training for flat racing in the UK.

2.4. Data collection

Case reference number, date of birth, date of death, date of PM examination and sex were extracted, entered and stored anonymously in a custom-designed database (Access, Microsoft). Post-mortem reports, ranging from full pathologists' reports to clinicians' letters to owners describing pathologies resulting in death or euthanasia, as reported by the examining pathologist, were manually retrieved. Cases where no report was available were excluded from further analysis.

Details of the examining pathologist/reporting clinician, and whether the animal was euthanased, died (sudden/unexpected death) or died under veterinary treatment were collected where available. Pathological findings that resulted in death or euthanasia, as reported by the pathologist/clinician, were recorded along with any further details of co-morbidities, infectious agents, anatomical location and descriptions of pathological lesions. Cases of stillbirth and cases where abnormalities had not been detected at examination were excluded from further analysis.

2.5. Data processing

Data describing reported pathology/pathologies were initially sorted by body system(s) affected. Where case numbers allowed ($n \geq 3$), categories of pathology were created using definitions and key descriptive terms from available literature (see [Appendix A: Supplementary Table 1](#)). Cases presenting in the first month of life, with multi-systemic pathologies reported to have occurred as a result of sepsis and/or hypoxia, were classified as 'neonatal sepsis/maladjustment'. Infectious agents, where identified, were described by genus and species where available. Where appropriate, for example to describe fractures or congenital abnormalities, anatomical locations were specified. Any reported comorbidities were also described.

2.6. Statistical analysis

Analysis was carried out using Stata (Release 16, StataCorp LP). Age at time of PM was calculated using date of birth and PM examination date. Time from death to PM examination was calculated where data

was available. Descriptive frequencies of the study population characteristics were calculated. Histograms were visually inspected for normality and median and interquartile range (IQR) reported for non-normally distributed data. Proportions and 95% confidence intervals (CI) were calculated for categories of reported pathology. Descriptive statistics by pathogen and anatomical location were derived where appropriate.

Kruskal-Wallis tests were used to identify differences in the distributions of age at PM (as a continuous variable) between groups. Age at PM was divided into quartiles, within which proportions and 95% CI of categories of pathology were calculated. Univariable logistic regression was used to quantify the strength of association between age group and the outcomes 'pneumonia' and 'congenital deformity', respectively. Statistical significance was set at $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Cases presented for post-mortem examination

Overall, 144 horses met the case inclusion criteria; 85 (59%) colts, 55 (38%) fillies and four (2%) with no sex recorded. Median age at PM examination was 21 days (IQR 2–118 days; range 0–533 days; $n = 144$). [Fig. 1](#) displays the distribution of age at PM examination. Median time from death to PM examination was 0 days (IQR 0–0 days; range 0–2 days; $n = 143$).

Five horses (3%; $n = 5/144$) had no PM report available and were excluded from further analysis. Sixty-three (45%; $n = 63/139$) horses underwent a full PM examination and 74 (55%; $n = 74/139$) were recorded as having undergone a limited, gross or 'for interest purposes' PM examination. Sixty percent of horses ($n = 83/139$; 95%CI 51–67) were reported to have been euthanased, 20% ($n = 28/139$; 95%CI 14–27) to have died and 20% ($n = 28/139$; 95%CI 14–27) to have died under veterinary treatment.

3.2. Reported pathology

In two cases, the examining pathologist reported that no abnormalities could be detected at PM, resulting in 137 cases for further analysis. [Table 1](#) provides a summary of reported pathologies.

Congenital defects were the most common pathological findings reported at PM examination to have resulted in death or euthanasia in the study population (37%; $n = 28/76$; 95% CI 27–48). Cases were mainly reported to have been euthanased (82%; $n = 23/28$; 95% CI 64–92), with the majority (86%; $n = 24/28$; 95% CI 68–94) presenting during

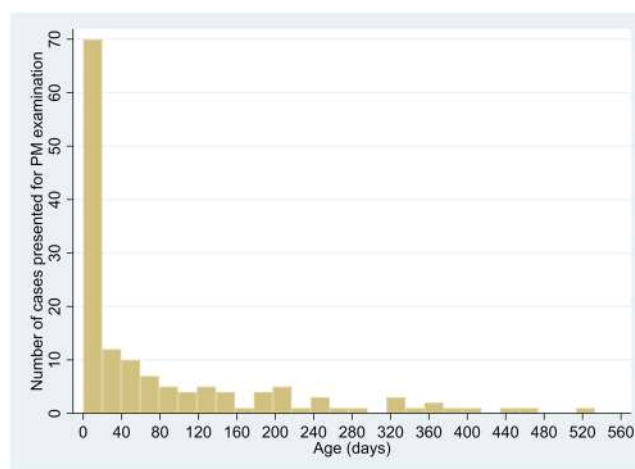


Fig. 1. Distribution of cases presented for post-mortem (PM) examination by age (days) at time of examination, of 144 Thoroughbreds presented to a pathology laboratory in Newmarket, UK, between 2006 and 2020.

Table 1

Reported pathologies, infectious agents where identified and any associated comorbidities amongst 137 Thoroughbreds presented for post-mortem examination between birth and 18 months of age to a pathology laboratory in Newmarket, UK, between 2006 and 2020. Proportions and 95% CI given of the population as a whole.

Pathology	Comorbidity/Pathogen ^a	n	%	95% CI	
Congenital defect	All	28	20.4	14.5–27.9	
	Musculoskeletal	Hypoxia (n = 3)	21	15.3	10.2–22.3
	Lung/diaphragm		2	1.5	0.4–5.2
	Meninges		1	0.7	0.1–4.0
	Heart		1	0.7	0.1–4.0
	Jejunum	Jejunal rupture	1	0.7	0.1–4.0
	Eye		1	0.7	0.1–4.0
Pneumonia	Bone marrow	1	0.7	0.1–4.0	
	All	20	14.6	9.6–21.5	
		<i>Rhodococcus equi</i>	10	7.3	4.0–12.9
		<i>Streptococcus</i> spp.	4	2.9	1.1–7.3
		<i>Escherichia coli</i>	2	1.5	0.4–5.2
		Equine Herpes Virus 4	1	0.7	0.1–4.0
Neonatal sepsis/ maladjustment	All	17	12.4	8.0–19.0	
		Hypoxia	10	7.3	4.0–12.9
		<i>Streptococcus</i> spp.	2	1.5	0.4–5.2
		Equine Herpes Virus 1	2	1.5	0.4–5.2
		<i>Escherichia coli</i>	1	0.7	0.1–4.0
		<i>Actinobacillus</i> spp.	1	0.7	0.1–4.0
Enteritis/colitis	All	15	10.9	6.7–17.3	
		<i>Clostridium perfringens</i>	2	1.5	0.4–5.2
		<i>Escherichia coli</i>	1	0.7	0.1–4.0
		<i>Lawsonia intracellularis</i>	1	0.7	0.1–4.0
		<i>Salmonella</i> spp.	1	0.7	0.1–4.0
		<i>Eimeria</i> spp.	1	0.7	0.1–4.0
GI rupture/ obstruction	All	12	8.8	5.1–14.7	
	Jejunum	Ascarid (n = 1)	5	3.6	1.6–8.2
	Ileum	Tapeworm (n = 2)	3	2.2	0.7–6.2
	Stomach	Ulceration (n = 1)	2	1.5	0.4–5.2
	Duodenum	Ulceration	1	0.7	0.1–4.0
	Rectum	Impaction	1	0.7	0.1–4.0
Fracture	All	9	6.7	3.5–12.2	
	Rib	Internal haemorrhage	4	2.9	1.1–7.3
	Skull		2	1.5	0.4–5.2
	Pelvis		1	0.7	0.1–4.0
	Carpus		1	0.7	0.1–4.0
	Fetlock		1	0.7	0.1–4.0
	Humerus		1	0.7	0.1–4.0
		<i>Escherichia coli</i>	2	1.5	0.4–5.2
Omphalitis	All	4	2.9	1.1–7.3	
			2	1.5	0.4–5.2
DOD	All	3	2.2	0.7–6.2	
	OCD	1	0.7	0.1–4.0	
	CVM	1	0.7	0.1–4.0	
	Subchondral Cyst	1	0.7	0.1–4.0	
Abdominal abscess	All	3	2.2	0.7–6.2	
		<i>Rhodococcus equi</i>	3	2.2	0.7–6.2
Hepatitis	All	3	2.2	0.7–6.2	
		<i>Listeria monocytogenes</i>	1	0.7	0.1–4.0
Osteomyelitis	All	3	2.2	0.7–6.2	
		<i>Rhodococcus equi</i>	1	0.7	0.1–4.0
		<i>Staphylococcus aureus</i>	1	0.7	0.1–4.0
Arthritis	All	3	2.2	0.7–6.2	
		<i>Staphylococcus aureus</i>	1	0.7	0.1–4.0
		Beta haemolytic <i>Streptococcus</i> spp.	1	0.7	0.1–4.0
Other ^b	All	17			

95%CI, 95% confidence interval; GI, Gastrointestinal; DOD, Developmental orthopedic disease; OCD, Osteochondrosis dissecans; CVM, Cervical vertebral malformation.

^a All pathogens reported by laboratory are described, species given where information available otherwise genus described. Pathogen described may not be primary cause of death in all cases.

^b Other pathologies were reported as nephritis, myositis, vasculitis, neonatal isoerythrolysis (n = 2), hepatopathy (n = 2), ischaemia/infarction (cerebrum n = 1, femoral condyle n = 1), pulmonary oedema, acquired megaesophagus, aspiration pneumonia (drowning), immune mediated synovitis, neoplasia, ethmoidal thrombus, tracheal rupture and cerebral trauma.

the perinatal period (median age at PM 0 days; IQR 0–1 days; range 0–187 days). The musculoskeletal system was most commonly affected (75%; n = 21/28; 95% CI 57–87), in particular by flexural deformities of carpi and fetlocks (71%; n = 15/21; 95% CI 50–86). Table 2 presents a summary of congenital defects affecting the musculoskeletal system.

Pneumonia was the second most commonly reported pathology, where cases presented at a median age of 53 days (IQR 10–117 days;

range 2–453 days) with the majority (85%; n = 17/20; 95% CI 64–95) reported to have been euthanased (n = 11) or died under veterinary treatment (n = 6). Agents were identified in 90% (n = 18/20; 95% CI 70–97) of pneumonia cases, 50% of which were *Rhodococcus equi* (n = 10/20; 95% CI 29–70).

Seventeen cases of neonatal sepsis/maladjustment were identified, with a median age at examination of 3 days (IQR 1–3 days, range 0–31

Table 2

Congenital defects affecting the musculoskeletal system, amongst 137 Thoroughbreds aged between birth and 18 months presented for post-mortem examination to a pathology laboratory in Newmarket, UK, between 2006 and 2020. Proportions and 95% CI given of total cases where congenital defects were reported as the cause of death.

Congenital defect	Anatomical location	n	%	95% CI
All		21		
Contracture	All	11	52.4	32.4–71.7
	Carpus	7	33.3	17.2–54.6
	Carpus and fetlock	4	19.0	7.7–40.0
Contracture and scoliosis	All	3	14.3	5.0–34.6
	Vertebrae and carpus	2	9.5	2.6–28.9
	Vertebrae and fetlock	1	4.8	0.01–22.7
Angular deformity	All	3	14.3	5.0–34.6
	Carpus	2	9.5	2.6–28.9
	Tarsus	1	4.8	0.01–22.7
Hyperextension	Fetlock	1	4.8	0.01–22.7
Scoliosis	Vertebrae	1	4.8	0.01–22.7
Kyphosis	Vertebrae	1	4.8	0.01–22.7
Incomplete ossification	Tarsus	1	4.8	0.01–22.7

days). Most of these cases were reported to have been euthanased ($n = 15/17$; 88%; 95%CI 66–97), while some died under veterinary treatment ($n = 2/17$; 12%; 95%CI 2–34). Infectious agents were identified in 35% ($n = 6/17$; 95%CI 17–59) of neonatal sepsis/maladjustment cases. All cases where pathologies were reported to have resulted from hypoxia ($n = 10$) died or were euthanased within the first 4 days of life (mean age at PM 2 days; SD 1.4 days; range 0–4 days). History data were available for two of these cases, where either dystocia or premature placental separation was reported.

Cases of enteritis/colitis ($n = 15$) presented at a median age of 91 days (IQR 66–201 days; range 2–470 days), with the majority (93%; $n = 14/15$; 95%CI 70–99) having been euthanased ($n = 6$) or died under veterinary treatment ($n = 8$). Two cases were reported as having been ‘drug induced’. Infectious agents were identified in 40% of cases ($n = 6/15$; 95%CI 20–64), with *Clostridium perfringens* most frequently reported (33%; $n = 2/6$; 95%CI 10–70).

Cases of gastrointestinal rupture ($n = 7$) or obstruction ($n = 5$) had a median age at PM of 95 days (IQR 11–266 days; range 3–397 days), with 67% of cases ($n = 8/12$; 95%CI 39–86) reported to have been euthanased or died under veterinary treatment and the remaining 33% to have died ($n = 4/12$; 95%CI 14–61). Parasites (tapeworm or ascarids) were identified in 25% ($n = 3/12$; 95%CI 9–53) of cases.

Cases of fracture ($n = 9$) presented at a median age of 37 days (IQR 10–108 days; range 1–364 days), with 56% of cases ($n = 5/9$; 95%CI 27–81) reported to have been euthanased, reported anatomical locations are given in Table 1. The remaining 44% of cases ($n = 4/9$; 95%CI 19–73) were reported as rib fractures, which either died ($n = 3$) or died under treatment ($n = 1$) as a result of secondary lacerations of the lung, spleen and heart, 75% ($n = 3/4$; 95%CI 30–95) of which occurred during the perinatal period (range of age at PM 1–10 days).

Overall, infectious agents were identified in 33% ($n = 46/137$; 95% CI 26–42) of cases, 85% ($n = 39/46$; 95%CI 72–92) being bacteria; 9% ($n = 4/46$; 95% CI 3–20) parasites and 6% ($n = 3/46$; 95% CI 2–17) viruses. *Rhodococcus equi* was the most commonly reported agent (30%; $n = 14/46$; 95% CI 19–45), with associated pathologies reported as pneumonia (72%; $n = 10/14$; 95% CI 45–88), abdominal abscesses (21%; $n = 3/14$; 95%CI 8–48) or osteomyelitis (7%; $n = 1/14$; 95%CI 1–31) and a median age of 61 days (IQR 43–120 days; range 10–137 days).

3.3. Reported pathology by categories of age at PM examination

The most commonly reported pathology, by age group at PM examination, are presented in Table 3. The distribution of age at PM varied between categories of pathology. Congenital deformities were more

Table 3

Most commonly reported pathologies by category (quartile) of age at examination for 137 Thoroughbreds aged between birth and 18 months presented for post-mortem (PM) examination to a pathology laboratory in Newmarket, UK, between 2006 and 2020. Proportions and 95% CI given of total case numbers (n) in each age group.

Age at PM (days)	Pathology	n	%	95% CI	
0–2 ($n = 38$)	Congenital defect		24	63.1	47.3–76.2
		Limb contracture	14	36.8	23.4–52.7
	NSM	9	23.7	13.0–39.2	
3–22 ($n = 31$)	NSM	8	25.8	13.7–43.2	
	GI Rupture/obstruction	5	16.1	7.1–32.6	
	Pneumonia	9	26.5	14.6–43.1	
23–115 ($n = 34$)	<i>Rhodococcus equi</i>		7	20.6	10.3–36.8
		Enteritis/colitis	6	17.6	8.3–33.5
	Enteritis/colitis	6	17.6	8.3–33.5	
116–540 ($n = 34$)	GI Rupture/obstruction	6	17.6	8.3–33.5	

NSM, Neonatal sepsis/maladjustment; GI, Gastrointestinal.

likely to be reported in neonates (the first 2 days of life) than in those aged between 4 and 18 months at PM examination (OR 56.6, 95%CI 7.0–460.0, $P < 0.001$). Pneumonia was more likely to be reported in horses aged between 1 and 4 months at examination (23–115 days) than neonates (OR 4.2; 95%CI 1.1–1.7; $P = 0.04$). Case numbers were not large enough to allow similar comparisons within other categories of pathologies.

4. Discussion

The study reported here provides insight into the relative distribution of causes of reported pathologies in UK Thoroughbreds aged from birth to 18 months presented for PM examination. Some pathologies reported varied significantly by age at presentation. Congenital deformities, in particular conformational manifestations of developmental orthopedic disease (DOD), were frequently reported in the neonatal period and *Rhodococcus equi* was an important pathogen, isolated in half of cases of pneumonia presented in the pre-weaning period.

Risk of death in Thoroughbred populations has consistently been reported to be highest in the neonatal period, declining thereafter. Galvin and Corley (2010) reported that 67% of 17 deaths observed in a cohort of 338 foals born in IRE between birth and 1 year of age occurred by 30 days and 82% by 6 months of age. A similar pattern of age distribution was observed in a survey by Morley and Townsend (1997) of the outcomes of 805 foals of the 1989 Canadian foal crop, where 45% of 87 reported deaths occurred in the first 14 days of life. The distribution of age at PM examination in the current study (50% by 21 days) is similar to those described above in population level studies suggesting that the cases presented for PM examination are representative of the source population in terms of age distribution.

Overall, congenital deformities were the most commonly reported pathology in this study (20% all cases), notably during the perinatal period (63% cases aged 0–2 days at PM). The majority of deformities were reported to affect the musculoskeletal system, in particular flexural deformities resulting in contracture of the joints of the forelimbs. These findings are in keeping with those of previous population-level studies. Galvin and Corley (2010) showed that congenital abnormalities, including flexural deformities, accounted for 45% ($n = 5/11$) of all cases of mortality by 30 days of age. Morley and Townsend (1997) reported a case fatality rate of 25% in foals between birth and 14 days of age due to contracted tendons. In a survey of 2209 births over five breeding seasons on UK Thoroughbred farms, Platt (1973), described congenital abnormalities to account for 68% of 66 cases of mortality up to 8 weeks of age.

Thoroughbreds are primarily bred for racing and athletic purposes (Parkin and Rosedale, 2006). It is likely that musculoskeletal congenital defects may render an individual unsuitable for athletic performance, resulting in euthanasia even when the defect may not be incompatible with survival, which may serve to explain why such lesions were highly prevalent in the current study population.

Flexural deformities are one manifestation of DOD, a term used to describe a range of conditions affecting the musculoskeletal system of growing horses (McIlwraith, 2004). It is reasonable to assume that cases presented at PM examination represent the most extreme presentations of the syndrome (Adams and Santschi, 2000) and could therefore be the 'tip of the iceberg' in terms of the disease at the population level. O'Donohue et al. (1992) detected signs of DOD in 68% of 248 foals between birth and 18 months of age on 17 farms in IRE and estimated that up to 10% of yearlings produced annually were not suitable for sale due to the condition. Morley and Townsend (1997) described manifestations of DOD as not only a significant cause of death in their most severe presentation, but also the most common reason for horses being unsuitable for racing at 1 year of age. Conformational musculoskeletal defects were reported to have affected 18% of 399 foals, on one farm over three seasons in the UK, in the first 30 days of life (Whittaker et al., 2012).

Despite being a significant cause of morbidity and mortality the precise aetiology of many of the manifestations of DOD remains unclear. Olstad et al. (2007) demonstrated the presence of osteochondral lesions in foals as young as 12 days of age, and experimental studies support a growing body of evidence that DOD may be associated with in utero exposures such as nutritional status of the mare and intra-uterine growth restriction (Allen et al., 2004; Peugnet et al., 2016). The prevalence in the current study supports a need for further research to investigate potential causes and associations with in utero exposures.

Rhodococcus equi was the most common infectious agent in this study, identified in a third of all reported infectious pathologies and half of all cases of pneumonia. *R. equi* is considered one of the most significant pathogens in the equine breeding industry and has a worldwide distribution (Takai, 1997). It presents primarily as chronic bronchopneumonia with abscessation in foals between one and six months of age (Muscatello et al., 2007). Less commonly, enteritis, arthritis, osteomyelitis and abscessation have been reported in foals with and without concurrent respiratory disease (Muscatello et al., 2007). In this study, along with pneumonia, *R. equi* was also isolated from cases with abdominal abscesses and osteomyelitis. There is currently no effective prevention for *R. equi* (Arnold-Lehna et al., 2020) and this study highlights the continued importance of this agent as a contributor to mortality within the UK breeding industry.

The decision to present an animal for PM examination will be based on various factors, and is likely to differ between farms and between horses within farms. As such, a cohort presented for PM examination may not be entirely representative of the population as a whole and should be considered when interpreting results. Clinical information was not available for all horses in this study and it is possible that veterinary treatment and management of some cases may have allowed them to survive for a period of time before succumbing to the disease, in particular with infectious pathologies. This also means that age at death or PM is not necessarily a proxy for when an individual was first affected by a particular condition.

There was considerable variation in the type, extent and detail of both the PM examinations performed and reports used in the present study, which is an important limitation. Therefore, the focus of this study was to describe broader categories of reported pathologies rather than provide pathological description or detail, as this was not available for a substantial proportion of cases. Where limited or gross examinations were performed, as in a notable number of cases (55%) in the present work, there is the potential for pathologies that could have contributed to the reason for euthanasia and/or death, to be missed. Such cases may be misclassified, in particular when horses are electively

euthanased, as the point at which that decision is made may affect the findings at PM examination, and hence reported pathologies. However, given our broad classification based on primary pathological findings as reported by the pathologist, the extent of misclassification bias in this study is likely to be low.

Mortality in the Thoroughbred breeding industry is of both economic and welfare concern (Parkin and Rosedale, 2006). With the industry prioritising efforts to better understand the health and fate of Thoroughbreds both before and after their racing careers, work such as this to describing timings and pathologies reports at PM examination, can aid in directing future strategies and interventions.

5. Conclusions

This study provides current knowledge on the timings and reasons for euthanasia and/or death in the UK Thoroughbred breeding industry. Congenital deformities, in particular conformational manifestations of DOD, are an important contributor to perinatal mortality, highlighting a need for further understanding of in utero exposures which may be involved in their etiology. *Rhodococcus equi*, particularly manifesting as pneumonia, was an important pathogen, confirming the necessity of efforts towards its control and prevention.

Conflict of Interest Statement

The authors declare no competing interests. None of the authors has any financial or personal relationships that could inappropriately influence or bias the content of the paper.

Acknowledgements

Funding for this study was provided by The Racing Foundation, Horserace Betting Levy Board and the Royal Veterinary College's Mellon Fund for Equine Research.

We wish to thank staff at Rossdale Laboratories, Newmarket for their technical assistance.

Preliminary results from this work were presented at the British Equine Veterinary Associations annual congress in September 2021.

Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at [doi:10.1016/j.tvjl.2022.105813](https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2022.105813).

References

- Adams, S.B., Santschi, E.M., 2000. Management of congenital and acquired flexural limb deformities. *Proc. Annu. Conv. Am. Assoc. Equine Pract.* 46, 117–125.
- Allen, W.R., Wilsher, S., Tiplady, C., Butterfield, R.M., 2004. The influence of maternal size on pre- and postnatal growth in the horse: III Postnatal growth. *Reproduction* 127, 67–77.
- Arango-Sabogal, J.C., Mouncey, R., de Mestre, A.M., Verheyen, K.L., 2021. Retrospective analysis of the population dynamics and racing outcomes of the 2014 and 2015 UK and Ireland Thoroughbred foal crops. *Vet. Record* e298, 1–9.
- Arnold-Lehna, D., Venner, M., Berghaus, L.J., Berghaus, R., Giguère, S., 2020. Changing policy to treat foals with *Rhodococcus equi* pneumonia in the later course of disease decreases antimicrobial usage without increasing mortality rate. *Equine Vet. J.* 52, 531–537.
- Baker, J.R., Ellis, C.E., 1981. A survey of post mortem findings in 480 horses 1958 to 1980; (1) causes of death. *Equine Vet. J.* 13, 43–46.
- DeLay, J., 2017. Postmortem findings in Ontario racehorses, 2003–2015. *J. Vet. Diagn. Investig.* 29, 457–464.
- Flash, M.L., Wong, A.S.M., Stevenson, M.A., Gilkerson, J.R., 2020. Barriers to entering race training before 4 years of age for Thoroughbred horses born in the 2014 Australian foal crop. *Public Libr. Sci. One* 15, 1–15.
- Galvin, N., Corley, K., 2010. Causes of disease and death from birth to 12 months of age in the Thoroughbred horse in Ireland. *Irish Vet. J.* 63, 37–43.
- Lyle, C.H., Uzal, F.A., McGorum, B.C., Aida, H., Blisset, K.J., Case, J.T., Charles, J.T., Gardener, I., Horadagoda, N., Kusano, K., et al., 2011. Sudden death in racing Thoroughbred horses: An international multicentre study of post mortem findings. *Equine Vet. J.* 43, 324–331.

- McIlwraith, C.W., 2004. Developmental orthopedic disease: problems of limbs in young horses. *J. Equine Vet. Sci.* 24, 475–479.
- Morley, P.S., Townsend, H.G., 1997. A survey of reproductive performance in Thoroughbred mares and morbidity, mortality and athletic potential of their foals. *Equine Vet. J.* 29, 290–297.
- Morrow, L.D., Smith, K.C., Piercy, R.J., du Toit, N., Burden, F.A., Olmos, G., Gregory, N. G., Verheyen, K.L.P., 2011. Retrospective Analysis of Post-Mortem Findings in 1,444 Aged Donkeys. *J. Comp. Pathol.* 144, 145–156.
- Muscatello, G., Leadon, D.P., Klayt, M., Ocampo-Sosa, A., Lewis, D.A., Fogarty, U., Buckley, T., Gilkerson, J.R., Meijer, W.G., Vazquez-Boland, J.A., 2007. *Rhodococcus equi* infection in foals: the science of ‘rattles’. *Equine Vet. J.* 39, 470–478.
- O’Donohue, D.D., Smith, F.H., Strickland, K.L., 1992. The incidence of abnormal limb development in the Irish thoroughbred from birth to 18 months. *Equine Vet. J.* 24, 305–309.
- Olstad, K., Ytrehus, B., Ekman, S., S. Carlson, C., Dolvik, N.I., 2007. Early lesions of osteochondrosis in the distal tibia of foals. *J. Orthop. Res.* 25, 1094–1105.
- Parkin, T.D., Rosedale, P.D., 2006. Epidemiology of equine performance wastage: importance of analysing facts and implementing their message in management. *Equine Vet. J.* 38, 98–100.
- Peugnet, P., Mendoza, L., Wimmel, L., Duchamp, G., Dubois, C., Reigner, F., Caudron, I., Deliège, B., Toquet, M.-P., Richard, E., et al., 2016. Longitudinal Study of Growth and Osteoarticular Status in Foals Born to Between-Breed Embryo Transfers. *J. Equine Vet. Sci.* 37, 24–38.
- Platt, H., 1973. Etiological aspects of perinatal mortality in the Thoroughbred. *Equine Vet. J.* 5, 116–120.
- Roach, J.M., Foote, A.K., Smith, K.C., Verheyen, K.L., de Mestre, A.M., 2020. Incidence and causes of pregnancy loss after Day 70 of gestation in Thoroughbreds. *Equine Vet. J.* 00, 1–8.
- Smith, K.C., Blunden, A.S., Whitwell, K.E., Dunn, K.A., Wales, A.D., 2003. A survey of equine abortion, stillbirth and neonatal death in the UK from 1988 to 1997. *Equine Vet. J.* 35, 496–501.
- Takai, S., 1997. Epidemiology of *Rhodococcus equi* infections: a review. *Vet. Microbiol.* 56, 167–176.
- Whittaker, S., Sullivan, S., Auen, S., Parkin, T.D.H., Marr, C.M., 2012. The impact of birthweight on mare health and reproductive efficiency, and foal health and subsequent racing performance. *Equine Vet. J.* 44, 26–29.



J. Dairy Sci. 100:10381–10397
<https://doi.org/10.3168/jds.2017-13023>
© American Dairy Science Association®, 2017.

A 100-Year Review: Mastitis detection, management, and prevention¹

Pamela L. Ruegg²

Department of Dairy Science, University of Wisconsin, Madison 53706

ABSTRACT

Mastitis is the most frequent disease of dairy cows and has well-recognized detrimental effects on animal wellbeing and dairy farm profitability. Since the beginning of modern dairy farming, producers have sought effective methods to minimize the occurrence of mastitis in their herds. The objective of this paper is to review and highlight important advances in detection, management, and prevention of mastitis that have occurred since the first volume of the *Journal of Dairy Science* was published in 1917. Initial research efforts were directed at understanding the nature of pathogenic bacteria that were responsible for most intramammary infections. For decades, researchers worked to identify effective strategies to control mastitis caused by *Streptococcus agalactiae* and *Staphylococcus aureus*. To develop successful control programs, mastitis workers first had to identify mechanisms of infection, define the clinical and subclinical states of the disease, discover appropriate screening tests, determine likely points of exposure, identify pathogen-specific characteristics, and develop effective procedures for machine milking. Pioneering researchers eventually recognized that mastitis control was based on preventing new infections from occurring in healthy cows and reducing the duration that cows remained infected. Development of a control program that incorporated post-milking teat dipping, hygienic milking procedures, and strategic use of antibiotic therapy at dry-off resulted in widespread control of contagious pathogens. As herd management changed, researchers were tasked with defining control of mastitis caused by opportunistic pathogens originating from environmental sources. As mastitis pathogens have evolved, researchers have sought to define antimicrobial usage that will maintain animal wellbeing while minimizing unnecessary usage. During the last century, tremendous significant advances in mastitis control have been made but changing herd structure and more

rigorous processor standards ensure that mastitis will remain an important subject focus of future research.

Key words: mastitis, prevention, management, 100-year review, *Journal of Dairy Science*

INTRODUCTION

Historical evidence suggests that cows have been milked since at least 3100 BC (Nemet-Nejat, 1998) and it is likely that bovine mastitis has existed since that time. For millennia, the close contact required by hand milking allowed for easy detection of abnormalities of milk and the mammary gland, but little was known of the causes or management of mastitis. A more complete understanding of mastitis was not possible until the development of microscopes that allowed detection of microorganisms that are the primary etiological agents. The earliest mention of bovine mastitis in the *Journal of Dairy Science* (JDS) occurred in the third issue of 1917 and was focused on public health risks associated with high bacterial counts of raw milk. In that study, Breed and Brew (1917) described a method of grading dairy farms that included enumeration of bacteria in milk and noted that “long chain streptococci” were frequently found in large numbers, even when signs of inflammation were so slight that “farmers cannot be blamed for having saved the milk.” The authors reported bacteriological results from several surveys of raw milk cans and noted in one survey (n = 9,387 cans), that >20% of “high count milk” could be attributable to “udder problems.” During that period, streptococci were the primary known cause of mastitis and the concept of subclinical infections was just becoming known. Since then, pathogens, cows, and herd management have changed dramatically but mastitis remains an important disease of dairy cows. Hundreds of research and review articles with the topic of bovine mastitis have been published in JDS and the emphasis has broadened (Appendix Table A1). Effects of mastitis on public health, processing characteristics of milk, milk quality, animal wellbeing, and farm profitability have become well known. Quality standards for acceptable milk have progressed and concern about mastitis has expanded to include the effect of mastitis management programs on farm sustainability and consumer perceptions. The

Received April 14, 2017.

Accepted June 16, 2017.

¹This review is part of a special issue of the *Journal of Dairy Science* commissioned to celebrate 100 years of publishing (1917–2017).

²Corresponding author: plruegg@wisc.edu

number of research articles in JDS that include content about mastitis has steadily increased from about 3 in 1917 to >100 in 2016. The purpose of this review is to highlight advances in detection, management, and prevention of mastitis with an emphasis on research published in JDS that has encapsulated our changing understanding of the disease.

DETECTION AND DIAGNOSIS

Pathogens Past and Present

In a comprehensive review, Plastridge (1958) noted that bacterial causes for mastitis were first advanced in the late 1800s. An early mastitis researcher (Murphy, 1947) defined a 3-phase process for development of mastitis based on (1) invasion of an organism (with or without establishment of infection), (2) infection (the bacteria became established in the gland), and (3) inflammation. This process continues to serve as the basis of our understanding of mastitis. Although numerous bacteria are recognized as able to cause IMI, initial emphasis of mastitis control was directed at pathogens that were known to spread among cows in a contagious manner when teats were exposed to bacteria in milk that originated from an infected mammary gland. For decades, *Streptococcus agalactiae* and *Staphylococcus aureus* were considered the most important contagious pathogens.

Streptococcus agalactiae and Staphylococcus aureus

Initial concern about bovine mastitis was based on public health and was directed at reducing bacterial counts of raw milk. Breed and Brew (1917) stated, “we have come to know that mastitis is a cause of high bacterial counts. The mastitis causing high bacterial counts has without exception been due to streptococci.” As the dairy industry progressed, a broader understanding of mastitis pathogens emerged. In a manuscript titled “A study of flaky milk,” Jones and Little (1927) reported observations of 20 instances where foremilk revealed “flocculent particles.” Although streptococci were the most prevalent bacteria identified, hemolytic staphylococci (most likely *Staph. aureus*) accounted for 20% of bacterial pathogens, and only 1 case failed to yield significant bacterial growth. That paper contributed to our understanding of mastitis as they correctly defined the abnormalities observed in milk as clumping of leucocytes as a result of inflammation caused by IMI. Although occurrence of large numbers of bacteria in milk was an obvious public health issue, researchers noted that not all of the bacteria originated from IMI

and that many aspects of mastitis remained obscure. By 1927, *Strep. agalactiae* was considered responsible for about 90% of IMI (Williams, 1927) and the subclinical condition was an important reason that milk was de-graded (from grade A to B). During this period, mastitis workers were struggling to find an efficient way to detect infected cows in order to maintain grade A status in infected herds (Williams, 1927). This issue remained important as the prevalence of IMI in the 1950s was estimated to approach 50% of cows and 25% of quarters (Plastridge, 1958). The emphasis on *Strep. agalactiae* as the most important cause of mastitis continued for several decades, although mastitis attributed to *Micrococcus pyogenes* (later defined as *Staph. aureus*) began to be recognized during the 1950s (Plastridge, 1958).

In 1956, at the annual meeting of the American Dairy Science Association, the committee on animal diseases reported that mastitis was “the most costly dairy cattle disease not under satisfactory control,” (Murphy, 1956). In a seminal paper titled “Mastitis—The struggle for understanding,” Murphy (1956) described years of experience with ineffective mastitis control programs in New York and Connecticut, and concluded that “the problem is larger than any single effort put forth toward its understanding.” He then presented 8 points to help define the disease (Table 1). These points serve as the basis of our modern understanding of the disease and succinctly define the challenges inherent in mastitis control. He noted that while >20 types of infections can cause mastitis, “at least 99% are caused by...*Str. agalactiae*, other streptococci, staphylococci and bacillary mastitis (including coliform, pseudomonas etc.).” He identified clinical, nonclinical, and severe states and noted that even though discrimination among pathogens could only be performed by laboratory testing, the clinical and nonclinical states did not occur at the same frequency for all pathogens. Murphy (1956) further stated that shedding (and the chance of negative cultures) varied among pathogens over time and emphasized the need for pathogen-specific control programs so that appropriate treatment could be applied to cows affected with *Strep. agalactiae* while calling for research to identify environmental sources of exposure for other pathogens.

Environmental Pathogens

Until the late 1970s, little emphasis was placed on gram-negative organisms as a cause of mastitis. Eberhart (1977) directed initial attention to the emergence of coliforms as mastitis pathogens and in 1979 a paper titled “Coliform mastitis—A review” was published in JDS by the Coliform Subcommittee of the Research

Committee of the National Mastitis Council (1979). This comprehensive review included a description of growth requirements of various coliform bacteria, mechanisms of IMI (with emphasis on exposure and movement through the teat canal), an explanation of pathogenesis (including recognition that magnitude of inflammation is dependent on host factors), an excellent portrayal of epidemiology and risk factors, and recommendations for a model control program. Publication of this review signaled awareness about the emerging importance of mastitis caused by opportunistic environmental organisms. In 1985, the importance of environmental mastitis was highlighted by a comprehensive symposium paper titled "Environmental mastitis: Cause, prevalence, prevention," (Smith et al., 1985). In that paper, progress in controlling contagious pathogens was contrasted with emergence of mastitis caused by environmental pathogens. They described results of a longitudinal study of a university herd that characterized microbiological characteristics, epidemi-

ology, control, and treatment of both gram-positive and gram-negative pathogens that originate primarily from environmental exposure (Smith et al., 1985). They recognized the importance of reducing teat-end exposure, highlighted differences in susceptibility among cows, and contrasted differences among gram-negative and gram-positive (primarily *Streptococcus* spp.) opportunistic pathogens. Differences among pathogens, the importance of IMI during the dry period, the high rate of spontaneous clearance of gram-negative IMI, and the increased rate of clinical cases (vs. subclinical IMI) associated with environmental pathogens were all thoroughly described. They correctly predicted the challenges of reducing environmental mastitis in herds that have effectively controlled contagious organisms and summarized recommendations for mastitis control that remain relevant for modern intensively managed dairy farms.

The same group (Hogan et al., 1989) later reported that herds with low SCC (indicating successful control

Table 1. Outline for the understanding of mastitis (reproduced from Murphy, 1956)

Disease forms based on laboratory cultures	Clinical stages based on barn observations				
	Non-clinical negative to barn tests*	Mild-clinical positive to barn tests only*	Severe-clinical; also swelling or general illness		
Point 1. Each of the four forms of the disease can appear in each of the clinical stages.					
Point 2. Without laboratory cultures, the clinical stages of each form cannot be distinguished from one another.					
Streptococcal, <i>Strep. agalactiae</i>	Yes	Yes	Yes	Yes	
Streptococcal, other	Yes	Yes	Yes	Yes	
Staphylococcal	Yes	Yes	Yes	Yes	
Bacillary	Yes	Yes	Yes	Yes	
Point 3. The clinical stages do not occur with the same frequency in each form of the disease.					
Point 4. All forms of the disease may fluctuate between the clinical stages, except that severe-clinical mastitis due to <i>Strep. agalactiae</i> rarely occurs.					
Streptococcal, <i>Strep. agalactiae</i>	+++	↔	++	↔	Rare
Streptococcal, other	+++	↔	+	↔	+
Staphylococcal	++	↔	++	↔	+
Bacillary	+	↔	++	↔	++
Point 5. The four forms of the disease have different shedding characteristics.					
Streptococcal, <i>Strep. agalactiae</i> Long duration, positive most days	+++	↔	++	↔	Rare
Streptococcal, other Variable duration, positive most days	+++	↔	+	↔	+
Staphylococcal Variable duration, not positive every day	++	↔	++	↔	+
Bacillary Short duration, often negative when cultured	+	↔	++	↔	++
Point 6. The <i>Strep. agalactiae</i> form of the disease is the only one that can be eliminated from herds. This is economically worthwhile.					
Point 7. The habitat of these bacteria is the environment. It will be a monumental research task to discover their mode of operation. Until then they cannot be eliminated from herds.					
Point 8. By means of treatment and management, the clinical stages may be cured or forced temporarily into the nonclinical stages. At present, it is not known precisely which management practices are of true value.					

*Barn tests such as strip-cup, bromthymol-blue test, White-side test and the California Mastitis test (CMT).

of contagious mastitis pathogens) could experience serious udder health problems that are characterized by high rates of clinical cases. In the ensuing decades, this situation has become common. Between 1994 and 2001, isolation of *Strep. agalactiae* and *Staph. aureus* from milk samples submitted to the Wisconsin Veterinary Diagnostic Laboratory declined dramatically (Makovec and Ruegg, 2003) and gram-negative pathogens (or culture-negative results) have become the predominant results of milk samples obtained from cows experiencing clinical cases (Oliveira et al., 2013). National data collected for US herds has demonstrated considerable improvements in bulk tank SCC, reaching a milk-weighted average of 194,000 cells/mL in 2015 (USDA, 2015). In contrast, from 1996 to 2014, the reported incidence of clinical mastitis on US dairy farms increased from 13% (USDA, 1996a) to 25% (USDA, 2016). Although mastitis caused by *Staph. aureus* remains a challenge for some herds that have not effectively implemented well-known control strategies, a variety of opportunistic pathogens (i.e., *Enterobacteriaceae*, *Streptococcus* spp., CNS, *Lactococcus* spp., *Prototheca* spp., and others) are frequently identified as mastitis pathogens in modern dairy herds (Bradley and Green, 2001; Oliveira et al., 2013). Additional challenges with pathogens such as *Mycoplasma* spp. (Jasper, 1967; Fox, 2012) have been recognized as important for expanding herds, especially if animals are commingled from multiple locations. Identifying mechanisms to reduce exposure and enhance resistance to IMI caused by opportunistic and emerging organisms while also defining appropriate interventions for affected cows will continue to be a challenge for future farmers, veterinarians, and researchers.

Diagnosis and Impact of Mastitis

Leukocyte Counting. Development of reliable tests for detection of mastitis was a priority for early researchers who wanted to ensure public safety, produce high-quality dairy products, and have a practical means of managing affected cows (Halvorsen et al., 1934; Shaw et al., 1937). Detection methods that were evaluated included direct microscopic examination of milk for bacteria, enumeration of milk leukocytes, microbial culture, and detection of various abnormal milk constituents (such as chloride content; Halvorsen et al., 1934). Leukocyte counting rapidly emerged as a practical and repeatable test but general ignorance about the nature of inflammatory responses to IMI made it difficult for early researchers to agree upon an apparently healthy threshold. Although thresholds used for defining mastitis were highly variable (reaching 3,000,000 cells/mL), an early comparative study noted that most milk samples from apparently healthy

glands contained <100,000 cells/mL and identified approximately 200,000 to 250,000 cells/mL as a reasonable threshold for discriminating healthy and abnormal milk samples (Prouty, 1934). However, this threshold was not adopted uniformly for many years, probably because the overall prevalence of cows with subclinical infections was quite high and researchers could not arrive at a consensus for defining normal milk. For many years, the threshold of 500,000 cells/mL combined with isolation of >200 cfu/mL of pathogenic bacteria was commonly used to define subclinical mastitis (Plastridge, 1958).

By 1953, the incidence of subclinical mastitis was found to explain almost 80% of the leukocyte count of milk that was delivered to processors, and this study set the stage for use of leukocyte counting as a herd management tool (MacLeod et al., 1953). The ensuing development of the California Mastitis Test (CMT; Schalm and Noorlander, 1957) and the Wisconsin Mastitis Test (Postle, 1964) provided inexpensive and rapid methods to detect and manage subclinical infections but these tests required producers to collect milk and subjectively evaluate results, thus limiting their applicability. The development of faster and more automated methods to enumerate somatic cells in milk was an area of intense research during the 1960s (Paape et al., 1965). As methods to measure SCC were developed, regulatory authorities began to set limits for bulk tank SCC. In the United States, a maximum bulk tank SCC (1,500,000 cells/mL) was first imposed in 1967. The limit was decreased several times and was stabilized at 750,000 cells/mL in 1993. Limits in northern European countries were much lower; in 1992, the European Union adopted a limit of 400,000 cells/mL, which has become the global standard for milk that is used for products destined for international markets.

Emphasis on reducing bulk tank SCC required identification of infected cows and led to the important step of incorporating SCC tests in monthly DHI programs (Funk et al., 1967). The modern era of managing udder health using monthly SCC testing of individual cows was initiated and, eventually, SCC values came into routine use as a mastitis management tool (Reneau, 1986). The use of monthly SCC values was a departure from previous programs that defined mastitis based almost exclusively on culture of milk samples. Learning how to correctly interpret SCC required knowledge of immunology and physiology, and a comprehensive review of milk SCC published in 1994 remains a relevant reference for understanding factors that influence these values (Harmon, 1994). Today, use of SCC of individual cows is a well-accepted tool that mastitis workers continue to fine tune as pathogens and market needs evolve.

Impact of Mastitis. The negative effects of clinical mastitis were obvious, but the full impact of the disease only gradually became known. Although early researchers recognized that mastitis impeded curd formation (Hansen et al., 1934) and resulted in reduced milk yield (Shaw and Beam, 1935; White et al., 1937), the effect of subclinical mastitis on product quality, milk yield, and overall productivity was not easy to quantify until methods of accurately detecting subclinical infections were developed. The development of the somatic cell score (Ali and Shook, 1980; Wiggans and Shook, 1987) allowed researchers to quantify the linear relationship between subclinical mastitis and reduced milk production. Determining that each 1-unit increase in SCS (or doubling of SCC above 50,000 cells/mL) resulted in a constant production loss (−91 and −181 kg per lactation for parity 1 and >1, respectively) allowed producers to understand the tremendous effect of subclinical mastitis on herd productivity. These values continue to form the basis for estimating the economic impact of mastitis on dairy farms.

Inflammation was known to be detrimental to the mammary gland, but the effect of mastitis beyond the udder did not become apparent until researchers began focusing on environmental pathogens. As researchers studied mastitis caused by gram-negative pathogens, experimental studies indicated that endotoxin could reduce fertility (Gilbert et al., 1990), and several observational studies were subsequently performed to explore this relationship. Initially, researchers recognized that the occurrence of clinical mastitis caused by both gram-negative and gram-positive pathogens resulted in reduced conception rates and increased days to conception (Barker et al., 1998). This research was followed by a study that identified similar detrimental effects for cows affected with subclinical mastitis during the early breeding period (Schrack et al., 2001). Since that time, numerous researchers have confirmed that even relatively modest levels of inflammation can affect fertility, and the effect of inflammation caused by mastitis beyond the mammary gland continues to be an important area of research (Lavon et al., 2011, 2016; Hudson et al., 2012; Fuenzalida et al., 2015).

MANAGEMENT

Definition of Modern Mastitis Control

In 1956, Murphy defined the problem of mastitis (Murphy, 1956; Table 1) but presciently noted that treatment would not be the solution and called for research to define the value of various unproven management practices. Mastitis workers recognized that mastitis was a multifactorial disease but they lacked

research that allowed them to prioritize the effect of various preventive practices. In the next decade, UK researchers from the National Institute for Research in Dairying evaluated a management program that focused on understanding the dynamics of IMI (Figure 1; Dodd et al., 1964). They arrived at the simple equation that the percent of infected quarters within a herd was a function of the rate of new infections and the duration of those infections (Figure 2; Dodd et al., 1964). They noted that treatment was effective for reducing duration (and controlling *Strep. agalactiae*) but was of little value for eliminating staphylococcal infections, thus emphasis was directed at reducing the rate of new IMI. While Neave and Dodd were experimenting with the impact of various management practices (Neave et al., 1966), they correctly noted that, “it means that the control is going to depend on being able to persuade thousands of people of different abilities to conform to particular work patterns.” Four decades later, researchers continue to study methods to persuade farmers to improve mastitis management (Valeeva et al., 2007).

In 1969, JDS published a series of symposium papers that described progress in mastitis control (Dodd et al., 1969; Neave et al., 1969; Norcross and Stark, 1969; Philpot, 1969; Read, 1969). The series was introduced by Frank Dodd, who is recognized as an important pioneer in the field of mastitis control. He summarized data from a longitudinal study of 721 cows in 14 herds (Dodd et al., 1969). At the beginning of the study, 57% of the cows were affected with subclinical mastitis, 80% of which was attributed to either streptococci or staphylococci. Throughout the yearlong study, they characterized the dynamic nature of new infections, occurrence of clinical mastitis (in cows with IMI), and the effect of various treatment strategies on reducing overall prevalence. They also experimented with various management practices that were referred to as a “hygiene system.” They commented that the ideal mastitis control program “must cost much less than the losses caused by the disease, it must be relatively easy to carry out, there should be good experimental evidence that the control works under a range of conditions, and it must be obvious to the farmers who adopt the method that clinical mastitis is much reduced.” In an accompanying paper, Neave et al. (1969) described results of field experiments that evaluated the effect of applying a “full hygiene system.” They described results of a series of experiments and field trials that systematically evaluated use of premilking teat disinfection with individual towels, use of milking gloves, sanitation of teat cups, and efficacy of post-milking teat dip. They reported that a program of “partial hygiene” (the preceding steps without the practice of sanitizing the teat cups between cow milking) resulted

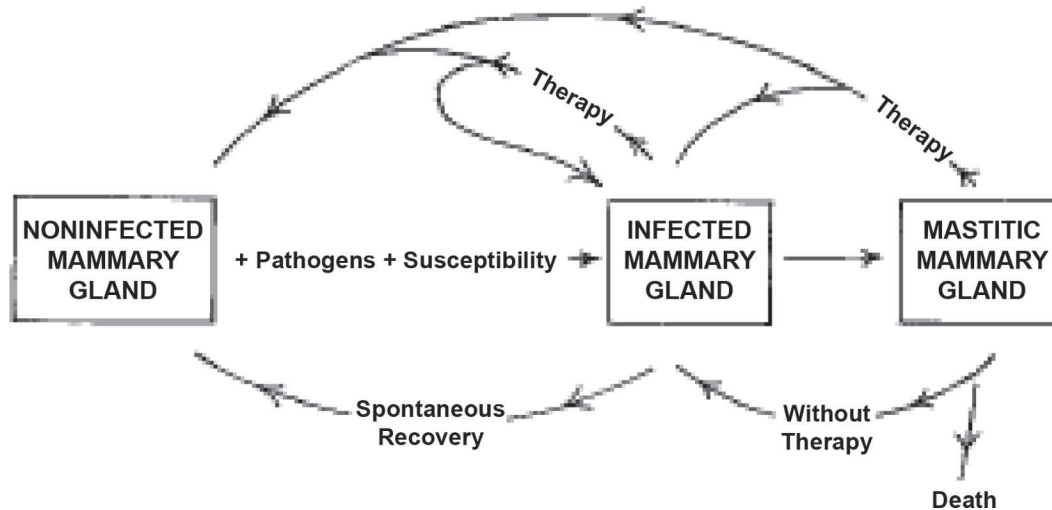


Figure 1. Possible sequence of events in development of infection and mastitis. Reprinted from Dodd et al. (1964) with permission.

in a 44% reduction in new infection rates (Table 2) and advocated use of antibiotic therapy at dry-off to further reduce infections. In the coming years, this plan was widely adopted as the basis of modern mastitis control and the work of Dodd and Neave greatly contributed to improving udder health and milk quality throughout the world. Their work soon led the recently formed National Mastitis Council to develop a mastitis control program known as the “5-Point Plan” that is the basis for controlling contagious mastitis and includes (1) effective post-milking teat dipping, (2) use of antibiotic dry cow therapy in every quarter at the end of each lactation, (3) appropriate treatment of clinical cases, (4) culling of chronically affected cows, and (5) maintenance of milk equipment to ensure stable teat end vacuum.

Antimicrobial Therapy

During the pre-antibiotic era, little could be done with cows that developed IMI and little was known on how to limit transmission. Early researchers determined that periodic examination of milk, followed by segregation and selective culling of affected cows, could be used to establish herds free of *Strep. agalactiae* (Plastridge et al., 1936). However, this control strategy was difficult to implement and when antimicrobials became available researchers rapidly began experiments to determine how to use them. Despite administration of massive doses (that resulted in toxicity in several cows), initial studies with oral sulfanilamide failed to achieve effective concentrations in blood or milk and the researcher noted that “treatment with sulfanilamide was successful in restoring normal flow and normal appearance of milk...but it did not eliminate the streptococci from

the udder, nor prevent later acute attacks (Gildow et al., 1938).” This comment is the first indication that clinical impressions can be misleading in determining efficacy of antimicrobial compounds and illustrate the difficulty of separating the occurrence of inflammation from active IMI. Experiments with intramammary penicillin began in the 1940s and the in vitro efficacy of penicillin against gram-positive mastitis organisms was established by 1945 (Seeley et al., 1945). Even in the early years, researchers were aware that treatment using penicillin was much more efficacious against *Strep. agalactiae* than staphylococcal infections (Seeley et al., 1945). The ineffectiveness of controlling mastitis based on treatment of clinical cases was noted very early in the paper by Murphy (1956) and summarized with the memorable statement that “the utter futility of thinking that mastitis can be controlled by the treatment of clinical mastitis only should be obvious. This is merely cutting the tops off the weeds and leaving the roots.” However, despite variable success and limited understanding of effective means to reduce new infections, use of antibiotics to treat mastitis was rapidly adopted for both lactating and dry cows. Mastitis remains the most common bacterial disease on most dairy farms, and consequently, mastitis treatment and prevention account for the majority of antimicrobials administered to adult dairy cows (Pol and Ruegg, 2007b; Saini et al., 2012; González Pereyra et al., 2015; Kuipers et al., 2016; Stevens et al., 2016). Such use is of increasing concern to consumers and public health authorities, and additional research is required to define appropriate antimicrobial usage that balances animal wellbeing with societal concerns about the role that farm use of antimicrobials plays in development of antimicrobial resistance.

Table 2. Results of field trials that compared normal herd management (control) to a full or partial hygiene program, showing the proportionate reduction (%) in new infection rate with the 3 hygiene systems (reproduced from data in Table 4 in Neave et al., 1969); significant results are shown in bold

Trial ¹	Hygiene comparison ²	Decrease in new infections	Decrease in new <i>Staphylococcus aureus</i> infections	Decrease in new streptococcal infections
MFE ₁	Full vs. control	45 (45)³	33 (41) ³	60 (62)³
MFE ₂	Full vs. control	58	62	70
MFE ₂	Partial vs. control	44	55	63
MFE ₂	Full vs. partial	25	17	19

¹MFE₁ = first field experiment, using 14 herds for 12 mo; MFE₂ = second field experiment, using 15 herds for 18 mo.

²Full hygiene = teat cups pasteurized, udders disinfected with separate udder cloths or towels, and teat dip. Partial hygiene = teat cups not disinfected, disinfectant with separate udder cloths or towels, and teat dip. Control = teat cups not disinfected, udders washed with water and common cloth, and no teat dip.

³After adjustment for the mean number of infected quarters at the start.

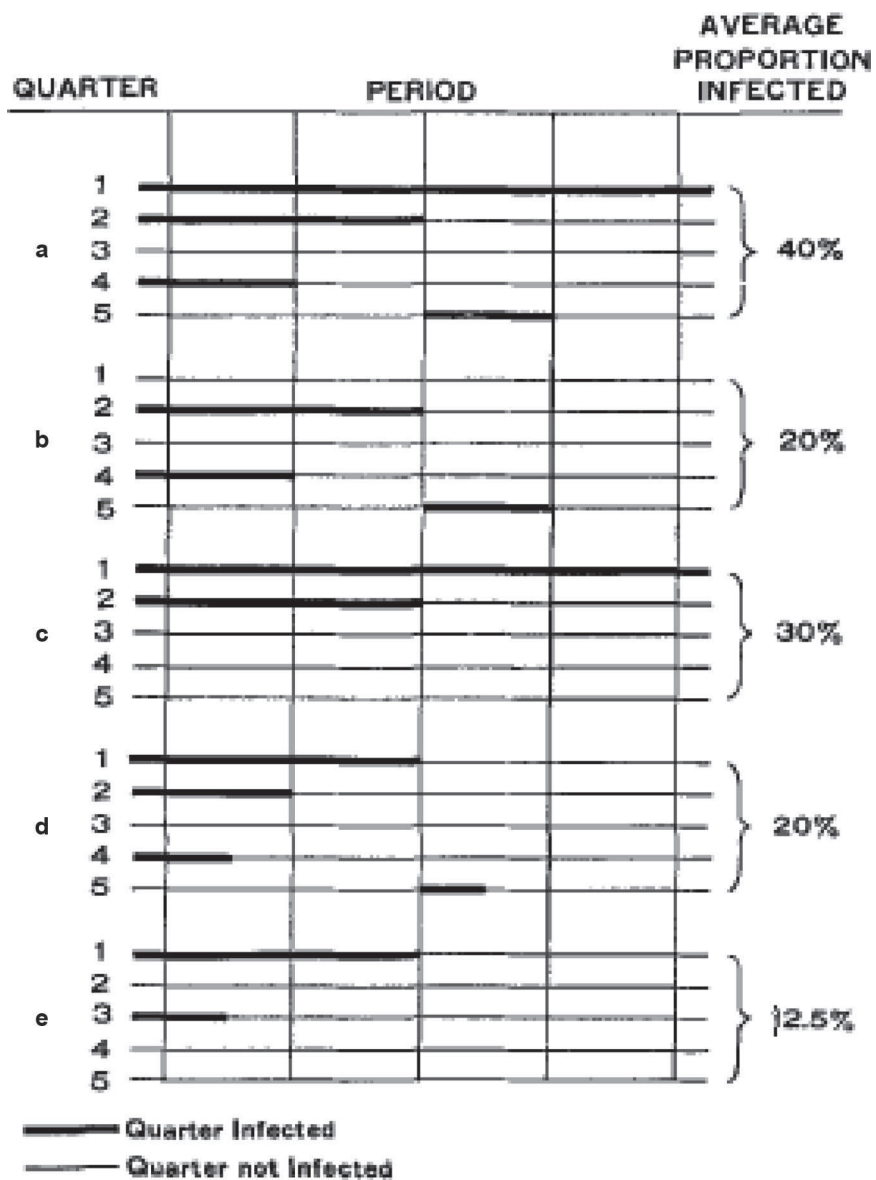


Figure 2. Factors influencing the average level of infection in a herd: prevention of new infection and reduction of duration of infections. Reprinted from Dodd et al. (1964) with permission.

Antibiotic Treatment During Lactation. By 1969, use of antibiotic therapy was well established, and a review article titled “Role of therapy in mastitis control” was published as part of the ADSA mastitis symposium (Philpot, 1969). As appropriate for this period, the emphasis was on treatment of IMI caused by *Strep. agalactiae* and *Staph. aureus*. Recommendations about treatment of subclinical mastitis included a preference for intramammary administration of broad-spectrum drugs suspended in relatively small volumes of aqueous vehicles. Although use of antibiotics to treat mastitis was common, the limitations of therapy were well known by this time. Philpot (1969) emphasized that the excellent prognosis for treatment of *Strep. agalactiae* was partially because of the location of the infection in the milk duct system. In contrast, when referring to *Staph. aureus*, he reported that the “prognosis regarding therapy is disappointingly low” because the organisms “penetrate the duct walls of the udder and become established in numerous foci.” He further stated, “tissue barriers within the udder are of infinitely greater importance in therapeutic failures than the matter of drug resistance.” Although he documented that a single treatment of penicillin would result in elimination of about 90% of IMI caused by *Strep. agalactiae*, he cited 5 studies indicating an expected efficacy of 50% for treatment of staphylococcal IMI. Importantly, this is the first publication that includes recommendations to review individual animal factors (age, stage of lactation, level of milk production, pedigree, and the severity of infection) before deciding to use antibiotics to treat cows affected with *Staph. aureus*. Three decades later, these recommendations were validated in research evaluating factors associated with bacteriological cure of mastitis caused by *Staph. aureus* (Sol et al., 1997, 2000; Barkema et al., 2006). Similar to Philpot (1969), these studies confirmed low bacteriological cure rates (30–50%) and indicated that age of the cow, SCC, infection in the front quarters, and stage of lactation were the most important determinants of successful outcome. More recently, a highly cited review about cow, pathogen, and treatment factors that contribute to therapeutic success of cows infected with *Staph. aureus* again emphasized that only selected animals will respond to antibiotic therapy (Barkema et al., 2006). Philpot (1969) concluded his paper with the following statement that is as relevant today as it was when originally published (capitalized as in original citation): “Therapy can be a valuable adjunct to an effective program of mastitis control. It should be employed, however, with a full awareness that IT IS LESS THAN DESIRABLY EFFECTIVE IN ELIMINATING MANY EXISTING INFECTIONS AND THAT IT

DOES NOT PRECLUDE THE DEVELOPMENT OF MOST NEW INFECTIONS.”

As coliform mastitis was recognized as an emerging problem, researchers began to evaluate the unique challenges in treating these infections. Although it was recognized that many cases were not severe, defining effective treatment of peracute and acute cases was a high priority and almost no controlled studies were available to guide treatment decisions (Coliform Subcommittee of the Research Committee of the National Mastitis Council, 1979). Initially, recommendations for treatment were empirical and included frequent milk out, systemic and intramammary administration of antibiotics, supportive fluid, and anti-inflammatory therapy. The authors noted that approved antibiotics with gram-negative spectrum were not available. Thus, choices of antibiotics included drugs that were soon to be banned for use in dairy cows (such as chloramphenicol) and other drugs that did not have Food and Drug Administration–approved withholding periods (Coliform Subcommittee of the Research Committee of the National Mastitis Council, 1979). Until the 1990s, few trials were performed to validate recommendations for treatment of coliform mastitis but initial experiments indicated that antimicrobial therapy did not improve outcomes of mastitis caused by *Escherichia coli* (Pyörälä et al., 1994) and challenged prevailing concepts of how mastitis should be treated. The important role of the host immune response in clearance of coliform infections (rather than antibiotic therapy) has been highlighted by an important body of research (Burvenich et al., 2003, 2007). Although some broader spectrum drugs later became available, the increased proportion of culture-negative clinical cases and increased diversity of etiological agents have encouraged development of selective treatment protocols (Lago et al., 2011a,b). Current recommendations for treatment of clinical mastitis are based on targeted antibiotic usage for most gram-positive cases while allowing time for spontaneous cure of most other cases (Ruegg, 2017). With increasing pressure to reduce antibiotic usage on dairy farms, additional research is needed to develop evidence-based treatment protocols that use antibiotics appropriately and can be practically applied on a variety of dairy farms.

Dry-Cow Antibiotic Therapy. Early mastitis workers recognized that about 50% of cows had IMI so use of antibiotic therapy to reduce duration of IMI was recommended as part of a comprehensive mastitis control program (Neave et al., 1969). The cost of discarded milk and the risk of milk residues (Albright et al., 1961) were recognized as limitations to using antibiotics to treat the large proportion of infected lactating cows so

Table 3. Numbers of new IMI detected during 2 trials to evaluate use of comprehensive dry cow antibiotic therapy and milking hygiene (reproduced from data in Tables 2 and 5 in Eberhart and Buckalew, 1972)

Trial ¹	Group ²	Period	Quarters infected					No. of new IMI/cow-year	
			<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	Other streptococci	Coliform	Other		Total
1	Control	Lactating	53	51	25	13	4	146	1.50
		Dry	4	12	12	12	0	40	
		Total	57	63	37	25	4	186	
	Treatment	Lactating	14	50	40	27	2	103	
		Dry	2	0	7	10	2	21	
		Total	16	20	47	37	4	124	
2	Control	Lactating	17	1	9	9	1	37	0.98
		Dry	2	1	3	1	1	8	
		Total	19	2	12	10	2	45	
	Treatment	Lactating	0	4	9	3	0	16	
		Dry	0	1	3	4	0	8	
		Total	0	5	12	7	0	24	

¹Trial 1 used 3 herds with about 60 cows per group; trial lasted 2 yr and prevalence of IMI at start of trial was characterized as high. Trial 2 used 2 herds with about 40 cows per group; trial lasted 60 wk and prevalence of IMI at start of trial was characterized as low.

²Control = no post-milking teat dipping and no dry period antibiotic therapy; teats were disinfected before milking and forestripped, and cases of clinical mastitis were treated with antibiotic. Treatment = teats received post-milking disinfection using iodine-based teat dip; all quarters were treated with antibiotic during wk 1 and 2 after dry off; teats were disinfected before milking and forestripped, and cases of clinical mastitis were treated with antibiotic.

use of antibiotic dry-cow therapy (**DCT**) was explored. Researchers had already established that cows were at risk of acquiring IMI during the dry period, and additional benefits of reducing new IMI during this period were hypothesized (Neave et al., 1950). Similar to current concerns about giving antibiotics to animals that may not be infected, early researchers disagreed about which cows should be treated. Some authorities were recommending treatment of all quarters of all cows whereas others believed that only infected cows should be treated (Philpot, 1969). Shortly after DCT was initiated, Natzke (1971) reviewed potential methods of selecting cows for dry treatment. After comparing bacterial culture, use of screening tests (such as CMT), and review of clinical mastitis history, he stated that the limited sensitivity of each of those methods led to the conclusion “that the treatment of all quarters of all cows at the time of drying off is the preferred system. . .” The effectiveness of DCT (combined with teat dipping) was subsequently demonstrated conclusively by several field studies. Use of teat-dipping and comprehensive DCT was shown to reduce new IMI by about 50% in herds with both high and lower prevalence of existing IMI (Table 3), but the authors noted that “other streptococci” were not effectively controlled and one herd that started the trial with high prevalence of IMI experienced increased infections caused by coliform bacteria (Eberhart and Buckalew, 1972). Results of a later study comparing comprehensive DCT to selective DCT (cows selected based on history of clinical mastitis) demonstrated considerably reduced clearance of infections,

increased new IMI, and increased cases of clinical mastitis in cows that were in the selective treatment group (Ward and Schultz, 1974), and use of comprehensive DCT became established as an important component of mastitis control in dairy herds in North America and the United Kingdom. While researchers continued to debate the use of antibiotics in apparently uninfected glands (Rindsig et al., 1978; Poutrel and Rainard, 1981; Schultze, 1983), US dairy farmers rapidly adopted the practice of comprehensive DCT; by 1996, about 77% of farmers used antibiotic DCT in all quarters of all cows at dry-off (USDA, 1996b). In contrast, during the same period, dairy herds in Scandinavia had lower rates of IMI and preferred use of selective dry-cow programs (Schultze, 1983).

As researchers learned more about the high risk of mastitis during the nonlactating period, it became evident that antibiotic DCT was not able to prevent new IMI entirely during the periparturient period (Oliver and Sordillo, 1988). The combination of concern about widespread use of antibiotics and the desire to better reduce IMI during the dry period resulted in development and commercial introduction of a nonantibiotic internal teat sealant (Woolford et al., 1998; Hillerton and Kliem, 2002; Huxley et al., 2002), which was rapidly adopted as an adjunct to antibiotic DCT. The continued decline of IMI caused by *Strep. agalactiae* and *Staph. aureus* and availability of a nonantibiotic alternative to prevent new IMI have again ignited debate and research about selective DCT (Halasa et al., 2010; Cameron et al., 2014; Scherpenzeel et al., 2014).

Economic models have demonstrated that the decision to use either selective or comprehensive antibiotic DCT is highly farm specific (Huijps and Hogeveen, 2007) but it is likely that governmental regulations encouraging reduced antibiotic usage will result in less use of comprehensive antibiotics at dry-off in the future.

PREVENTION

Effect of Milking Machines and Milking Management

Machine Milking. During the century covered by this review, methods of milking and milking management underwent revolutionary changes that go far beyond the scope of this paper. The tremendous progress during this period is illustrated by comments of Witzel (1956), who reviewed advances in dairy farm engineering in JDS for the 50th anniversary of the founding of the American Dairy Science Association. He noted that in 1950, the average herd size was 6 cows and, although 93% of farms had electrical power, only 51% of cows were machine milked. As milking machines rapidly replaced hand milking, researchers became concerned that the machines could cause irritation and serve as fomites for spreading mastitis among cows (Cone, 1942). Research was needed to determine how milking machines functioned relative to the physiology of milk secretion and how adoption of machine milking would influence the risk of mastitis.

Early innovative studies about machine milking were performed by Espe and Cannon (1942), who injected barium into the teat sinus and took a series of radiographs that illustrated functioning of the teat sphincter. These experiments contributed greatly to our understanding of the mechanics of the teat and illuminated the mechanism of bacterial penetration through the streak canal. As research progressed, effects of vacuum level, vacuum stability, and milking duration on risk of mastitis were identified (Mochrie et al., 1953a,b; Eberhart et al., 1968). Eventually, investigators determined that both vacuum fluctuations and milking duration should be minimized to reduce the risk of new IMI associated with liner slips (Baxter et al., 1992).

A decade-by-decade review of progress in machine milking research was published in JDS by Thompson (1981) for the 75th anniversary of the founding of the American Dairy Science Association. Thompson (1981) reviewed advances in development of milking machines and highlighted research about the important association between milking vacuum and IMI. He concluded his review by emphasizing the increasing role for automation in the milking process. He noted that the automatic detacher had been the most important development in milking automation, predicted that sensors would

be developed that would result in “further automation not only of milking tasks but also of management data recording and analysis.” In the decades since his review, automatic milking systems have become commonplace in many regions but effective use of data from the systems is still not optimized (Jacobs and Siegford, 2012). Detection of mastitis and maintaining udder health in automated milking systems remains challenging, and the role of the “competent” herdsman in managing udder health remains as important today as in past decades (Hovinen and Pyörälä, 2011).

A later reviewer (Spencer, 1998) defined the role of the milking machine in maintaining udder health. By this time, many herds had controlled *Strep. agalactiae* and *Staph. aureus*, and the prevalence of IMI had declined. Advances in milking machines had greatly improved vacuum stability, and installation standards for milking systems had been developed. While Spencer (1998) noted that the milking machine could influence new IMI by serving as a fomite, allowing cross-infections within cows, damaging teat sphincters or creating teat impacts, he was one of the first to point out that the milking machine is rarely a direct cause of new IMI. He cited research that demonstrated that only 6.6% of new IMI were accounted for by milking machine factors and concluded that there was no convincing evidence linking the milking machine to the overall prevalence of herd infection (Spencer, 1998).

Milking Management. As milking machines became popular, defining appropriate milking procedures was an important priority. Early mastitis workers had studied physiological mechanisms of milk secretion and ejection, and “pituotrin” (oxytocin) was identified as a substance that could positively stimulate milk flow (McCandlish, 1918). As milking machines were adopted, factors that could influence milk ejection were studied. In one remarkable experiment, the effect of fright on milk ejection was evaluated by placing a cat on the back of a cow and exploding paper bags every 10 s for 2 min (the authors noted that “later the cat was dispensed with as unnecessary”; Ely and Petersen, 1941). This work clearly demonstrated that fear had a significant effect on reducing milk ejection. This was a potentially important finding because incomplete milking of cows chronically infected with *Strep. agalactiae* was soon shown to result in increased occurrence of clinical mastitis (Schalm and Mead, 1943). This study had a lasting effect influence on milking management. Although the authors did not report milk yield of cows enrolled in their experiment, the volume of milk left in the udder (about 1 kg) was probably close to 15 to 20% of the normal daily milk yield of cows of that period. The authors did not report negative effects in cows free of IMI, but this fear—that leaving milk in the

udder led to mastitis—persisted and likely encouraged widespread use of excessively long attachment times for decades to follow.

The association between bacterial colonization of teat skin and development of IMI has been well established and use of management practices that reduce bacterial contamination of teat ends is a fundamental aspect of mastitis control. Dodd et al. (1964) and Neave et al. (1969) established the importance of postmilking teat disinfection for control of contagious pathogens. In a comprehensive review of postmilking teat disinfection, Pankey et al. (1984) stated, “postmilking teat antiseptics is regarded as the single most effective practice for prevention of IMI of lactating dairy cows” but cautioned that it was not equally effective against coliforms and many streptococci. Smith et al. (1985) concurred and noted that postmilking teat disinfection did not effectively control environmental pathogens. As environmental mastitis emerged, researchers began to investigate other preventive strategies. Historically, premilking sanitation had usually been performed by washing udders and teats with water or disinfectants, but Galton et al. (1984, 1988) demonstrated that pre-milking disinfection of teats (not udders) followed by effective drying dramatically reduced development of IMI caused by *Streptococcus uberis*. In a field trial, Pankey et al. (1987) demonstrated a 51% reduction in new IMI caused by streptococci and coliforms when pre-dipping was combined with “good udder preparation.” “Good udder preparation” included teat sanitation, drying using a single-service towel, forestripping, and application of a pre-dip sanitizer for a minimum of 30 s. Pankey (1989) later recommended standardization of premilking procedures and use of proper udder hygiene at every milking. In the United States, regulatory requirements state that teats must be sanitized and dried before milking, and farmers rapidly switched from washing udders to the process of good udder preparation (including pre-dipping and drying teats). National statistics indicate that use of premilking teat sanitation with a dip cup (or spray) followed by drying increased from 58 to 85% of farmers between 1996 (USDA, 1996b) and 2014 (USDA, 2016). Although geographical differences exist in adoption of pre-dipping and other premilking procedures, it is likely that processor preferences for milk with little bacterial contamination, sediment, or residues will continue to encourage adoption of increasingly stringent teat preparation practices.

Other Important Preventive Strategies

Genetic Selection for Mastitis Resistance. The ability to use genetic selection to reduce mastitis has gradually evolved. As part of their pioneering work,

Murphy et al. (1944) observed differences in the rate of IMI among separate cow families of equal productivity within a single herd and noted that heritable differences in susceptibility may contribute to development of IMI. Early estimates of heritability of mastitis ranged from 0.27 (Legates and Grinnells, 1952) to 0.38 (Lush, 1950), but progress toward selection of mastitis resistance was impeded by differences in definition of the disease and by the lack of testing programs. Advancements in genetic selection for mastitis resistance were not possible until widespread adoption of SCC testing in DHI programs. Selection for mastitis resistance was encouraged because genetic increases in milk yield were shown to be correlated with increased susceptibility to mastitis (Shook and Schutz, 1994). Somatic cell scores (Ali and Shook, 1980) were incorporated into US selection indices in 1994 (Schutz, 1994). Although improving mastitis resistance has not been the highest priority of US dairy farmers, considerable progress has occurred in other countries (Heringstad et al., 2008), and future innovations in genomic selection technologies will likely be used to accelerate genetic gains in resistance to mastitis (Vukasinovic et al., 2017).

Supplementation with Vitamin E and Selenium. The role of nutritional management in development of mastitis has long been controversial and difficult to separate from other confounding effects. Plastridge (1958) erroneously suggested that feeding high-concentrate diets was a risk factor for mastitis but direct effects of nutrition on mastitis were not reported until Smith and coworkers (1985) performed experiments that demonstrated that dietary deficiencies of selenium and vitamin E increased incidence and duration of clinical mastitis. Initial experiments were supported by later field studies (Erskine et al., 1987; Weiss et al., 1990) that demonstrated increased subclinical and clinical mastitis in selenium-deficient herds. Researchers performed experiments that demonstrated the essential role of these nutrients in maintaining effective neutrophil function (Grasso et al., 1990; Hogan et al., 1990b, 1993). The important role of vitamin E and selenium in maintaining udder health are now well established and this work contributed to both dietary modification and important knowledge about neutrophil function.

Immunization. The development of effective vaccines to protect cows from developing new IMI has been a goal of numerous mastitis workers. Although vaccines have been used to effectively control other bacterial diseases of dairy cows, the nature of mastitis poses numerous challenges to their success. Mastitis is caused by a variety of evolving bacterial pathogens with strains that vary among farms and over time. The site of IMI within the mammary gland, virulence

characteristics, and immunogenic capabilities all vary among pathogens. Initial vaccine research was directed toward development of vaccines against *Strep. agalactiae* and *Staph. aureus* and although potential efficacy was shown in laboratory experiments, early field trials failed to demonstrate that immunization could reduce new IMI (Oehme and Coles, 1967; Mellenberger, 1977). While several *Staph. aureus* vaccines have been commercialized, successful control of these organisms has been achieved in many regions without use of immunization based on adoption of the well-known principles first described by Dodd et al. (1964).

In contrast to vaccines directed at gram-positive pathogens, experimental challenges and field trials were able to demonstrate acceptable efficacy of a gram-negative core-antigen vaccine (Hogan et al., 1990a, 1992a,b, 1995), and several vaccines are marketed to help dairy farmers control symptoms of mastitis caused by gram-negative bacteria. Gram-negative vaccines are based on a highly conserved core antigen of lipopolysaccharide, thus avoiding the problem of variation in bacterial strains among farms. Similar to vaccines directed at gram-positive pathogens, vaccination with gram-negative vaccines does not have a large effect on reducing new IMI but does significantly reduce the development of clinical signs. In contrast to mastitis caused by *Staph. aureus*, most IMI caused by coliform bacteria develop clinical signs that account for most of the economic and welfare losses associated with these infections. The ability of vaccinated cows to more rapidly clear infections and prevent progression to the clinical state has resulted in widespread usage of these vaccines. The quest for efficacious vaccines continues to be a research priority (Piepers et al., 2017), and contemporary researchers are using advances in immunology to test new vaccines against *Staph. aureus*, environmental streptococci, and other pathogens.

Mastitis in Primigravid Heifers. Until recently, primigravid heifers were not considered affected by mastitis. Although Schalm (1942) recognized that inter-sucking among calves increased risk of postcalving mastitis caused by *Strep. agalactiae*, almost no attention was placed on IMI in heifers until Oliver and Mitchell (1983) reported results of a small study in which they recovered a high frequency of staphylococci from mammary secretion collected in the prepartum period. Subsequent field surveys indicated wide geographical differences in prevalence and type of pathogen based on region and time of sampling (Fox et al., 1995). A high prevalence of IMI caused by *Staph. aureus* was initially reported for prepartum heifers in the southern United States (Trinidad et al., 1990), and led to experiments to identify appropriate interventions. Nickerson et al. (1995) summarized experiments conducted to define

prevalence and control of IMI in dairy heifers. In contrast to that in mature cows, the use of antimicrobial therapy in prepartum heifers was found to be highly efficacious in reducing IMI caused by *Staph. aureus*, and this strategy remains a tool for herds experiencing significant problems with this issue.

More recently, a comprehensive review about mastitis in dairy heifers was published (De Vliegher et al., 2012). In that paper, prevalence studies conducted from around the world were summarized, indicating that although primigravid heifers have a relatively low prevalence of infection with major pathogens, many are colonized by CNS (De Vliegher et al., 2012). Interestingly, IMI in dairy heifers caused by CNS have a high rate of spontaneous cure and do not usually have a negative effect on productivity, making the use of prepartum antibiotic treatment unnecessary in most herds. The authors of that review recommended prevention-based measures such as fly control, avoidance of inter-sucking, and assurance of hygienic and comfortable housing areas. Although considerable progress has been made in defining heifer mastitis, future research is needed to define epidemiological characteristics and to better understand the effect of IMI caused by CNS.

SUMMARY AND FUTURE DIRECTIONS

During the last century, researchers have characterized the nature of IMI, determined mechanisms of the inflammatory response, developed effective mastitis control programs that have been widely adopted throughout the world, and, in many regions, have virtually eradicated the pathogen (*Strep. agalactiae*) that was responsible for the vast majority of mastitis in the first half of this century. The effects of mastitis on productivity, reproductive performance, and product quality have been quantified. Diagnostic tools (such as SCC testing) have been developed that allow producers to identify subclinically infected cows and use targeted management strategies to reduce spread of contagious pathogens. As herd sizes grew and management intensified, researchers recognized emergence of opportunistic pathogens that often result in clinical cases. Tremendous advances in milking machines and milking management have resulted in wide adoption of highly functioning milking systems and standardized milking procedures. Limitations of antimicrobial therapy have been recognized but use of antibiotics to treat cows affected with some pathogens remains an important tool for mastitis control. During the period that this review covers, the effect that mastitis researchers have had on improving milk quality and dairy farm productivity is truly remarkable.

In 1958, Plastring published a review of bovine mastitis in JDS (Plastring, 1958) that summarized current mastitis research and included the following disclaimer: “A complete review is beyond the scope of this communication...” That disclaimer is even more applicable to the current review. An enormous volume of important research has been conducted in the 58 years since that statement was made. In the century covered by this review, numerous researchers have contributed to progress in controlling mastitis. I have attempted to summarize advances in the detection, prevention, and management of bovine mastitis and I have focused on papers published in JDS that helped illustrate how our understanding of mastitis has evolved. Important research has necessarily been excluded, simply due to the constraints of space. I encourage current mastitis researchers to reacquaint themselves with the historical research that has strengthened our knowledge and ability to manage this important disease.

In spite of tremendous progress, in most regions, mastitis remains the most economically significant bacterial disease of dairy cattle, and continued advances in mastitis control are necessary to ensure sustainability of dairy farming worldwide. Most countries have eliminated production controls and globalization has had a tremendous impact on quality standards. The ability to participate in global dairy trade is increasingly dependent on production of milk that meets stringent quality standards that are defined by milk processors rather than government regulators. In emerging dairy regions, there is a need to provide infrastructure and training to help farmers efficiently adopt proven management strategies that minimize development of new IMI and result in production of high quality milk. Investments in defining mastitis control strategies for minor dairy species (such as dairy sheep, goats, and buffalo) are also needed.

In developed dairy regions, intensification of herd management has resulted in new challenges for producers. Studies are needed to fully define risk factors and control strategies for emerging pathogens (such as *Prototheca*, *Mycoplasma bovis*, and others). Research using new diagnostic methods and molecular technologies is needed to fully understand the ecology and control of microbes that reside in the dairy ecosystem and are potential etiologic agents for mastitis. The issue of antimicrobial resistance and societal pressures to reduce antimicrobial therapy on dairy farms will grow in importance, and research defining appropriate use of antimicrobials is a high priority. Standardization of methods used to evaluate efficacy of mastitis treatments is needed to identify when antimicrobial usage is truly beneficial. Continued investment in research to develop alternatives to antimicrobials is required and

more emphasis should be directed at methods of improving mastitis resistance.

Limitations in labor supplies have already contributed to increased use of automation, and this trend will likely accelerate. Increased use of automatic milking systems and incorporation of automation into milking parlors requires research on optimization and effective use of data originating from these systems. All of these research priorities require effective means to communicate and persuade farmers of their utility, thus continued development of mechanisms for knowledge transfer are necessary to fully capture the value of future research gains.

REFERENCES

- Albright, J. L., S. L. Tuckey, and G. T. Woods. 1961. Antibiotics in milk; A review. *J. Dairy Sci.* 44:779–807.
- Ali, A. K. A., and G. E. Shook. 1980. An optimum transformation for somatic cell concentration in milk. *J. Dairy Sci.* 63:487–490.
- Barkema, H. W., Y. H. Schukken, and R. N. Zadoks. 2006. Invited review: The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. *J. Dairy Sci.* 89:1877–1895.
- Barker, A. R., F. N. Schrick, M. J. Lewis, H. H. Dowlen, and S. P. Oliver. 1998. Influence of clinical mastitis during early lactation on reproductive performance of Jersey cows. *J. Dairy Sci.* 81:1285–1290.
- Baxter, J. D., G. W. Rogers, S. B. Spencer, and R. J. Eberhart. 1992. The effect of milking machine liner slip on new intramammary infections. *J. Dairy Sci.* 75:1015–1018.
- Bradley, A. J., and M. J. Green. 2001. Aetiology of clinical mastitis in six Somerset dairy herds. *Vet. Rec.* 148:683–686.
- Breed, R. S., and J. D. Brew. 1917. The control of public milk supplies by the use of the microscopic method. *J. Dairy Sci.* 1:259–271.
- Burvenich, C., D. D. Bannerman, J. D. Lippolis, L. Peelman, B. J. Nonnecke, M. E. Kehrl, and M. J. Paape. 2007. Cumulative physiological events influence the inflammatory response of the bovine udder to *Escherichia coli* infections during the transition period. *J. Dairy Sci.* 90(Suppl. 1):E39–E54.
- Burvenich, C., V. Van Merris, J. Mehrzad, A. Diez-Fraile, and L. Duchateau. 2003. Severity of *E. coli* mastitis is mainly determined by cow factors. *Vet. Res.* 34:521–564.
- Cameron, M., S. L. McKenna, K. A. MacDonald, I. R. Dohoo, J. P. Roy, and G. P. Keefe. 2014. Evaluation of selective dry cow treatment following on-farm culture: Risk of postcalving intramammary infection and clinical mastitis in the subsequent lactation. *J. Dairy Sci.* 97:270–284.
- Coliform Subcommittee of the Research Committee of the National Mastitis Council. 1979. Coliform mastitis—A review. *J. Dairy Sci.* 62:1–22.
- Cone, J. F. 1942. The effect of machine milking upon the leucocyte count and the chloride content of milk. *J. Dairy Sci.* 27:215–224.
- De Vliegher, S., L. K. Fox, S. Piepers, S. McDougall, and H. W. Barkema. 2012. Invited review: Mastitis in dairy heifers: Nature of the disease, potential impact, prevention, and control. *J. Dairy Sci.* 95:1025–1040.
- Dodd, F. H., F. K. Neave, and R. G. Kingwill. 1964. Control of udder infection by management. *J. Dairy Sci.* 47:1109–1114.
- Dodd, F. H., D. R. Westgarth, F. K. Neave, and R. G. Kingwill. 1969. Mastitis—The strategy of control. *J. Dairy Sci.* 52:689–695.
- Eberhart, R. J. 1977. Coliform mastitis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 170:1160–1163.
- Eberhart, R. J., and J. M. Buckalew. 1972. Evaluation of a hygiene and dry period therapy program for mastitis control. *J. Dairy Sci.* 55:1683–1691.

- Eberhart, R. J., W. H. Cloninger, and C. S. Card. 1968. Effects of unstable milking vacuum on some measures of udder health. *J. Dairy Sci.* 51:1026–1030.
- Ely, F., and W. E. Petersen. 1941. Factors involved in the ejection of milk. *J. Dairy Sci.* 24:211–223.
- Erskine, R. J., R. J. Eberhart, L. J. Hutchinson, and R. W. Scholz. 1987. Blood selenium concentrations and glutathione peroxidase activities in dairy herds with high and low somatic cell counts. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 190:1417–1421.
- Erskine, R. J., R. D. Walker, C. A. Bolin, P. C. Bartlett, and D. G. White. 2002. Trends in antibacterial susceptibility of mastitis pathogens during a seven-year period. *J. Dairy Sci.* 85:1111–1118.
- Espe, D., and C. Y. Cannon. 1942. The anatomy and physiology of the teat sphincter. *J. Dairy Sci.* 25:155–160.
- Fox, L. K. 2012. *Mycoplasma mastitis: Causes, transmission, and control.* *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 28:225–237.
- Fox, L. K., S. T. Chester, J. W. Hallberg, S. C. Nickerson, J. W. Pankey, and L. D. Weaver. 1995. Survey of intramammary infections in dairy heifers at breeding age and first parturition. *J. Dairy Sci.* 78:1619–1628.
- Fuenzalida, M. J., P. M. Fricke, and P. L. Ruegg. 2015. The association between occurrence and severity of subclinical and clinical mastitis on pregnancies per artificial insemination at first service of Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 98:3791–3805.
- Funk, C. D., L. H. Schultz, and G. R. Barr. 1967. Investigations on possible use of mastitis-screening tests in Dairy Herd Improvement Association central laboratories. *J. Dairy Sci.* 50:47–52.
- Galton, D. M., L. G. Peterson, and W. G. Merrill. 1988. Evaluation of udder preparations on intramammary infections. *J. Dairy Sci.* 71:1417–1421.
- Galton, D. M., L. G. Petersson, W. G. Merrill, D. K. Bandler, and D. E. Shuster. 1984. Effects of premilking udder preparation on bacterial population, sediment, and iodine residue in milk. *J. Dairy Sci.* 67:2580–2589.
- Gilbert, R. O., W. T. K. Bosu, and A. T. Peter. 1990. The effect of *Escherichia coli* endotoxin on luteal function in Holstein heifers. *Theriogenology* 33:645–651.
- Gildow, E. M., D. L. Fourt, and A. O. Shaw. 1938. Sulfanilamide in the treatment of streptococcal mastitis. *J. Dairy Sci.* 21:759–766.
- González Pereyra, V., M. Pol, F. Pastorino, and A. Herrero. 2015. Quantification of antimicrobial usage in dairy cows and preweaned calves in Argentina. *Prev. Vet. Med.* 122:273–279.
- Grasso, P. J., R. W. Scholz, R. J. Erskine, and R. J. Eberhart. 1990. Phagocytosis, bactericidal activity, and oxidative metabolism of milk neutrophils from dairy cows fed selenium-supplemented and selenium-deficient diets. *Am. J. Vet. Res.* 51:269–274.
- Halasa, T., M. Nielsen, T. van Werven, and H. Hogeveen. 2010. A simulation model to calculate costs and benefits of dry period interventions in dairy cattle. *Livest. Sci.* 129:80–87.
- Halversen, W. V., V. A. Cherrington, and H. C. Hansen. 1934. Laboratory methods for the detection of milk from cows infected with mastitis. *J. Dairy Sci.* 17:281–296.
- Hansen, H. C., D. R. Theophilus, F. W. Atkeson, and E. M. Gildow. 1934. Influence of mastitis on the curd tension of milk. *J. Dairy Sci.* 17:257–264.
- Harmon, R. J. 1994. Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. *J. Dairy Sci.* 77:2103–2112.
- Heringstad, B., E. Sehested, and T. Steine. 2008. Short communication: Correlated selection responses in somatic cell count from selection against clinical mastitis. *J. Dairy Sci.* 91:4437–4439.
- Hillerton, J. E., and K. E. Kliem. 2002. Effective treatment of *Streptococcus uberis* clinical mastitis to minimize the use of antibiotics. *J. Dairy Sci.* 85:1009–1014.
- Hogan, J. S., K. L. Smith, K. H. Hoblet, P. S. Schoenberger, D. A. Todhunter, W. D. Hueston, D. E. Pritchard, G. L. Bowman, L. E. Heider, B. L. Brockett, and H. R. Conrad. 1989. Field survey of clinical mastitis in low somatic cell count herds. *J. Dairy Sci.* 72:1547–1556.
- Hogan, J. S., K. L. Smith, D. A. Todhunter, and P. S. Schoenberger. 1990a. Efficacy of *Escherichia coli* J-5 vaccine for preventing coliform mastitis. Pages 200–204 in *Int. Symp. Bovine Mastitis*, Indianapolis, IN. National Mastitis Council, Arlington, VA.
- Hogan, J. S., K. L. Smith, D. A. Todhunter, and P. S. Schoenberger. 1992a. Field trial to determine efficacy of an *Escherichia coli* J5 mastitis vaccine. *J. Dairy Sci.* 75:78–84.
- Hogan, J. S., K. L. Smith, W. P. Weiss, D. A. Todhunter, and W. L. Schockey. 1990b. Relationships among vitamin E, selenium, and bovine blood neutrophils. *J. Dairy Sci.* 73:2372–2378.
- Hogan, J. S., W. P. Weiss, and K. L. Smith. 1993. Role of vitamin E and selenium in host defense against mastitis. *J. Dairy Sci.* 76:2795–2803.
- Hogan, J. S., W. P. Weiss, K. L. Smith, D. A. Todhunter, P. S. Schoenberger, and L. M. Sordillo. 1995. Effects of an *Escherichia coli* J5 vaccine on mild clinical coliform mastitis. *J. Dairy Sci.* 78:285–290.
- Hogan, J. S., W. P. Weiss, D. A. Todhunter, K. L. Smith, and P. S. Schoenberger. 1992b. Efficacy of an *Escherichia coli* J5 mastitis vaccine in an experimental challenge trial. *J. Dairy Sci.* 75:415–422.
- Hovinen, M., and S. Pyorala. 2011. Invited review: Udder health of dairy cows in automatic milking. *J. Dairy Sci.* 94:547–562.
- Hudson, C. D., A. J. Bradley, J. E. Breen, and M. J. Green. 2012. Associations between udder health and reproductive performance in United Kingdom dairy cows. *J. Dairy Sci.* 95:3683–3697.
- Huijps, K., and H. Hogeveen. 2007. Stochastic modeling to determine the economic effects of blanket, selective, and no dry cow therapy. *J. Dairy Sci.* 90:1225–1234.
- Huxley, J. N., M. J. Green, L. E. Green, and A. J. Bradley. 2002. Evaluation of the efficacy of an internal teat sealer during the dry period. *J. Dairy Sci.* 85:551–561.
- Jacobs, J. A., and J. M. Siegford. 2012. Invited review: The impact of automatic milking systems on dairy cow management, behavior, health, and welfare. *J. Dairy Sci.* 95:2227–2247.
- Jasper, D. E. 1967. *Mycoplasmas—Their role in bovine disease.* *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 151:1650.
- Jones, F. S., and R. B. Little. 1927. A study of flaky milk. *J. Dairy Sci.* 10:439–447.
- Kuipers, A., W. J. Koops, and H. Wemmenhove. 2016. Antibiotic use in dairy herds in the Netherlands from 2005 to 2012. *J. Dairy Sci.* 99:1632–1648.
- Lago, A., S. M. Godden, R. Bey, P. L. Ruegg, and K. Leslie. 2011a. The selective treatment of clinical mastitis based on on-farm culture results: I. Effects on antibiotic use, milk withholding time, and short-term clinical and bacteriological outcomes. *J. Dairy Sci.* 94:4441–4456.
- Lago, A., S. M. Godden, R. Bey, P. L. Ruegg, and K. Leslie. 2011b. The selective treatment of clinical mastitis based on on-farm culture results: II. Effects on lactation performance, including clinical mastitis recurrence, somatic cell count, milk production, and cow survival. *J. Dairy Sci.* 94:4457–4467.
- Lavon, Y., M. Kaim, G. Leitner, D. Biran, E. Ezra, and D. Wolfenson. 2016. Two approaches to improve fertility of subclinical mastitic dairy cows. *J. Dairy Sci.* 99:2268–2275.
- Lavon, Y., G. Leitner, U. Moallem, E. Klipper, H. Voet, S. Jacoby, G. Glick, R. Meidan, and D. Wolfenson. 2011. Immediate and carryover effects of Gram-negative and Gram-positive toxin-induced mastitis on follicular function in dairy cows. *Theriogenology* 76:942–953.
- Legates, J. E., and C. D. Grinnells. 1952. Genetic relationships in resistance to mastitis in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 35:829–833.
- Lush, J. L. 1950. Inheritance of susceptibility to mastitis. *J. Dairy Sci.* 33:121–125.
- MacLeod, P., W. N. Plastringe, E. O. Anderson, V. N. Gullet, and H. H. Hale. 1953. Leucocyte count of herd milk compared to the incidence of mastitis. *J. Dairy Sci.* 36:1267–1271.
- Makovec, J. A., and P. L. Ruegg. 2003. Results of milk samples submitted for microbiological examination in Wisconsin from 1994 to 2001. *J. Dairy Sci.* 86:3466–3472.
- McCandlish, A. C. 1918. The possibility of increasing milk and butterfat production by the administration of drugs. *J. Dairy Sci.* 1:475–486.

- Mellenberger, R. W. 1977. Vaccination against mastitis. *J. Dairy Sci.* 60:1016–1021.
- Mochrie, R. D., H. H. Hale, H. D. Eaton, F. I. Elliott, W. N. Plastringe, and G. Beall. 1953a. Effects of vacuum level and milking duration on udder health in mastitis-free first calf heifers. *J. Dairy Sci.* 36:504–515.
- Mochrie, R. D., H. H. Hale, H. D. Eaton, R. E. Johnson, and W. N. Plastringe. 1953b. A further study of effects of vacuum level and milking duration on udder health and milk production. *J. Dairy Sci.* 36:1223–1232.
- Murphy, J. M. 1947. The genesis of bovine udder infection and mastitis; the occurrence of streptococcal infection in a cow population during a seven-year period and its relationship to age. *Am. J. Vet. Res.* 8:29–42.
- Murphy, J. M. 1956. Mastitis—The struggle for understanding. *J. Dairy Sci.* 39:1768–1773.
- Murphy, J. M., K. O. Pfau, O. L. Lepard, and J. W. Bartlett. 1944. Comparison of the incidence of udder infection and mastitis in two cow families. *Cornell Vet.* 34:185–192.
- Natzke, R. P. 1971. Therapy: One component in a mastitis control system. *J. Dairy Sci.* 54:1895–1901.
- Neave, F. K., A. H. Dodd, and E. Henriques. 1950. Udder infections in the dry period. *J. Dairy Res.* 17:37–49.
- Neave, F. K., F. H. Dodd, and R. G. Kingwill. 1966. A method of controlling udder disease. *Vet. Rec.* 78:521–523.
- Neave, F. K., F. H. Dodd, R. G. Kingwill, and D. R. Westgarth. 1969. Control of mastitis in the dairy herd by hygiene and management. *J. Dairy Sci.* 52:696–707.
- Nemet-Nejat, K. R. 1998. *Daily Life in Ancient Mesopotamia*. Greenwood Press, Westport, CT.
- Nickerson, S. C., W. E. Owens, and R. L. Boddie. 1995. Mastitis in dairy heifers: Initial studies on prevalence and control. *J. Dairy Sci.* 78:1607–1618.
- Norcross, N. L., and D. M. Stark. 1969. Role of immunization in mastitis control. *J. Dairy Sci.* 52:714.
- Oehme, F. W., and E. H. Coles. 1967. Field use and evaluation of a vaccine for bovine staphylococcal mastitis. *J. Dairy Sci.* 50:1792–1797.
- Oliveira, L., C. Hulland, and P. L. Ruegg. 2013. Characterization of clinical mastitis occurring in cows on 50 large dairy herds in Wisconsin. *J. Dairy Sci.* 96:7538–7549.
- Oliver, S. P., and B. A. Mitchell. 1983. Susceptibility of bovine mammary gland to infections during the dry period. *J. Dairy Sci.* 66:1162–1166.
- Oliver, S. P., and L. M. Sordillo. 1988. Udder health in the periparturient period. *J. Dairy Sci.* 71:2584–2606.
- Paape, M. J., H. A. Tucker, and H. D. Hafs. 1965. Comparison of methods for estimating milk somatic cells. *J. Dairy Sci.* 48:191.
- Pankey, J. W. 1989. Premilking udder hygiene. *J. Dairy Sci.* 72:1308–1312.
- Pankey, J. W., R. J. Eberhart, A. L. Cuming, R. D. Daggett, R. J. Farnsworth, and C. K. McDuff. 1984. Uptake on postmilking teat antiseptics. *J. Dairy Sci.* 67:1336–1353.
- Pankey, J. W., E. E. Wildman, P. A. Drechsler, and J. S. Hogan. 1987. Field trial evaluation of premilking teat disinfection. *J. Dairy Sci.* 70:867–872.
- Philpot, W. N. 1969. Role of therapy in mastitis control. *J. Dairy Sci.* 52:708–713.
- Phuektes, P., P. D. Mansell, and G. F. Browning. 2001. Multiplex polymerase chain reaction for simultaneous detection of *Staphylococcus aureus* and streptococcal causes of bovine mastitis. *J. Dairy Sci.* 84:1140–1148.
- Piepers, S., A. Prenafeta, J. Verbeke, A. De Visscher, R. March, and S. De Vliegher. 2017. Immune response after an experimental intramammary challenge with killed *Staphylococcus aureus* in cows and heifers vaccinated and not vaccinated with Startvac, a polyvalent mastitis vaccine. *J. Dairy Sci.* 100:769–782.
- Plastringe, W. N. 1958. Bovine mastitis: A review. *J. Dairy Sci.* 41:1141–1181.
- Plastringe, W. N., E. O. Anderson, F. J. Weirether, and R. E. Johnson. 1936. Infectious bovine mastitis report on a control program based on segregation of infected animals. *J. Dairy Sci.* 19:641–650.
- Pol, M., and P. L. Ruegg. 2007a. Relationship between antimicrobial drug usage and antimicrobial susceptibility of gram-positive mastitis pathogens. *J. Dairy Sci.* 90:262–273.
- Pol, M., and P. L. Ruegg. 2007b. Treatment practices and quantification of antimicrobial drug usage in conventional and organic dairy farms in Wisconsin. *J. Dairy Sci.* 90:249–261.
- Postle, D. S. 1964. The Wisconsin mastitis test. *Proc. Annu. Mtg. U. S. Anim. Health Assoc.* 68:488–494.
- Poutrel, B., and P. Rainard. 1981. California Mastitis Test guide of selective dry cow therapy. *J. Dairy Sci.* 64:241–248.
- Prouty, C. C. 1934. A comparison of the leucocyte count, the brom thymol blue reaction and the catalase content of freshly drawn milk. *J. Dairy Sci.* 17:75–81.
- Pyörälä, S., L. Kaartinen, H. Kack, and V. Rainio. 1994. Efficacy of two therapy regimens for treatment of experimentally induced *Escherichia coli* mastitis in cows. *J. Dairy Sci.* 77:453–461.
- Read, R. B. 1969. Abnormal milk program of interstate milk shippers conference. *J. Dairy Sci.* 52:718.
- Reneau, J. K. 1986. Effective use of dairy herd improvement somatic cell counts in mastitis control. *J. Dairy Sci.* 69:1708–1720.
- Rindsig, R. B., R. G. Rodewald, A. R. Smith, and S. L. Spahr. 1978. Complete versus selective dry cow therapy for mastitis control. *J. Dairy Sci.* 61:1483–1497.
- Ruegg, P. L. 2017. Practical approaches to mastitis therapy on large dairy herds. Pages 933–948 in *Large Dairy Herd Management*. 3rd ed. D. K. Beede, ed. Am. Dairy Sci. Assoc., Champaign, IL.
- Saini, V., J. T. McClure, D. Leger, S. Dufour, A. G. Sheldon, D. T. Scholl, and H. W. Barkema. 2012. Antimicrobial use on Canadian dairy farms. *J. Dairy Sci.* 95:1209–1221.
- Schalm, O. W. 1942. *Streptococcus agalactiae* in the udder of heifers at parturition traced to suckling among calves. *Cornell Vet.* 32:39–60.
- Schalm, O. W., and S. W. Mead. 1943. The effect of incomplete milking on chronic mastitis caused by *Streptococcus agalactiae*. *J. Dairy Sci.* 26:823–832.
- Schalm, O. W., and D. O. Noorlander. 1957. Experiments and observations leading to development of the California mastitis test. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 130:199–204.
- Scherpenzeel, C. G. M., I. E. M. den Uijl, G. van Schaik, R. G. M. O. Riekerink, and T. J. G. M. Lam. 2014. Evaluation of the use of dry cow antibiotics in low somatic count cows. *J. Dairy Sci.* 97:3606–3614.
- Schrick, F. N., M. E. Hockett, A. M. Saxton, M. J. Lewis, H. H. Dowlen, and S. P. Oliver. 2001. Influence of subclinical mastitis during early lactation on reproductive parameters. *J. Dairy Sci.* 84:1407–1412.
- Schultze, W. D. 1983. Effects of a selective regimen of dry cow therapy on intramammary infection and on antibiotic sensitivity of surviving pathogens. *J. Dairy Sci.* 66:892–903.
- Schutz, M. M. 1994. Genetic evaluation of somatic cell scores for United States dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 77:2113–2129.
- Seeley, H. W., Jr., E. O. Anderson, and W. N. Plastringe. 1945. Action of penicillin against mastitis organisms in milk. *J. Dairy Sci.* 28:887–891.
- Shaw, A. O., and A. L. Beam. 1935. The effect of mastitis upon milk production. *J. Dairy Sci.* 18:353–357.
- Shaw, A. O., H. C. Hansen, and R. C. Nutting. 1937. The reliability of selected tests for the detection of mastitis. *J. Dairy Sci.* 20:199–203.
- Shook, G. E., and M. M. Schutz. 1994. Selection on somatic cell score to improve resistance to mastitis in the United States. *J. Dairy Sci.* 77:648–658.
- Smith, K. L., D. A. Todhunter, and P. S. Schoenberger. 1985. Environmental mastitis: Cause, prevalence, prevention. *J. Dairy Sci.* 68:1531–1553.
- Sol, J., O. C. Sampimon, H. W. Barkema, and Y. H. Schukken. 2000. Factors associated with cure after therapy of clinical mastitis caused by *Staphylococcus aureus*. *J. Dairy Sci.* 83:278–284.

Sol, J., O. C. Sampimon, J. J. Snoep, and Y. H. Schukken. 1997. Factors associated with bacteriological cure during lactation after therapy for subclinical mastitis caused by *Staphylococcus aureus*. *J. Dairy Sci.* 80:2803–2808.

Spencer, S. B. 1998. Recent research and developments in machine milking—A review. *J. Dairy Sci.* 72:1907–1917.

Stevens, M., S. Piepers, K. Supre, J. Dewulf, and S. De Vliegher. 2016. Quantification of antimicrobial consumption in adult cattle on dairy herds in Flanders, Belgium, and associations with udder health, milk quality, and production performance. *J. Dairy Sci.* 99:2118–2130.

Thompson, P. D. 1981. Milking machines—The past 25 years. *J. Dairy Sci.* 64:1344–1357.

Trinidad, P., S. C. Nickerson, and T. K. Alley. 1990. Prevalence of intramammary infection and teat canal colonization in unbred and primigravid dairy heifers. *J. Dairy Sci.* 73:107–114.

USDA. 1996a. Part I: Reference of 1996 dairy management practices. USDA-Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS)-Veterinary Services (VS)-Center for Epidemiology and Animal Health (CEAH) National Animal Health Monitoring System (NAHMS), Fort Collins, CO.

USDA. 1996b. Part III: Reference of 1996 dairy health and health management. C. USDA-Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS)-Veterinary Services (VS), Fort Collins, CO.

USDA. 2015. Determining U.S. milk quality using bulk-tank somatic cell counts, 2015. C. USDA-Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS)-Veterinary Services (VS), Fort Collins, CO.

USDA. 2016. Dairy 2014, Milk quality, milking procedures and mastitis in the United States, 2014. USDA-Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS)-Veterinary Services (VS)-Center for Epidemiology and Animal Health (CEAH) National Animal Health Monitoring System (NAHMS), Fort Collins, CO.

Valeeva, N. I., T. J. G. M. Lam, and H. Hogeveen. 2007. Motivation of dairy farmers to improve mastitis management. *J. Dairy Sci.* 90:4466–4477.

Vukasinovic, N., N. Bacciu, C. A. Przybyla, P. Boddhireddy, and S. K. DeNise. 2017. Development of genetic and genomic evaluation for wellness traits in US Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 100:428–438.

Ward, G. E., and L. H. Schultz. 1974. Incidence and control of mastitis during the dry period. *J. Dairy Sci.* 57:1341–1349.

Weiss, W. P., J. S. Hogan, K. L. Smith, and K. H. Hoblet. 1990. Relationships among selenium, vitamin E, and mammary gland health in commercial dairy herds. *J. Dairy Sci.* 73:381–390.

White, G. C., G. W. Couture, E. O. Anderson, R. E. Johnson, W. N. Plastringe, and F. J. Weirether. 1937. Chronic bovine mastitis and milk yield. *J. Dairy Sci.* 20:171–180.

Witzel, S. A. 1956. Development of dairy farm engineering. *J. Dairy Sci.* 39:777–782.

Wiggans, G. R., and G. E. Shook. 1987. A lactation measure of somatic cell count. *J. Dairy Sci.* 70:2666–2672.

Williams, W. L. 1927. The detection of shedders of the streptococcus of mastitis in composite control milk samples. *J. Dairy Sci.* 20:711–717.

Woolford, M. W., J. H. Williamson, A. M. Day, and P. J. A. Copeman. 1998. The prophylactic effect of a teat sealer on bovine mastitis during the dry period and the following lactation. *N. Z. Vet. J.* 46:12.

APPENDIX

Table A1. Timeline of significant advances in detection, management, and prevention of mastitis

Date	Milestone	Reference
1917	Streptococci from infected udders are identified as cause of high bacterial counts in milk.	Breed and Brew, 1917
1927	“Flaky” milk appearance is associated with bacterial inflammation caused by staphylococci and streptococci.	Jones and Little, 1927
1937	Occurrence of subclinical mastitis is shown to reduce milk yield.	White et al., 1937
1942	Anatomic and physiologic aspects of teat sphincter are described.	Espe and Cannon, 1942
1945	In vitro study demonstrates the efficacy of penicillin against gram-positive mastitis pathogens.	Seeley et al., 1945
1950	Heritability of susceptibility to mastitis is estimated.	Lush, 1950
1953	Leukocyte count of bulk milk is shown to predict prevalence of subclinical mastitis in herd.	MacLeod et al., 1953
1956	Pathogen-specific characteristics of infection and disease presentation are first defined.	Murphy, 1956
1957	Development of California Mastitis Test.	Schalm and Noorlander, 1957

Continued

Table A1 (Continued). Timeline of significant advances in detection, management, and prevention of mastitis

Date	Milestone	Reference
1961	National Mastitis Council is formed to unify recommendations for mastitis control.	
1967	First US limit on bulk tank SCC is set at 1,500,000 cells/mL.	
1969	Seminal works on control of <i>Streptococcus agalactiae</i> and <i>Staphylococcus aureus</i> through hygiene and management are published.	Dodd et al., 1969; Neave et al., 1969
1971	Use of comprehensive antibiotic treatment at dry off is promoted.	Natzke, 1971
1982	Linear relationship between SCC and milk yield loss is demonstrated.	Ali and Shook, 1980
1984	Epidemiology and control of environmental mastitis is defined.	Smith et al., 1985
1992	Efficacy of <i>Escherichia coli</i> core antigen vaccine is demonstrated.	Hogan et al., 1992a,b
1994	Mastitis is included in genetic selection indices in United States.	
1995	IMI in prepartum heifers is recognized.	Nickerson et al., 1995
1998	Mastitis shown to reduce fertility.	Barker et al., 1998
1998	Efficacy of internal teat sealants in preventing mastitis is demonstrated.	Woolford et al., 1998
2001	Era of molecular diagnostic tests begins.	Phuektes et al., 2001
2002	Antibiotic usage on farms and possible linkages with antibiotic resistance emerges as an important issue.	Erskine et al., 2002; Pol and Ruegg, 2007a,b
2012	Most US producers are required to meet European Union SCC standard of 400,000 cells/mL.	



Contents lists available at ScienceDirect

The Veterinary Journal

journal homepage: www.elsevier.com/locate/tvj

The microvascular endothelial glycocalyx: An additional piece of the puzzle in veterinary medicine

Sara J. Lawrence-Mills^{a,b,*}, David Hughes^c, Melanie J. Hezzell^c, Matthew Butler^a, Chris Neal^a, Rebecca R. Foster^a, Gavin I. Welsh^a, Natalie Finch^{a,c,d}

^a Bristol Renal, Bristol Medical School, University of Bristol, Bristol, UK

^b current affiliation The Royal Veterinary College, University of London, North Mimms, UK

^c Bristol Veterinary School, University of Bristol, Langford, UK

^d Langford Vets, Langford House, Langford, UK

ARTICLE INFO

Keywords:

Detection
Diagnosis
Disease
Physiology
Visualisation

ABSTRACT

The endothelial glycocalyx (eGlx) is a critically important structure lining the luminal surface of endothelial cells. There is increasing evidence, in human patients and animal models, for its crucial role in the maintenance of health. Moreover, its damage is associated with the pathogenesis of multiple disease states. This review provides readers with an overview of the eGlx; summarising its structure, essential functions, and evidence for its role in disease. We highlight the lack of studies regarding the eGlx in cats and dogs, particularly in naturally occurring diseases. Importantly, we discuss techniques to aid its study, which can be applied to veterinary species. Finally, we present targeted therapies aimed at preserving, and in some cases, restoring damaged eGlx.

Introduction

The glycocalyx (Glx) is a gel-like matrix comprised of a combination of glycosaminoglycan (GAG) sugar chains, proteins, and enzymes, arranged in a mesh work. The most commonly found molecules are glycoproteins and proteoglycans. The Glx is a microscopic structure coating the extracellular membrane of many living cells, including epithelial cells and some bacteria. This review will focus on the endothelial Glx (eGlx) covering the luminal surface of the endothelial cells. The eGlx plays a critical role in the maintenance of health and its perturbation contributes to the pathogenesis of a plethora of diseases. Increased understanding of the eGlx and its contribution to vascular permeability has led to the revision of Starling's principle (Jacob et al., 2007). The eGlx is increasingly recognised as a therapeutic target with the potential to slow the progression of many diseases. Yet, in veterinary species its importance has largely gone unrecognised, likely due to the challenges associated with its study.

Glx structure

The basic structure of the Glx is conserved between prokaryotic cells, including bacteria, and eukaryotic cells, including epithelial and

endothelial cells. The major components are summarised in Fig. 1. Proteoglycans, forming the eGlx backbone, are composed of core proteins and covalently bonded, negatively charged, unbranched GAG side chains. Proteoglycans vary in their number and type of side chains, size of core proteins and their extent of membrane binding. The GAG side chains are composed of linear polymers of disaccharides varying in length and modification, such as acetylation and sulfation. The GAG, hyaluronan, binds directly to the endothelial cell membrane via cell surface receptors (Smart, 2016). There are numerous glycoproteins contained within the eGlx, they are characterised by small-branched carbohydrate chains, examples include endothelial cell adhesion molecules and components of the coagulation and fibrinolytic cascade. The expression of glycoproteins is highly variable, depending on endothelial cell activation (Jung and Ley, 1997). This multi-layered structure also contains various soluble components such as receptors (e.g. fibroblast growth factor receptor (Gloe et al., 2002)), enzymes, and growth factors. Other plasma derived molecules, including albumin, transiently bind to components of the eGlx (Jacob et al., 2007). The richly diverse composition of the eGlx is in dynamic equilibrium with blood, its structure changing in response to the microenvironment.

Significant inter-species differences in eGlx structure are inferred from techniques such as lectin staining. For example, differing staining

* Correspondence to: The Royal Veterinary College, Queen Mother Hospital for Animals, Hawkshead Lane, Brookmans Park, Hatfield, AL9 7TA.
E-mail address: slawrencemills21@rvc.ac.uk (S.J. Lawrence-Mills).

<https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2022.105843>

Received 15 September 2021; Received in revised form 29 April 2022; Accepted 25 May 2022

Available online 30 May 2022

1090-0233/© 2022 The Author(s). Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

patterns in mouse and rat kidneys with lectin conjugates have been demonstrated (Schulte and Spicer, 1983). Inter-species differences in eGlx structure may also contribute to variable eGlx damage following exposure to harmful stimuli, a potential explanation for unique species susceptibility to vascular disease. For example, atherosclerosis, in which eGlx damage contributes to the formation of atherosclerotic plaques (van den Berg et al., 2006; Cancel et al., 2016), represents a significant cause of morbidity and mortality in humans whilst cats and dogs appear naturally resistant (Heron and Anderson, 2016; Seidelmann et al., 2018). eGlx structure may also vary between sexes. This is suggested by the finding that female patients with coronary artery disease had a greatly reduced eGlx depth compared to healthy controls, as a result of greater eGlx shedding in response to disease (Brands et al., 2020), while no difference was found in male patients. Comparative studies exploring the unique differences in eGlx structure between species, sexes, or even individual breeds are yet to be performed. Future research should consider these potential confounding factors in their study design.

Visualisation of the eGlx

There are several methods for eGlx detection and visualisation, which are summarised in Table 1. Due to the extreme fragility and small depth of the eGlx, visualisation is challenging. The eGlx is easily disturbed, dehydrated, and consequently lost during many preparation protocols resulting in many studies underestimating its depth (Luft, 1966; Ueda et al., 2004).

Direct visualisation techniques

Perfusion fixation

The most established and successful technique for direct visualisation of the eGlx involves vessel perfusion and staining (Hegermann et al., 2016). Initial vessel cannulation is required prior to flushing with solutions of physiological oncotic and electrolyte properties (Kimura et al., 2001; Oliveira et al., 2014) to remove plasma proteins and prevent eGlx dehydration (Jacob et al., 2007; Ebong et al., 2011). Following this, vessels are prepared for electron microscopy by perfusion with fixative solutions such as glutaraldehyde in cacodylate buffer prior to perfusion with special stains that bind heavy metal cations to proteoglycans within the eGlx (Curran et al., 1965; van den Berg et al., 2003). Fig. 2 demonstrates the binding of Alcian blue, arguably the most cited staining agent (van den Berg et al., 2003; Ebong et al., 2011), to sulfated GAG side chains present on proteoglycans in rat glomerular endothelial cells. Using this standard technique, the eGlx has been visualised in uterine

and testicular arteries from dogs (Lawrence-Mills et al., 2022a, this issue). The method is technically challenging; vessels require flushing immediately post collection and at physiological pressures to prevent eGlx damage, further fixative solutions require the use of a fume hood. Perfusion fixation also lacks reproducibility both within and between studies, perhaps associated with its technical challenges, leading to discrepancies between eGlx measurements (Hegermann et al., 2016) and limiting the interpretation of these studies. For these reasons, this technique is not well suited to clinical samples.

Immersion fixation

The difficult and time-consuming nature of vessel perfusion has led to the development of immersion fixation methods. Some studies report excellent success with this technique, demonstrating images of similar quality to perfusion fixed samples (Yang et al., 2014). However, potential limitations include the spontaneous shedding following immersion (Chappell et al., 2009); poor penetration of cations makes the eGlx more prone to collapse upon fixation. Alternative studies have implemented immersion fixation prior to staining with lectins (Mulivor and Lipowsky, 2004) or specific fluorescent-labelled antibodies targeting eGlx components such as heparan sulfate (Florian et al., 2003). Few studies have compared a variety of eGlx fixation and visualisation techniques (Betteridge et al., 2017); however, the duplicity of sex-organ tissue does lend itself to such investigations.

Lectin staining

Lectins are glycoproteins isolated from plants, animals, bacteria, and viruses (Sharon and Lis, 2004). Uniquely, lectins bind specific carbohydrates and can be used to target GAGs within the eGlx (Mulivor and Lipowsky, 2004; Dane et al., 2013). A novel technique for eGlx quantification using lectin labelling termed 'peak-to-peak measurement', utilises cell membrane labelling with octadecyl rhodamine B chloride (R18) in combination with eGlx labelling lectin to derive a measure of the eGlx thickness (Betteridge et al., 2017). In vivo rat studies have demonstrated this peak-to-peak method correlates with eGlx measurements taken from electron micrographs (Betteridge et al., 2017). Others have also utilised lectin staining to study the eGlx in dogs (Meyer et al., 2008; Yabuki et al., 2012) and cats (Castagnaro et al., 1987; Roussel and Dalion, 1988; Kamiya et al., 1991). It must be noted that none of the aforementioned studies confirmed eGlx staining but rather assumed the staining to be associated with eGlx based on the location relative to the endothelium. Confirmation of eGlx specific staining requires either co-staining of the cell membrane, with R18 for example (Oltean et al., 2015), or further electron microscopy imaging (Mennander et al., 2012).

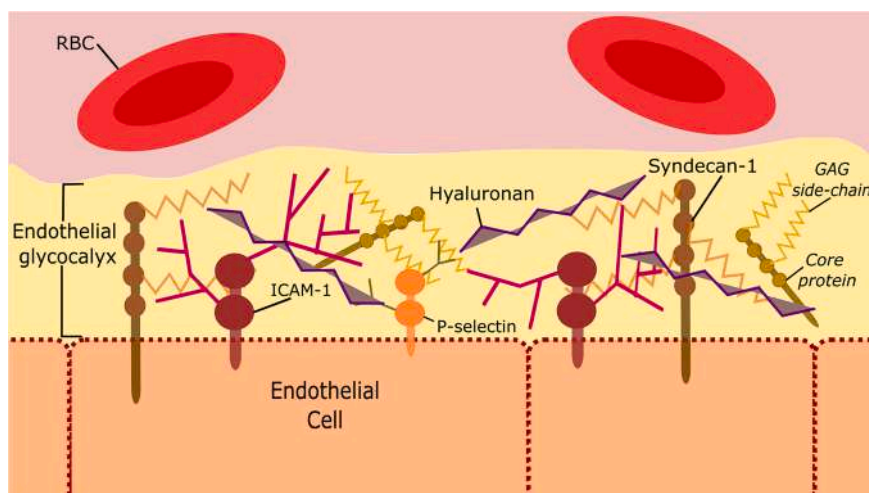


Fig. 1. Schematic representation of the key structural components of the endothelial glycocalyx. GAG, glycosaminoglycan; ICAM-1, intercellular adhesion molecule-1; RBC, red blood cell.

Table 1
Advantages and disadvantages of the key glycocalyx detection methods.

	Technique	Advantages	Disadvantages
Direct Detection	Perfusion fixation and staining with heavy metal ions	Reference standard technique	Technically challenging; clinically impractical
	Immersion fixation and staining with heavy metal ions	Quick; simple	Variable success; requires tissue biopsy
	Immersion fixation and lectin staining	Simpler sample collection and processing than perfusion techniques	Species- and organ-specific; 'peak-to-peak' technically challenging
Indirect Detection	Quantification of circulating eGlx components (ELISAs)	Clinically applicable; minimally invasive	Applicable to specific components
	Sidestream dark field imaging	Clinically applicable; non-invasive	eGlx depth inferred; only suitable for anaesthetised animals

eGlx, endothelial glycocalyx; ELISA, enzyme linked immunosorbent assay.

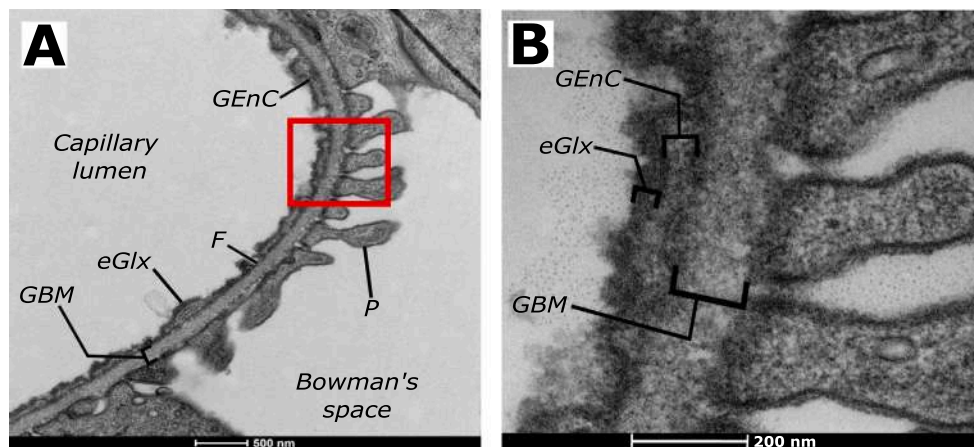


Fig. 2. Electron micrograph images using Alcian blue staining of the endothelial glycocalyx (eGlx) on the surface of rat glomerular endothelial cells. The red box indicates the area in (A) magnified in (B). F, endothelial fenestration; GBM, glomerular basement membrane; GEnC, glomerular endothelial cell; P, podocyte foot process.

Lectins also display different binding patterns in different studies. For example, wheat germ agglutinin (WGA) was reported to successfully label eGlx in feline heart muscle and brain in one study (Castagnaro et al., 1987) but not in another (Roussel and Dalion, 1988). The reasons for such differences are unclear but may include differences in succinylation of lectins, the use of different fixatives, variation in glycans expressed by individual animals, and variations in disease status.

Indirect eGlx measurement

Many direct detection and visualisation techniques are unsuited for eGlx study in clinical samples. The quantification of circulating eGlx breakdown products in blood and urine is a more clinically applicable tool (Schmidt et al., 2016; Smart, 2016). Such methods that quantify eGlx components in biological fluids include colorimetric methods, high-performance liquid chromatography, mass spectrometry, and enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) (Imanari et al., 1992; Padberg et al., 2014; Schmidt et al., 2016). ELISAs can quantify specific eGlx components, for example hyaluronan, and syndecan-1 (Padberg et al., 2014; Yini et al., 2015). As discussed above, there can be species differences in eGlx structure related primarily to the arrangement and contribution of differing proteoglycans and glycoproteins (Dore et al., 1998). Therefore, specific assays may be more effective for the detection of eGlx shedding in some species than in others. The plethora of functions of hyaluronan have influenced its high conservation across species (Garantziotis and Savani, 2019), enabling cross-species use of hyaluronan ELISAs. Multiple studies in both humans and animal models have demonstrated a correlation between circulating components of eGlx and other direct and indirect measurements of eGlx thickness (Rehm et al., 2007; Vlahu et al., 2012). Therefore, the quantification of circulating

eGlx components is widely accepted as a marker of eGlx health.

The use of ELISAs to measure eGlx components has been reported in dogs (Yini et al., 2015). Syndecan-1 and heparan sulfate ELISAs were used to evaluate the effectiveness of unfractionated heparin in protecting the eGlx in a canine model of septic shock (Yini et al., 2015). However, it is unclear whether these assays were validated for use in dogs. Measurement of hyaluronan using a commercially available ELISA validated for use with serum samples from dogs suggested eGlx shedding following rapid crystalloid fluid administration in a canine model of haemorrhagic shock (Smart et al., 2018). Plasma hyaluronan concentrations have been measured in healthy dogs to investigate the impact of varying fluid rates and demonstrated no significant differences in hyaluronan concentrations between fluid administration rates (Beiseigel et al., 2021). Recently, using the same hyaluronan ELISA, eGlx damage was demonstrated in dogs with naturally occurring myxomatous mitral valve disease and dogs in a hypercoagulable state (Lawrence-Mills et al., 2022b, this issue). Hyaluronan specifically has also been measured as a marker of vascular health in other diseases. For example, serum hyaluronan has been reported to be higher in dogs with portosystemic shunts (Seki et al., 2010). While serum hyaluronan concentration was shown to decrease from one month post shunt ligation (Devriendt et al., 2021). These studies used hyaluronan as a marker of liver perfusion due to its rapid catabolism by hepatic sinusoidal endothelial cells; however, the increased circulating concentrations could alternatively indicate eGlx damage in these diseases.

The need for more non-invasive methods of eGlx measurement has led to the development of a technique that utilises sidestream dark field imaging of microvasculature (typically of the sublingual mucosa) in combination with specialist software. This technique infers eGlx depth by measuring the perfused boundary region (PBR). This is the intra-

luminal area where flowing red blood cells can move through the eGlx and is distinct from the impermeable portion of eGlx (Fig. 3). Damage to the eGlx results in an increased PBR, thus PBR is an indirect measure of eGlx health (Martens et al., 2013). This technique is already being used in human patients to investigate the eGlx. For example, Pouska et al. (2018) used the PBR to investigate the impact of a fluid challenge on the eGlx and were able to demonstrate a significantly increased PBR following administration of 500 mL balanced crystalloid. Sidestream dark field imaging has been explored for veterinary use. Two studies have applied this methodology in a non-invasive way to measure the eGlx in the sublingual microvasculature of anaesthetised dogs (Londoño et al., 2018) and cats (Yozova et al., 2021). In horses, sidestream dark field video microscopy has been used to assess microvascular perfusion (Mansour et al., 2021), but not the eGlx. This technique has also been implemented to assess bowel microcirculation. In human patients; measurements of microvascular flow index have been shown to be similar between bowel and sublingual microvasculature (de Bruin et al., 2016). In veterinary species, sidestream dark field video microscopic assessment of jejunal eGlx has been proposed as a marker of jejunal microvascular health in dogs (Mullen et al., 2020), with potential applications that include aiding in the identification of compromised intestine requiring resection. Measurements in all studies in veterinary species were reported to be similar to those obtained in humans. However, findings were not correlated to any other direct or indirect measurement of the eGlx. Further, the requirement for access to sublingual or jejunal microvasculature and the need to obtain images over several minutes means at present this technique can only be used in anaesthetised animals.

eGlx function

The eGlx contributes to vascular health through a multitude of functions. The primary functions are outlined in Fig. 4.

Vascular permeability

The eGlx is critical to maintaining vascular homeostasis and overall health. It directly regulates vascular permeability because the size and spatial arrangement of proteins and disaccharides form a physical mesh and the heavily sulfated GAGs generate a net negative charge. The combination of physical and electrostatic properties of the eGlx create a macromolecular sieve excluding molecules > 70 kDa from reaching luminal endothelial cell membranes (Vink and Duling, 1996). Furthermore, binding of circulating albumin to the eGlx generates an oncotic pressure within the eGlx, thus locally increasing the intravascular oncotic pressure. Vascular permeability is therefore influenced by the

oncotic pressures within the vessel lumen, the eGlx, and the interstitium (Jacob et al., 2007). Fluid movement across the vessel wall to the surrounding tissue is therefore determined by the difference between the oncotic pressures in all three compartments (Jacob et al., 2007; Salmon et al., 2009). This revises the traditional Starling's force theory that previously only considered the global intravascular oncotic pressure relative to the surrounding tissue (Jacob et al., 2007; Smart, 2016).

Vessel wall interaction

The eGlx regulates interactions between cells within the vessel, such as red blood cells and platelets, and the endothelial cell membrane. It provides a physical coating on the surface of the endothelial cells thus preventing direct contact with circulating cells (Pries et al., 1998). Furthermore, the 'hiding' of functionally active glycoproteins, such as selectins and integrins, helps to maintain vascular homeostasis. Degradation of the eGlx exposes intracellular adhesion molecule-1 resulting in leukocyte adherence and activation (Mulivor and Lipowsky, 2009). The fine balance between a hyper- and hypo-coagulable state is maintained through the storing of enzymatic cofactors within the eGlx, including antithrombin and tissue-type plasminogen activator (Johansson et al., 2011). The ability of the eGlx to bind enzymes such as superoxide dismutase also acts to protect the endothelium (Li et al., 1998). eGlx bound superoxide dismutase scavenges oxygen free radicals, thereby reducing oxidative stress and preventing endothelial dysfunction.

Mechanotransduction

The eGlx acts as a mechanotransducer, enabling endothelial cells to respond to the forces induced by plasma flow. Shear stress is transmitted via eGlx transmembrane proteins, thought to bind intracellularly to the endothelial cell cytoskeleton (Pries et al., 2000). Shear stress signals determine eGlx composition, with chronic shear stress exposure increasing glycosaminoglycan synthesis (Arisaka et al., 1995). Furthermore, flow mediated vasodilation is regulated by the eGlx. Increases in blood flow cause conformational changes within the eGlx triggering the release of nitric oxide (NO) (Mochizuki et al., 2003) which in turn mediates local vasodilation and increased vascular permeability (Santos-Parker et al., 2017).

Evidence for eGlx involvement in disease

There is a growing body of evidence supporting the role of eGlx shedding in animal models of disease and naturally occurring disease in humans, however, few studies have examined this in cats and dogs. Table 2 summarises the evidence for eGlx degradation in human patients with naturally occurring disease and the limited evidence in cats and dogs. The majority of evidence for the role of eGlx damage is from experimental animal models and spontaneous diseases in humans and veterinary species for the following states:

Sepsis

Sepsis refers to the systemic inflammatory response to infection (Singer et al., 2016). Sepsis is a leading cause of death in critically ill cats and dogs (Babyak and Sharp, 2016; Kenney et al., 2010). The eGlx is pathophysiologically important in sepsis due to its important roles in vascular permeability and tone. Alterations in eGlx composition following an inflammatory insult is thought to be one of the earliest features of sepsis in humans (Martin et al., 2016; Steppan et al., 2011). Dogs with septic peritonitis have been shown to have increased hyaluronan concentrations on day 2 or 3 of hospitalisation compared to admission, these concentrations decreased during the recovery period (Shaw et al., 2021). The same study identified relationships between serum interleukin (IL)-6 and hyaluronan concentrations, suggesting an association between inflammation and eGlx degradation. In dogs with

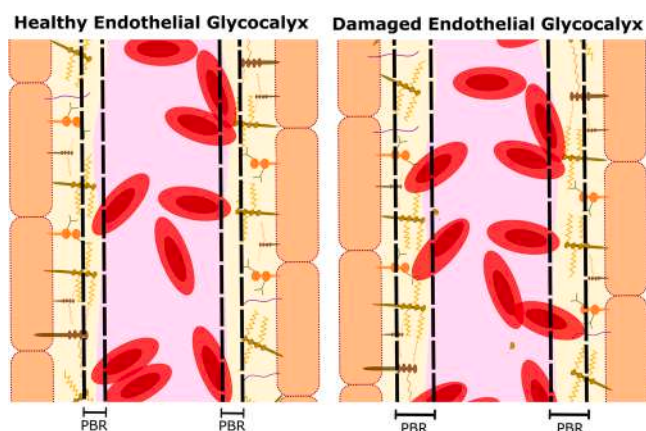


Fig. 3. Schematic representation of the perfused boundary region (PBR), demonstrating two vessels, the left with a healthy endothelial glycocalyx and the right with a damaged endothelial glycocalyx.

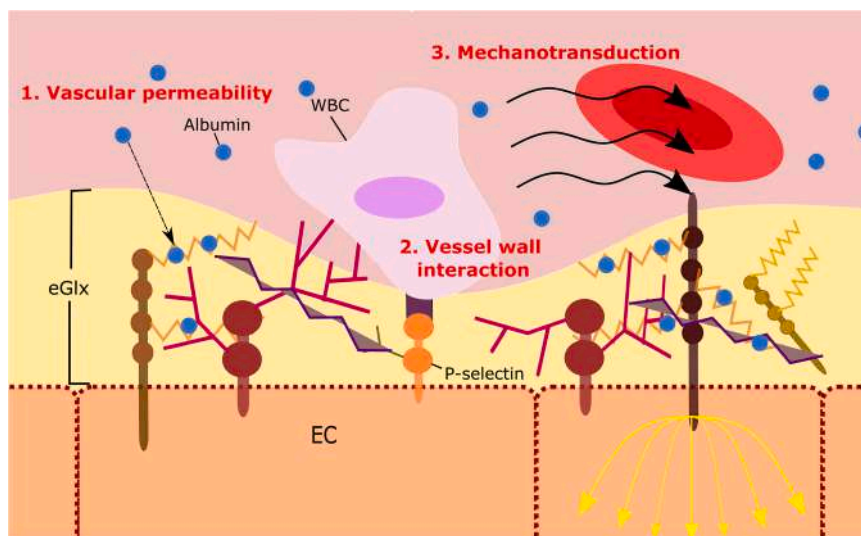


Fig. 4. Main functions of the endothelial glycocalyx (eGlx). Vascular permeability is demonstrated by the exclusion of albumin. Vessel wall interaction is shown by the thin area of the eGlx exposing P-selectin on the endothelial membrane enabling leukocyte binding. Forces of plasma flow, depicted by the black arrows, are transmitted through the brown proteoglycan into the endothelial cell, indicated by the yellow arrows. EC, endothelial cell; WBC, white blood cell.

Table 2

Outlining specific examples of evidence for endothelial glycocalyx shedding in different disease states in humans and veterinary species.

	Reference	Disease state	Marker used	Finding
Human patients	Schmidt et al. (2016)	Sepsis; ARDS	Urinary GAG fragment (HS, CS, and HA)	In septic patients, urinary GAG fragments correlated with kidney dysfunction, and urinary HS and HA concentrations were associated with mortality. In ARDS patients, higher urinary GAGs fragments were associated with risk of developing an AKI.
	Padberg et al. (2014)	CKD	Plasma syndecan-1 and HA	Plasma syndecan-1 and HA increased across CKD stages and increases were independently associated with kidney dysfunction.
	Dane et al. (2014)	ESRD	PBR; plasma syndecan-1	Compared to healthy controls, ESRD patients had increased PBR and higher plasma syndecan-1.
	Vlahu et al., 2012	Dialysis patients	PBR; serum syndecan-1 and HA	Compared to healthy controls, dialysis patients had increased PBR, serum syndecan-1, and serum HA.
	Steppan et al. (2011)	Sepsis; major abdominal surgery	Plasma syndecan-1 and HS	Surgical and septic patients had increased plasma syndecan-1 and HS (septic > surgical).
	Nelson et al. (2008)	Sepsis	Plasma syndecan-1	Plasma syndecan-1 increased in septic patients. Increases were correlated with increased risk of mortality.
Veterinary Species	Shaw et al. (2021)	Septic peritonitis	Serum HA	Serum HA increased on day 2 or 3 of hospitalization. Interleukin-6 was a predictor of serum HA.
	Lawrence-Mills et al. (2022b)	Hypercoagulability; MMVD	Plasma HA	Increased plasma HA was found in dogs with hypercoagulability as well as dogs with MMVD.
	Naseri et al. (2020)	Canine parvoviral enteritis	Serum ESM-1	Higher serum ESM-1 was found in non-survivors.
	Yini et al. (2015)	Septic shock model	Plasma syndecan-1 and HS	Increased plasma syndecan-1 and HS was found following injection with a lethal dose of <i>E. coli</i> .

AKI, acute kidney injury; ARDS, acute respiratory distress syndrome; CKD, chronic kidney disease; CS, chondroitin sulfate; ESM-1, endothelial cell-specific molecule-1; ESRD, end-stage renal disease; GAG, glycosaminoglycan; HA, hyaluronan; HS, heparan sulfate; MMVD, myxomatous mitral valve disease; PBR, perfused boundary region.

parvoviral enteritis, circulating endothelial cell-specific molecule-1 concentrations were increased compared to controls (Naseri et al., 2020) suggesting endothelial cell injury. However, the eGlx components syndecan-1 and heparan sulfate, were not found to be significantly different between affected dogs and controls (Naseri et al., 2020). This may be due to small sample size or the timing of sampling (samples were collected at admission only, relatively early in the disease process) or poor assay performance.

The role of eGlx damage in perpetuating inflammation and vascular compromise has been demonstrated (Annecke et al., 2011; Schmidt et al., 2012). eGlx damage induces capillary leakage, platelet aggregation, coagulation, and loss of vascular tone (Annecke et al., 2011; Desjardins and Duling, 1990; Johansson et al., 2011) as well as expression of adhesion molecules, such as intercellular adhesion molecule-1, enabling leukocyte extravasation (Meerschaert and Furie,

1995; Stulc et al., 2008). The important role of eGlx shedding in perpetuating inflammation, and further eGlx damage, is evidenced by endotoxaemia induced eGlx shedding in mice initiating the activation of endothelial heparanase, a heparan sulfate-specific glucuronidase which induces eGlx degradation and neutrophil adhesion (Schmidt et al., 2012). The same study demonstrated heparanase inhibition attenuated sepsis-induced acute lung injury and mortality in mice.

eGlx shedding has been demonstrated to contribute to the pathophysiology of sepsis. Specifically, shed eGlx components have been demonstrated to act as damage-associated molecular patterns, further triggering proinflammatory cascades (Goodall et al., 2014). Heparan sulfate fragments have been shown to mediate cytokine release; the addition of soluble heparan sulfate to human blood mononuclear cells triggered the release of IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, and tumour necrosis factor (TNF), an effect mediated by Toll-like receptor-4 (Goodall et al.,

2014). Further, the binding of heparan sulfate to interferon-gamma has been shown to significantly decrease its plasma clearance, as well as increasing its cytokine activity by 600%, through limiting the degradation of its carboxy-terminal domain (Lortat-Jacob et al., 1996). Moreover, eGlx degradation offers a plausible explanation for the hypercoagulable state of many septic patients (Hoppensteadt et al., 2015). Indeed, increased serum hyaluronan concentration is also reported in dogs with hypercoagulability (Lawrence-Mills et al., 2022b, this issue). The critical role of the eGlx in regulating haemostasis; including the regulation of interactions between circulating cells and the endothelial cell membrane (Pries et al., 1998), the 'hiding' of functionally active glycoproteins (Mulivor and Lipowsky, 2009; Schmidt et al., 2012), and the storage of enzymatic cofactors (Pries et al., 2000), makes eGlx shedding one of the plausible pathophysiological mechanisms contributing to hypercoagulability in dogs.

In addition to improved understanding of the pathophysiology of sepsis, knowledge of the effects of intravenous fluid administration on the eGlx may help prevent iatrogenic worsening of disease. Research in people has outlined the negative impact of over-infusion in septic patients (Kelm et al., 2015). Crucially, this is linked with increased mortality (Alsous et al., 2000; Uchino et al., 2006). These data have informed international guidelines for the treatment of sepsis, in which cautious use of fluid therapy is recommended following initial emergency resuscitation (Dellinger et al., 2008). Damage to the eGlx is considered to be one of the consequences of over-infusion (Chappell et al., 2014). In canine experimental models of haemorrhagic shock, rapid crystalloid administration increased eGlx shedding (Smart et al., 2018). This finding is in line with those in human patients and animal models and suggests avoidance of excessive fluid bolus administration may be important in the management of shock in dogs. Markers of eGlx damage provide prognostic information in septic human patients (Kumar et al., 2006; Mouncey et al., 2015) and this may similarly hold true in dogs and cats. In human septic shock patients, circulating GAG concentrations were significantly increased in non-survivors compared to survivors (Nelson et al., 2008).

Kidney disease, proteinuria, and microalbuminuria

Chronic kidney disease (CKD) is common in companion animals. One retrospective study identified 40 % of adult cats under 15 years of age had CKD, this increased to 80 % for cats above 15 years (Marino et al., 2014). One Swedish study reported a lifetime prevalence of CKD in dogs of 16 % (Pelander et al., 2015), although reports vary; some stating a prevalence as low as 3.7 % (O'Neill et al., 2013). In humans, systemic eGlx breakdown, quantified by circulating eGlx components, is correlated with kidney dysfunction (Dane et al., 2014; Vlahu et al., 2012) with a 4-fold greater concentration of the eGlx components, syndecan-1 and hyaluronan, in CKD patients compared to healthy controls (Padberg et al., 2014). Further, incrementally higher concentrations of eGlx components are demonstrated in increasing stages of disease (Padberg et al., 2014). Additionally, the concentration of urinary GAG fragments in critically ill human patients correlates with kidney dysfunction (Schmidt et al., 2016). Studies evaluating eGlx damage and kidney function in cats and dogs are yet to be published; however, measurement of urinary GAG components offers a potential non-invasive biomarker. Moreover, improved knowledge of the role of the eGlx in chronic and acute kidney diseases in cats and dogs may allow development of much needed targeted therapeutics.

Systemic eGlx damage is reported in human CKD patients. In addition, eGlx damage specifically within the renal microvasculature can contribute to perturbations in renal permeability (Singh et al., 2007; Oltean et al., 2015; Desideri et al., 2018; Butler et al., 2019; Onions et al., 2019; Ramnath et al., 2020). In humans, glomerular eGlx shedding can occur following exposure to circulating inflammatory noxae (Padberg et al., 2014). Loss of glomerular eGlx integrity contributes to increased albumin (and potentially other macromolecule) permeability

(Henry and Duling, 2000; Zdolsek et al., 2020). Thus, glomerular eGlx damage plays a role in the development of proteinuria and specifically albuminuria in glomerular injury (Singh et al., 2007; Lees et al., 2011). In vitro studies have supported the role of glomerular eGlx shedding in microalbuminuria in humans (Singh et al., 2007). Further, it has been hypothesised that microalbuminuria may signify systemic eGlx damage as well as glomerular eGlx damage (Singh and Satchell, 2011). In humans, microalbuminuria is clinically important as it is associated with increased risk of all-cause mortality (Xia et al., 2015), cardiovascular disease (Segura et al., 2004), progression of multiple aetiologies of kidney disease, and increased mortality due to kidney disease (Matsushita et al., 2010). The clinical significance of microalbuminuria in cats and dogs remains unclear, as does its relationship with glomerular or systemic eGlx damage.

Hypervolaemia and hypertension

Hypervolaemia has been associated with increased mortality in hospitalised dogs (Cavanagh et al., 2016). Hypervolaemia and hypertension induce eGlx shedding in human patients and animal models (Ueno et al., 2004; Bruegger et al., 2011; Chappell et al., 2014). Hypervolaemia induced eGlx shedding in dogs is supported by findings of increased circulating hyaluronan following rapid large-volume crystalloid administration in an experimental canine haemorrhagic shock model (Smart et al., 2018). The same study investigated the impact of the type and rate, as well as overall volume, of fluid administered. Peak hyaluronan concentration was identified earlier, after 20 min, following isotonic crystalloid infusion, compared to later, after 40 min, following infusion of 4 % succinylated gelatin. Further, eGlx damage was greater with isotonic crystalloid at a high rate of infusion 80 mL/kg over 20 min, compared to other solutions at 20 mL/kg over 20 min. A different study has demonstrated increased plasma hyaluronan concentrations from baseline in dogs following both 5 and 10 mL/kg/h crystalloid fluid administration (Beiseigel et al., 2021), demonstrating even modest fluid rates have the potential to induce eGlx degradation. In human patients a significantly increased PBR has been demonstrated following a 500 mL crystalloid bolus in both spinal surgery patients and septic shock patients (Pouska et al., 2018). The PBR normalised within 60 min in spinal surgical, but not septic shock patients, suggesting that even conservative boluses may produce long-term eGlx damage in patients with an already vulnerable eGlx. Hypervolaemia in itself damages the eGlx via haemodilution of plasma proteins as well as osmotic alterations (Pries et al., 1998; Torres et al., 2013); however, it also induces the release of atrial natriuretic peptide from the atria of the heart (Chappell et al., 2014). Atrial natriuretic peptide induces eGlx shedding and loss of vascular barrier function in the coronary vascular bed of guinea pig hearts (Bruegger et al., 2005; Jacob et al., 2013).

The impact of hypertension on eGlx has been most extensively studied in brain endothelial cells. Early eGlx shedding, primarily in capillaries, was demonstrated in a spontaneously hypertensive rodent model, which compromised the integrity of the blood brain barrier (Ueno et al., 2004). In companion animals, systemic hypertension is most commonly a result of concurrent disease (Acierno et al., 2018). Up to 93 % of dogs with CKD (Anderson and Fisher, 1968), 67 % of dogs with diabetes (Marynissen et al., 2016) and 73 % of dogs with hyperadrenocorticism (Ortega et al., 1996) are hypertensive. Studies report 87 % of hyperthyroid cats and 46 % of cats with CKD to be hypertensive (Kobayashi et al., 1990). Uncontrolled systemic hypertension results in target organ damage within susceptible tissues including the kidney, eye, brain, and heart (Acierno et al., 2018). The pathophysiology of target organ damage is multifactorial; however, a key component is endothelial inflammation and injury (Schmid-Schönbein et al., 1991; McCarron et al., 1994; Schillaci et al., 2003). The vital role the eGlx plays in maintaining vascular integrity makes its involvement in target organ damage in human patients unsurprising, although this remains unstudied in cats and dogs. Importantly, restoration of the eGlx offers

potential protection of important organs in patients with secondary hypertension, alongside anti-hypertensive medications and management of the primary disease.

Therapeutic protection of the eGlx

Growing evidence for the contribution of eGlx damage in a plethora of human disease states has led to a focus in medical research into therapies to prevent eGlx shedding or restore damaged eGlx. Research into targeted therapies is in its infancy and there are currently no licensed products. To date, the evidence suggests that one of the most effective strategies for eGlx protection is by preventing fluid volume overload (Chappell et al., 2014). This has helped inform fluid therapy regimes in human patients (Dellinger et al., 2008) and cats and dogs (Byers, 2017). However, specific recommendations for fluid infusion rates remain heavily debated. In people with sepsis, rates of up to 30 mL/kg of crystalloid fluids over the first 3 h have been recommended (Rhodes et al., 2017). Updated guidelines grade the evidence behind this as low-quality and instead suggest the use of dynamic measures to guide fluid resuscitation (Evans et al., 2021). For example, monitoring changes in stroke volume in response to passive leg raise. However, species-specific blood volume and fluid tolerance limits direct extrapolations from recommendations for people to veterinary species. Instead, the consensus is for a patient-based individualised approach (Monteleagre and Lyons, 2021). Isotonic crystalloids are generally the fluid type of choice in human and veterinary patients with colloids having the potential to result in a hypervolaemic state and eGlx damage (Rehm et al., 2001).

Alternatively, inhibition of enzymes that initiate eGlx degradation has been explored. Pre-treatment with etanercept, a TNF inhibitor, prevented an increase in plasma hyaluronan concentrations as well as decreasing coagulation activation in men injected with *E. coli* lipopolysaccharide endotoxin (Nieuwdorp et al., 2009). Doxycycline may stabilise the eGlx by inhibition of matrix metalloproteinases. Its administration to rats prior to and during insult decreased eGlx shedding, following infusion of artificial chemoattractant peptide f-Met-Leu-Phe into intestinal mesentery (Mulivor and Lipowsky, 2009). The clinical success of approaches that selectively inhibit eGlx degradation enzymes is likely to be limited due to the vast number of enzymes capable of damaging the eGlx, as well as the need to administer these inhibitors pre-emptively for maximal effect (Mulivor and Lipowsky, 2009; Purushothaman et al., 2010).

Reconstitution of the eGlx provides an additional therapeutic option. Sulodexide, a purified GAG containing 80 % heparan sulfate and 20 % dermatan sulfate (Veraldi et al., 2018), has demonstrated the most promise. Sulodexide is thought to promote eGlx regeneration, down-regulate eGlx degradation enzymes and exert an anti-apoptotic and anti-inflammatory effect on endothelial cells (Ciszewicz et al., 2009; Broekhuizen et al., 2010). In human type-2 diabetic patients, sulodexide partially normalised vascular permeability postulated to be in part due to restoration of a healthy eGlx (Broekhuizen et al., 2010). However, larger clinical trials investigating the use of sulodexide in preventing progression of kidney and heart disease have proved inconclusive (Lewis et al., 2011; Packham et al., 2012), potentially due to study design. In dogs, the potential for eGlx reconstitution has been demonstrated in a canine model of septic shock in which unfractionated heparin infusion reduced eGlx shedding (Yini et al., 2015).

Conclusions

The eGlx is a dynamic and fascinating structure with a critical role in health and disease. Composed of proteoglycans, glycoproteins, and soluble plasma proteins its composition is integrally linked to its function in regulating vascular permeability, endothelial cell interactions and mechanotransduction. Study of the eGlx is challenging. However, we have presented techniques in this review that are suited to veterinary

clinical patients such as indirect measurement of eGlx components using ELISAs. In humans, there is much emerging evidence that eGlx damage prevents its normal function in maintaining vascular homeostasis and contributes to the pathophysiology and progression of many diseases. In veterinary species, research is in its infancy, although early studies have suggested eGlx degradation plays a role in naturally occurring disease in dogs. Research in veterinary species should initially focus on demonstrating the presence of eGlx damage in disease, and validating the tools necessary for its study, prior to evaluating potential therapeutics.

Conflict of interest statement

This research was funded in whole, or in part, by the Wellcome Trust (204813/Z/16/Z). None of the authors of this paper has any other financial or personal relationship with other people or organisations that could inappropriately influence or bias the content of the paper.

References

- Acierno, M.J., Brown, S., Coleman, A.E., Jepson, R.E., Papich, M., Stepien, R.L., Syme, H. M., 2018. ACVIM consensus statement: guidelines for the identification, evaluation, and management of systemic hypertension in dogs and cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 32, 1803–1822.
- Alsous, F., Khamies, M., DeGirolamo, A., Amoateng-Adjepong, Y., Manthous, C.A., 2000. Negative fluid balance predicts survival in patients with septic shock: a retrospective pilot study. *Chest Journal* 117, 1749–1754.
- Anderson, L.J., Fisher, E.W., 1968. The blood pressure in canine interstitial nephritis. *Research in Veterinary Science* 9, 304–313.
- Annecke, T., Fischer, J., Hartmann, H., Tschöep, J., Rehm, M., Conzen, P., Sommerhoff, C.P., Becker, B.F., 2011. Shedding of the coronary endothelial glycocalyx: Effects of hypoxia/reoxygenation vs ischaemia/reperfusion. *British Journal of Anaesthesia* 107, 679–686.
- Arisaka, T., Mitsumata, M., Kawasumi, M., Tohjima, T., Hirose, S., Yoshida, Y., 1995. Effects of shear stress on glycosaminoglycan synthesis in vascular endothelial cells. *Annals of the New York Academy of Sciences* 748, 543–554.
- Babyak, J.M., Sharp, C.R., 2016. Epidemiology of systemic inflammatory response syndrome and sepsis in cats hospitalized in a veterinary teaching hospital. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 249, 65–71.
- Beiseigel, M., Simon, B.T., Michalak, C., Stickney, M.J., Jeffery, U., 2021. Effect of peri-operative crystalloid fluid rate on circulating hyaluronan in healthy dogs: a pilot study. *The Veterinary Journal* 267, 105578.
- van den Berg, B.M., Vink, H., Spaan, J.A., 2003. The endothelial glycocalyx protects against myocardial edema. *Circulatory Research* 92, 592–594.
- van den Berg, B.M., Spaan, J.A., Rolf, T.M., Vink, H., 2006. Atherogenic region and diet diminish glycocalyx dimension and increase intima-to-media ratios at murine carotid artery bifurcation. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory* 290, H915–H920.
- Betteridge, K.B., Arkill, K.P., Neal, C.R., Harper, S.J., Foster, R.R., Satchell, S.C., Bates, D. O., Salmon, A.H.J., 2017. Sialic acids regulate microvessel permeability, revealed by novel in vivo studies of endothelial glycocalyx structure and function. *The Journal of Physiology* 595, 5015–5035.
- Brands, J., Hubel, C.A., Althouse, A., Reis, S.E., Pacella, J.J., 2020. Noninvasive sublingual microvascular imaging reveals sex-specific reduction in glycocalyx barrier properties in patients with coronary artery disease. *Physiological Reports* 8, e14351.
- Broekhuizen, L.N., Lemkes, B.A., Mooij, H.L., Meuwese, M.C., Verberne, H., Holleman, F., Schlingemann, R.O., Nieuwdorp, M., Stroes, E.S., Vink, H., 2010. Effect of sulodexide on endothelial glycocalyx and vascular permeability in patients with type 2 diabetes mellitus. *Journal of European Association of the Study of Diabetes* 53, 2646–2655.
- Bruegger, D., Jacob, M., Rehm, M., Loetsch, M., Welsch, U., Conzen, P., Becker, B.F., 2005. Atrial natriuretic peptide induces shedding of endothelial glycocalyx in coronary vascular bed of guinea pig hearts. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology* 289, H1993–H1999.
- Bruegger, D., Schwartz, L., Chappell, D., Jacob, M., Rehm, M., Vogeser, M., Christ, F., Reichart, B., Becker, B.F., 2011. Release of atrial natriuretic peptide precedes shedding of the endothelial glycocalyx equally in patients undergoing on- and off-pump coronary artery bypass surgery. *Basic Research in Cardiology* 106, 1111–1121.
- de Bruin, A.F., Kornmann, V.N., van der Sloot, K., van Vugt, J.L., Gosselink, M.P., Smits, A., Van Ramshorst, B., Boerma, E.C., Noordzij, P.G., Boerma, D., 2016. Sidestream dark field imaging of the serosal microcirculation during gastrointestinal surgery. *Colorectal Disease* 18, O103–O110.
- Butler, M.J., Ramnath, R., Kadoya, H., Desposito, D., Riquier-Brisson, A., Ferguson, J.K., Onions, K.L., Ogier, A.S., Elhegri, H., Coward, R.J., et al., 2019. Aldosterone induces albuminuria via matrix metalloproteinase-dependent damage of the endothelial glycocalyx. *Kidney International* 95, 94–107.
- Byers, C.G., 2017. Fluid therapy: options and rational selection. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 47, 359–371.

- Cancel, L.M., Ebong, E.E., Mensah, S., Hirschberg, C., Tarbell, J.M., 2016. Endothelial glycocalyx, apoptosis and inflammation in an atherosclerotic mouse model. *Atherosclerosis* 252, 136–146.
- Castagnaro, M., Alroy, J., Ucci, A.A., Glew, R.H., 1987. Lectin histochemistry and ultrastructure of feline kidneys from six different storage diseases. *Cell Pathology including Molecular Pathology* 54, 16–26.
- Cavanagh, A.A., Sullivan, L.A., Hansen, B.D., 2016. Retrospective evaluation of fluid overload and relationship to outcome in critically ill dogs. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* 26, 578–586.
- Chappell, D., Jacob, M., Paul, O., Rehm, M., Welsch, U., Stoeckelhuber, M., Conzen, P., Becker, B.F., 2009. The glycocalyx of the human umbilical vein endothelial cell: An impressive structure *ex vivo* but not in culture. *Circulation Research* 104, 1313–1317.
- Chappell, D., Bruegger, D., Potzel, J., Jacob, M., Brettner, F., Vogeser, M., Conzen, P., Becker, B.F., Rehm, M., 2014. Hypervolemia increases release of atrial natriuretic peptide and shedding of the endothelial glycocalyx. *Critical Care* 18, 538.
- Ciszewicz, M., Polubinska, A., Antoniewicz, A., Suminska-Jasinska, K., Breborowicz, A., 2009. Sulodexide suppresses inflammation in human endothelial cells and prevents glucose cytotoxicity. *Translational Research* 153, 118–123.
- Curran, R.C., Clark, A.E., Lovell, D., 1965. Acid mucopolysaccharides in electron microscopy. The Use of the Colloidal Iron Method *Journal of Anatomy* 99, 427–434.
- Dane, M.J., van den Berg, B.M., Avramut, M.C., Faas, F.G., van der Vlag, J., Rops, A.L., Ravelli, R.B., Koster, B.J., van Zonneveld, A.J., Vink, H., et al., 2013. Glomerular endothelial surface layer acts as a barrier against albumin filtration. *American Journal of Pathology* 182, 1532–1540.
- Dane, M.J., Khairoun, M., Lee, D.H., van den Berg, B.M., Eskens, B.J., Boels, M.G., van Teeffelen, J.W., Rops, A.L., van der Vlag, J., van Zonneveld, A.J., et al., 2014. Association of kidney function with changes in the endothelial surface layer. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* 9, 698–704.
- Dellinger, R.P., Levy, M.M., Carlet, J.M., Bion, J., Parker, M.M., Jaeschke, R., Reinhart, K., Angus, D.C., Brun-Buisson, C., Beale, R., et al., 2008. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. *Critical Care Medicine* 36, 296–327.
- Desideri, S., Onions, K.L., Qiu, Y., Ramnath, R.D., Butler, M.J., Neal, C.R., King, M.L.R., Salmon, A.E., Saleem, M.A., Welsh, G.I., et al., 2018. A novel assay provides sensitive measurement of physiologically relevant changes in albumin permeability in isolated human and rodent glomeruli. *Kidney International* 93, 1086–1097.
- Desjardins, C., Duling, B.R., 1990. Heparinase treatment suggests a role for the endothelial cell glycocalyx in regulation of capillary hematocrit. *American Journal of Physiology* 258, H647–H654.
- Devriendt, N., Serrano, G., Meyer, E., Demeyere, K., Paepe, D., Vandermeulen, E., Stock, E., de Rooster, H., 2021. Serum hyaluronic acid, a marker for improved liver perfusion after gradual surgical attenuation of extrahepatic portosystemic shunt closure in dogs. *The Veterinary Journal* 268, 105604.
- Dore, J.M., Morard, F., Vita, N., Wijdenes, J., 1998. Identification and location on syndecan-1 core protein of the epitopes of B-B2 and B-B4 monoclonal antibodies. *FEBS Letters* 426, 67–70.
- Ebong, E.E., Macaluso, F.P., Spray, D.C., Tarbell, J.M., 2011. Imaging the endothelial glycocalyx *in vitro* by rapid freezing/freezing substitution transmission electron microscopy. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 31, 1908–1915.
- Evans, L., Rhodes, A., Alhazzani, W., Antonelli, M., Coopersmith, C.M., French, C., Machado, F.R., McIntyre, L., Ostermann, M., Prescott, H.C., et al., 2021. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of sepsis and septic shock 2021. *Intensive Care Medicine* 47, 1181–1247.
- Florian, J.A., Kosky, J.R., Ainslie, K., Pang, Z., Dull, R.O., Tarbell, J.M., 2003. Heparan sulfate proteoglycan is a mechanosensor on endothelial cells. *Circulation Research* 93, e136–e142.
- Garantziotis, S., Savani, R.C., 2019. Hyaluronan biology: a complex balancing act of structure, function, location and context. *Matrix Biology* 78–79, 1–10.
- Gloe, T., Sohn, H.Y., Meininger, G.A., Pohl, U., 2002. Shear stress-induced release of basic fibroblast growth factor from endothelial cells is mediated by matrix interaction via integrin $\alpha(v)\beta3$. *Journal of Biological Chemistry* 277, 23453–23458.
- Goodall, K.J., Poon, I.K., Phipps, S., Hulett, M.D., 2014. Soluble heparan sulfate fragments generated by heparanase trigger the release of pro-inflammatory cytokines through TLR-4. *PLoS One* 9, e109596.
- Hegermann, J., Lunsdorf, H., Ochs, M., Haller, H., 2016. Visualization of the glomerular endothelial glycocalyx by electron microscopy using cationic colloidal thorium dioxide. *Histochemistry and Cell Biology* 145, 41–51.
- Henry, C.B., Duling, B.R., 2000. TNF- α increases entry of macromolecules into luminal endothelial cell glycocalyx. *American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology* 279, H2815–H2823.
- Heron, M., Anderson, R.N., 2016. Changes in the leading cause of death: Recent patterns in heart disease and cancer mortality. *NCHS Data Briefing* 1–8.
- Hoppensteadt, D., Tsuruta, K., Hirman, J., Kaul, I., Osawa, Y., Fareed, J., 2015. Dysregulation of inflammatory and hemostatic markers in sepsis and suspected disseminated intravascular coagulation. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis* 21, 120–127.
- Imanari, T., Toyoda, H., Yamanashi, S., Shinomiya, K., Koshiishi, I., Oguma, T., 1992. Study of the measurement of chondroitin sulphates in rabbit plasma and serum. *Journal of Chromatography* 574, 142–145.
- Jacob, M., Bruegger, D., Rehm, M., Stoeckelhuber, M., Welsch, U., Conzen, P., Becker, B.F., 2007. The endothelial glycocalyx affords compatibility of Starling's principle and high cardiac interstitial albumin levels. *Cardiovascular Research* 73, 575–586.
- Jacob, M., Saller, T., Chappell, D., Rehm, M., Welsch, U., Becker, B.F., 2013. Physiological levels of A-, B- and C-type natriuretic peptide shed the endothelial glycocalyx and enhance vascular permeability. *Basic Research in Cardiology* 108, 347.
- Johansson, P.L., Stensballe, J., Rasmussen, L.S., Ostrowski, S.R., 2011. A high admission syndecan-1 level, a marker of endothelial glycocalyx degradation, is associated with inflammation, protein C depletion, fibrinolysis, and increased mortality in trauma patients. *Annals of Surgery* 254, 194–200.
- Jung, U., Ley, K., 1997. Regulation of E-selectin, P-selectin, and intercellular adhesion molecule 1 expression in mouse cremaster muscle vasculature. *Microcirculation* 4, 311–319.
- Kamiya, S., Suzuki, Y., Yamano, S., Daigo, M., 1991. Lectin histochemistry of feline polyglucosans. *Journal of Comparative Pathology* 104, 141–145.
- Kelm, D.J., Perrin, J.T., Cartin-Ceba, R., Gajic, O., Schenck, L., Kennedy, C.C., 2015. Fluid overload in patients with severe sepsis and septic shock treated with early goal-directed therapy is associated with increased acute need for fluid-related medical interventions and hospital death. *Shock* 43, 68–73.
- Kenney, E.M., Rozanski, E.A., Rush, J.E., deLaforcade-Bures, A.M., Berg, J.R., Silverstein, D.C., Montealegre, C.D., Jutkowitz, L.A., Adamantos, S., Ovbey, D.H., et al., 2010. Association between outcome and organ system dysfunction in dogs with sepsis: 114 cases (2003–2007). *Journal of American Veterinary Medical Association* 236, 83–87.
- Kimura, T., Toda, N., Noda, Y., Okamura, T., 2001. Mechanisms of relaxation induced by angiotensin II in isolated canine and human uterine arteries. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 37, 585–595.
- Kobayashi, D.L., Peterson, M.E., Graves, T.K., Lesser, M., Nichols, C.E., 1990. Hypertension in cats with chronic renal failure or hyperthyroidism. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 4, 58–62.
- Kumar, A., Roberts, D., Wood, K.E., Light, B., Parrillo, J.E., Sharma, S., Suppes, R., Feinstein, D., Zanotti, S., Taiberg, L., et al., 2006. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Critical Care Medicine* 34, 1589–1596.
- Lawrence-Mills, S.J., Neal, C., Satchell, S., Welsh, G., Foster, R.R., Finch, N., 2022a. Visualising the endothelial glycocalyx in dogs. *The Veterinary Journal*, this issue. doi.org/10.1016/j.tvjl.2022.105844.
- Lawrence-Mills, S.J., Hezzell, M.J., Adamantos, S.E., Chan, I., Borgeat, K., Payne, J.R., Satchell, S., Welsh, G., Foster, R.R., Finch, N., 2022b. Circulating hyaluronan as a marker of endothelial glycocalyx damage in dogs with myxomatous mitral valve disease and dogs in a hypercoagulable state. *The Veterinary Journal*, this issue. doi.org/10.1016/j.tvjl.2022.105845.
- Lees, G.E., Cianciolo, R.E., Clubb Jr., F.J., 2011. Renal biopsy and pathologic evaluation of glomerular disease. *Topics in Companion Animal Medicine* 26, 143–153.
- Lewis, E.J., Lewis, J.B., Greene, T., Hunsicker, L.G., Berl, T., Pohl, M.A., de Zeeuw, D., Heerspink, H.L., Rohde, R.D., Atkins, R.C., et al., 2011. Sulodexide for kidney protection in type 2 diabetes patients with microalbuminuria: a randomized controlled trial. *American Journal of Kidney Diseases* 58, 729–736.
- Li, Q., Bolli, R., Qiu, Y., Tang, X.L., Murphree, S.S., French, B.A., 1998. Gene therapy with extracellular superoxide dismutase attenuates myocardial stunning in conscious rabbits. *Circulation* 98, 1438–1448.
- Londoño, L.B., Bowen, C.M., Buckley, G.J., 2018. Evaluation of the endothelial glycocalyx in healthy anesthetized dogs using rapid, patient-side glycocheck analysis software. In: *Proceedings of the International Veterinary Emergency and Critical Care Symposium, the European Veterinary Emergency and Critical Care Annual Congress, and the ACVECC VetCOT Veterinary Trauma and Critical Care Conference, New Orleans, LA, USA*, pp. 17.
- Lortat-Jacob, H., Baltzer, F., Grimaud, J.A., 1996. Heparin decreases the blood clearance of interferon-gamma and increases its activity by limiting the processing of its carboxyl-terminal sequence. *Journal of Biological Chemistry* 271, 16139–16143.
- Luft, J.H., 1966. Fine structures of capillary and endocapillary layer as revealed by ruthenium red. *Federation Proceedings* 25, 1773–1783.
- Mansour, C., Chaaya, R., Sredensek, J., Mocchi, R., Santangelo, B., Allaouchiche, B., Bonnet-Garin, J.M., Boselli, E., Junot, S.A., 2021. Evaluation of the sublingual microcirculation with sidestream dark field video microscopy in horses anesthetized for an elective procedure or intestinal surgery. *American Journal of Veterinary Research* 82, 574–581.
- Marino, C.L., Lascelles, B.D., Vaden, S.L., Gruen, M.E., Marks, S.L., 2014. Prevalence and classification of chronic kidney disease in cats randomly selected from four age groups and in cats recruited for degenerative joint disease studies. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 16, 465–472.
- Martens, R.J., Vink, H., van Oostenbrugge, R.J., Staals, J., 2013. Sublingual microvascular glycocalyx dimensions in lacunar stroke patients. *Cerebrovascular Disease* 35, 451–454.
- Martin, L., Koczera, P., Zechendorf, E., Schuerholz, T., 2016. The endothelial glycocalyx: New diagnostic and therapeutic approaches in sepsis. *Biomed Research International* 2016, 3758278.
- Marynissen, S.J., Smets, P.M., Ghys, L.F., Paepe, D., Delanghe, J., Galac, S., Meyer, E., Lefebvre, H.P., Daminet, S., 2016. Long-term follow-up of renal function assessing serum cystatin C in dogs with diabetes mellitus or hyperadrenocorticism. *Veterinary Clinical Pathology* 45, 320–329.
- Matsushita, K., van der Velde, M., Astor, B.C., Woodward, M., Levey, A.S., de Jong, P.E., Coresh, J., Gansevoort, R.T., 2010. Association of estimated glomerular filtration rate and albuminuria with all-cause and cardiovascular mortality in general population cohorts: a collaborative meta-analysis. *The Lancet* 375, 2073–2081.
- McCarron, R.M., Wang, L., Sirén, A.L., Spatz, M., Hallenbeck, J.M., 1994. Monocyte adhesion to cerebrovascular endothelial cells derived from hypertensive and normotensive rats. *American Journal of Physiology* 267, H2491–H2497.
- Meerschaert, J., Furie, M.B., 1995. The adhesion molecules used by monocytes for migration across endothelium include CD11a/CD18, CD11b/CD18, and VLA-4 on

- monocytes and ICAM-1, VCAM-1, and other ligands on endothelium. *Journal of Immunology* 154, 4099–4112.
- Mennander, A.A., Shalaby, A., Oksala, N., Leppänen, T., Hämäläinen, M., Huovinen, S., Zhao, F., Moilanen, E., Tarkka, M., 2012. Diazoxide may protect endothelial glycocalyx integrity during coronary artery bypass grafting. *Scandinavian Cardiovascular Journal* 46, 339–344.
- Meyer, W., Godynicki, S., Tsukise, A., 2008. Lectin histochemistry of the endothelium of blood vessels in the mammalian integument, with remarks on the endothelial glycocalyx and blood vessel system nomenclature. *Annals of Anatomy* 190, 264–276.
- Mochizuki, S., Vink, H., Hiramatsu, O., Kajita, T., Shigeto, F., Spaan, J.A., Kajiya, F., 2003. Role of hyaluronic acid glycosaminoglycans in shear-induced endothelium-derived nitric oxide release. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory* 285, H722–H726.
- Montealegre, F., Lyons, B.M., 2021. Fluid therapy in dogs and cats with sepsis. *Frontiers in Veterinary Science* 8, 622127.
- Mouncey, P.R., Osborn, T.M., Power, G.S., Harrison, D.A., Sadique, M.Z., Grieve, R.D., Jahan, R., Tan, J.C., Harvey, S.E., Bell, D., et al., 2015. Protocolised Management In Sepsis (ProMISe): a multicentre randomised controlled trial of the clinical effectiveness and cost-effectiveness of early, goal-directed, protocolised resuscitation for emerging septic shock. *Health Technology Assessment* 19 i-xxv, 1–150.
- Mulivor, A.W., Lipowsky, H.H., 2004. Inflammation- and ischemia-induced shedding of venular glycocalyx. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory* 286, H1672–H1680.
- Mulivor, A.W., Lipowsky, H.H., 2009. Inhibition of glycan shedding and leukocyte-endothelial adhesion in postcapillary venules by suppression of matrixmetalloproteinase activity with doxycycline. *Microcirculation* 16, 657–666.
- Mullen, K.M., Regier, P.J., Londoño, L.A., Millar, K., Groover, J., 2020. Evaluation of jejunal microvasculature of healthy anesthetized dogs with sidestream dark field video microscopy. *American Journal of Veterinary Research* 81, 888–893.
- Naseri, A., Gulersoy, E., Ider, M., Durgut, M.K., Erturk, A., Avci, C., Koral, E., Sevinc, M., Ok, M., 2020. Serum biomarkers of endothelial glycocalyx injury in canine parvoviral infection. *Austral Journal of Veterinary Sciences* 52.
- Nelson, A., Berkestedt, I., Schmidtchen, A., Ljunggren, L., Bodelsson, M., 2008. Increased levels of glycosaminoglycans during septic shock: relation to mortality and the antibacterial actions of plasma. *Shock* 30, 623–627.
- Nieuworp, M., Meuwese, M.C., Mooij, H.L., van Lieshout, M.H., Hayden, A., Levi, M., Meijers, J.C., Ince, C., Kastelein, J.J., Vink, H., et al., 2009. Tumor necrosis factor- α inhibition protects against endotoxin-induced endothelial glycocalyx perturbation. *Atherosclerosis* 202, 296–303.
- Oliveira, M.A., Ferreira, L.C., Zuccari, D.A., Brandi, A.C., Santos, C.A., Botelho, P.H., Petrucci, O., Braile, D.M., 2014. Comparison of the solution of histidine-tryptophan- α -fetoprotein with histidine-tryptophan-glutamate as cardioplegic agents in isolated rat hearts: An immunohistochemical study. *Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery* 29, 83–88.
- Oltean, S., Qiu, Y., Ferguson, J.K., Stevens, M., Neal, C., Russell, A., Kaura, A., Arkill, K.P., Harris, K., Symonds, C., et al., 2015. Vascular endothelial growth factor- α 165b is protective and restores endothelial glycocalyx in diabetic nephropathy. *American Society of Nephrology* 26, 1889–1904.
- O'Neill, D.G., Elliott, J., Church, D.B., McGreevy, P.D., Thomson, P.C., Brodbelt, D.C., 2013. Chronic kidney disease in dogs in UK veterinary practices: Prevalence, risk factors, and survival. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 27, 814–821.
- Onions, K.L., Gamez, M., Buckner, N.R., Baker, S.L., Betteridge, K.B., Desideri, S., Dallyn, B.P., Ramnath, R.D., Neal, C.R., Farmer, L.K., et al., 2019. VEGFC reduces glomerular albumin permeability and protects against alterations in VEGF receptor expression in diabetic nephropathy. *Diabetes* 68, 172–187.
- Ortega, T.M., Feldman, E.C., Nelson, R.W., Willits, N., Cowgill, L.D., 1996. Systemic arterial blood pressure and urine protein/creatinine ratio in dogs with hyperadrenocorticism. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 209, 1724–1729.
- Packham, D.K., Wolfe, R., Reutens, A.T., Berl, T., Heerspink, H.L., Rohde, R., Ivory, S., Lewis, J., Raz, I., Wiegmann, T.B., et al., 2012. Sulodexide fails to demonstrate renoprotection in overt type 2 diabetic nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology* 23, 123–130.
- Padberg, J.S., Wiesinger, A., di Marco, G.S., Reuter, S., Grabner, A., Kentrup, D., Lukas, A., Oberleithner, H., Pavenstadt, H., Brand, M., et al., 2014. Damage of the endothelial glycocalyx in chronic kidney disease. *Atherosclerosis* 234, 335–343.
- Pelander, L., Ljungvall, I., Egenvall, A., Syme, H., Elliott, J., Häggström, J., 2015. Incidence of and mortality from kidney disease in over 600,000 insured Swedish dogs. *Veterinary Record* 176, 656.
- Pouska, J., Tegl, V., Astapenko, D., Cerny, V., Lehmann, C., Benes, J., 2018. Impact of intravenous fluid challenge infusion time on macrocirculation and endothelial glycocalyx in surgical and critically ill patients. *BioMed Research International* 2018, 8925345.
- Pries, A.R., Secomb, T.W., Sperandio, M., Gaehtgens, P., 1998. Blood flow resistance during hemodilution: effect of plasma composition. *Cardiovascular Research* 37, 225–235.
- Pries, A.R., Secomb, T.W., Gaehtgens, P., 2000. The endothelial surface layer. *European Journal of Physiology* 440, 653–666.
- Purushothaman, A., Uyama, T., Kobayashi, F., Yamada, S., Sugahara, K., Rapraeger, A.C., Sanderson, R.D., 2010. Heparanase-enhanced shedding of syndecan-1 by myeloma cells promotes endothelial invasion and angiogenesis. *Blood* 115, 2449–2457.
- Ramnath, R.D., Butler, M.J., Newman, G., Desideri, S., Russell, A., Lay, A.C., Neal, C.R., Qiu, Y., Fawaz, S., Onions, K.L., et al., 2020. Blocking matrix metalloproteinase-mediated syndecan-4 shedding restores the endothelial glycocalyx and glomerular filtration barrier function in early diabetic kidney disease. *Kidney International* 97, 951–965.
- Rehm, M., Haller, M., Orth, V., Kreimeier, U., Jacob, M., Dressel, H., Mayer, S., Brechtelsbauer, H., Finsterer, U., 2001. Changes in blood volume and hematocrit during acute preoperative volume loading with 5% albumin or 6% hetastarch solutions in patients before radical hysterectomy. *Anesthesiology* 95, 849–856.
- Rehm, M., Bruegger, D., Christ, F., Conzen, P., Thiel, M., Jacob, M., Chappell, D., Stoeckelhuber, M., Welsch, U., Reichart, B., 2007. Shedding of the endothelial glycocalyx in patients undergoing major vascular surgery with global and regional ischemia. *Circulation* 116, 1896–1906.
- Rhodes, A., Evans, L.E., Alhazzani, W., Levy, M.M., Antonelli, M., Ferrer, R., Kumar, A., Sevransky, J.E., Sprung, C.L., Nunnally, M.E., et al., 2017. Surviving Sepsis Campaign: International guidelines for management of sepsis and septic shock: 2016. *Intensive Care Medicine* 43, 304–377.
- Roussel, F., Dalion, J., 1988. Lectins as markers of endothelial cells: Comparative study between human and animal cells. *Lab Animal* 22, 135–140.
- Salmon, A.H., Neal, C.R., Sage, L.M., Glass, C.A., Harper, S.J., Bates, D.O., 2009. Angiopoietin-1 alters microvascular permeability coefficients in vivo via modification of endothelial glycocalyx. *Cardiovascular Research* 83, 24–33.
- Santos-Parker, J.R., Strahler, T.R., Bassett, C.J., Bispham, N.Z., Chonchol, M.B., Seals, D.R., 2017. Curcumin supplementation improves vascular endothelial function in healthy middle-aged and older adults by increasing nitric oxide bioavailability and reducing oxidative stress. *Aging (Albany NYomda)* 9, 187–208.
- Schillaci, G., Pirro, M., Gemelli, F., Pasqualini, L., Vaudou, G., Marchesi, S., Siepi, D., Bagaglia, F., Mannarino, E., 2003. Increased C-reactive protein concentrations in never-treated hypertension: The role of systolic and pulse pressures. *Journal of Hypertension* 21, 1841–1846.
- Schmid-Schönbein, G.W., Seiffge, D., DeLano, F.A., Shen, K., Zweifach, B.W., 1991. Leukocyte counts and activation in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Hypertension* 17, 323–330.
- Schmidt, E.P., Yang, Y., Janssen, W.J., Gandjeva, A., Perez, M.J., Barthel, L., Zemans, R.L., Bowman, J.C., Koyanagi, D.E., Yunt, Z.X., 2012. The pulmonary endothelial glycocalyx regulates neutrophil adhesion and lung injury during experimental sepsis. *Nature Medicine* 18, 1217–1223.
- Schmidt, E.P., Overdier, K.H., Sun, X., Lin, L., Liu, X., Yang, Y., Ammons, L.A., Hiller, T.D., Sufliita, M.A., Yu, Y., et al., 2016. Urinary glycosaminoglycans predict outcomes in septic shock and acute respiratory distress syndrome. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 194, 439–449.
- Schulte, B.A., Spicer, S.S., 1983. Histochemical evaluation of mouse and rat kidneys with lectin-horseradish peroxidase conjugates. *American Journal of Anatomy* 168, 345–362.
- Segura, J., Ruilope, L.M., Rodicio, J.L., 2004. Microalbuminuria. *Clinical and Experimental Hypertension* 26, 701–707.
- Seidlmann, S.B., Claggett, B., Cheng, S., Henglin, M., Shah, A., Steffen, L.M., Folsom, A.R., Rimm, E.B., Willett, W.C., Solomon, S.D., 2018. Dietary carbohydrate intake and mortality: a prospective cohort study and meta-analysis. *The Lancet Public Health* 3, e419–e428.
- Seki, M., Asano, K., Sakai, M., Kanno, N., Teshima, K., Edamura, K., Tanaka, S., 2010. Serum hyaluronic acid in dogs with congenital portosystemic shunts. *Journal of Small Animal Practice* 51, 260–263.
- Sharon, N., Lis, H., 2004. History of lectins: From hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology* 14, 53r–62r.
- Shaw, K.E., Berensen, A.M., Bateman, S.W., Blois, S.L., Guieu, L.S., Wood, R.D., 2021. Use of serum hyaluronic acid as a biomarker of endothelial glycocalyx degradation in dogs with septic peritonitis. *American Journal of Research* 82, 566–573.
- Singer, M., Deutschman, C.S., Seymour, C.W., Shankar-Hari, M., Annane, D., Bauer, M., Bellomo, R., Bernard, G.R., Chiche, J.D., Coopersmith, C.M., et al., 2016. The Third International Consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3). *Journal of American Medical Association* 315, 801–810.
- Singh, A., Satchell, S.C., 2011. Microalbuminuria: causes and implications. *Pediatric Nephrology* 26, 1957–1965.
- Singh, A., Satchell, S.C., Neal, C.R., McKenzie, E.A., Tooke, J.E., Mathieson, P.W., 2007. Glomerular endothelial glycocalyx constitutes a barrier to protein permeability. *Journal of the American Society of Nephrology* 18, 2885–2893.
- Smart, L., 2016. Glycocalyx damage in sepsis In: 22nd International Veterinary Emergency and Critical Care Symposium, Grapevine, TX, USA.
- Smart, L., Boyd, C.J., Claus, M.A., Bosio, E., Hosgood, G., Raisal, A., 2018. Large-volume crystalloid fluid is associated with increased hyaluronan shedding and inflammation in a canine hemorrhagic shock model. *Inflammation* 41, 1515–1523.
- Steppan, J., Hofer, S., Funke, B., Brenner, T., Henrich, M., Martin, E., Weitz, J., Hofmann, U., Weigand, M.A., 2011. Sepsis and major abdominal surgery lead to flaking of the endothelial glycocalyx. *Journal of Surgical Research* 165, 136–141.
- Stult, T., Vrablík, M., Kasalová, Z., Marinov, I., Svobodová, H., Ceska, R., 2008. Leukocyte and endothelial adhesion molecules in patients with hypercholesterolemia: The effect of atorvastatin treatment. *Physiological Research* 57, 185–194.
- Torres, L.N., Sondeen, J.L., Ji, L., Dubick, M.A., Torres Filho, I., 2013. Evaluation of resuscitation fluids on endothelial glycocalyx, venular blood flow, and coagulation function after hemorrhagic shock in rats. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery* 75, 759–766.
- Uchino, S., Bellomo, R., Morimatsu, H., Sugihara, M., French, C., Stephens, D., Wendon, J., Honore, P., Mulder, J., Turner, A., 2006. Pulmonary artery catheter versus pulse contour analysis: A prospective epidemiological study. *Journal of Critical Care* 10, R174.
- Ueda, A., Shimomura, M., Ikeda, M., Yamaguchi, R., Tanishita, K., 2004. Effect of glycocalyx on shear-dependent albumin uptake in endothelial cells. *American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology* 287, H2287–H2294.

- Ueno, M., Sakamoto, H., Tomimoto, H., Akiguchi, I., Onodera, M., Huang, C.L., Kanenishi, K., 2004. Blood-brain barrier is impaired in the hippocampus of young adult spontaneously hypertensive rats. *Acta Neuropathologica* 107, 532–538.
- Veraldi, N., Guerrini, M., Urso, E., Risi, G., Bertini, S., Bensi, D., Bisio, A., 2018. Fine structural characterization of sulodexide. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 156, 67–79.
- Vink, H., Duling, B.R., 1996. Identification of distinct luminal domains for macromolecules, erythrocytes, and leukocytes within mammalian capillaries. *Circulation Research* 79, 581–589.
- Vlahu, C.A., Lemkes, B.A., Struijk, D.G., Koopman, M.G., Krediet, R.T., Vink, H., 2012b. Damage of the endothelial glycocalyx in dialysis patients. *Journal of the American Society of Nephrology* 23, 1900–1908.
- Xia, F., Liu, G., Shi, Y., Zhang, Y., 2015. Impact of microalbuminuria on incident coronary heart disease, cardiovascular and all-cause mortality: A meta-analysis of prospective studies. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine* 8, 1–9.
- Yabuki, A., Mitani, S., Mizukami, K., Yamato, O., 2012. Nephron segment identification in the normal canine kidney by using lectin histochemistry. *Research in Veterinary Science* 93, 560–564.
- Yang, C.Y., Huynh, T., Johnson, M., Gong, H., 2014. Endothelial glycocalyx layer in the aqueous outflow pathway of bovine and human eyes. *Experimental Eye Research* 128, 27–33.
- Yini, S., Heng, Z., Xin, A., Xiaochun, M., 2015. Effect of unfractionated heparin on endothelial glycocalyx in a septic shock model. *Journal of the Scandinavian Society of Anaesthesiology and Intensive Care Medicine* 59, 160–169.
- Yozova, I.D., Londoño, L.A., Millar, K.K., Sano, H., Weidgraaf, K., Thomson, N.A., Munday, J.S., 2021. Rapid patient-side evaluation of endothelial glycocalyx thickness in healthy sedated cats using Glycocheck software. *Frontiers in Veterinary Science* 8, 727063.
- Zdolsek, M., Hahn, R.G., Sjöberg, F., Zdolsek, J.H., 2020. Plasma volume expansion and capillary leakage of 20% albumin in burned patients and volunteers. *Critical Care* 24, 191.

Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

The Veterinary Journal

journal homepage: www.elsevier.com/locate/tvjDynamics of *Mycoplasma bovis* in Dutch dairy herds during acute clinical outbreaksP.M. Penterman^{a,*}, M. Holzhauser^a, E. van Engelen^b, D. Smits^a, A.G.J. Velthuis^{c,d}^a Department of Ruminant Health, GD Animal Health, PO Box 9, 7400 AA Deventer, The Netherlands^b Department of Research and Development, GD Animal Health, PO Box 9, 7400 AA Deventer, The Netherlands^c Department Bacteriology, Host-Pathogen Interaction & Diagnostic Development, Wageningen BioVeterinary Research, PO Box 65, 8200 AB Lelystad, The Netherlands^d Bovine Health Management, Aeres University of Applied Sciences, PO box 374, 8250 AJ, Dronten, The Netherlands

ARTICLE INFO

Keywords:

Cattle
M. bovis
Mycoplasma bovis
On-farm dynamics
Transmission

ABSTRACT

Mycoplasma bovis (*M. bovis*) can cause serious illness in cattle, presenting as arthritis and mastitis in dairy cows and pneumonia, arthritis and otitis media in calves. This study aimed to provide insight into the dynamics of *M. bovis* within dairy herds, experiencing an acute outbreak in dairy cows. Twenty farms were followed with laboratory testing of suspected dairy cows. Each outbreak farm was sampled five times, at 2–3 week intervals, sampling blood and milk and conjunctival fluid from clinically suspected dairy cows and healthy animals from three different age groups: dairy cows, young stock (7–24 months) and calves (1–6 months). Additionally, bulk tank milk was sampled every visit and environmental samples were taken on the first and last visits. The presence of *M. bovis* was tested by evaluating antibody titres in blood, bacterial DNA in conjunctival fluid and environmental samples and viable bacteria in milk samples. All data were analysed using logistic regression models, corrected for repeated sampling and within-herd correlation.

Sixty percent (12/20) of the herds showed a combination of arthritis and mastitis, while other herds experienced only clinically mastitis (3/20) or arthritis (5/20). From the time an outbreak was confirmed, *M. bovis* infection was not only present in dairy cows, but also in young stock and calves (80% of the farms). Laboratory tests also confirmed the presence of *M. bovis* in healthy animals. The *M. bovis* PCR levels of calves and young stock were highly correlated at all visits ($r_{total} = 0.81$, $P < 0.01$). Furthermore, *M. bovis* was present in the environment of the animals. At the end of the 3-month study period, none of the 20 clinical outbreak farms were *M. bovis*-‘negative’, based on laboratory testing, although hardly any clinical cases were observed at that time.

1. Introduction

Mycoplasma bovis (*M. bovis*) can cause serious illness in cattle, including arthritis, mastitis, pneumonia and reproductive disorders in dairy cows (Maunsell et al., 2011; Haapala et al., 2018; Hazelton et al., 2018) and pneumonia, arthritis and otitis in calves (Maunsell and Donovan, 2009). *Mycoplasma* spp. can be present in the microbiome of the upper respiratory tract (Lima et al., 2016) and may be present in semen of bulls and in vaginas of dairy cows (Haapala et al., 2018; Hazelton et al., 2020). Not all infected animals show clinical signs; asymptomatic carriers may shed the pathogen for long time (Nicholas et al., 2016; Punyapornwithaya et al., 2010; Wilson et al., 2007). *M. bovis* bacteria can be detected with microbiological culture (e.g., milk) and polymerase chain reaction (PCR) methods (e.g. conjunctival

swabs). Indirect enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) demonstrate the presence of antibodies directed against *M. bovis* in, for example, serum and milk samples. These three diagnostic methods are recommended for complementary use because all exhibit limitations (Parker et al., 2018). Factors such as the presence of sub-clinical infections and intermittent shedding also complicate the diagnosis. Therefore repeated sampling of individuals is recommended to increase the likelihood of *M. bovis* detection in both clinically and sub-clinically infected animals (Hazelton et al., 2018; Parker et al., 2018; Petersen et al., 2018).

The objective of this study was to provide new insights into the dynamics of *M. bovis* transmission between and within age groups in dairy herds experiencing an acute clinical outbreak in dairy cows.

* Corresponding author.

E-mail address: p.penterman@gdanimalhealth.com (P.M. Penterman).<https://doi.org/10.1016/j.tvj.2022.105841>

Received 23 April 2021; Received in revised form 30 April 2022; Accepted 30 April 2022

Available online 11 May 2022

1090-0233/© 2022 The Authors. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

2. Materials and methods

Between February 2016 and April 2017, GD Animal Health (GD) performed a longitudinal study in which a cohort of 20 Dutch dairy herds was closely followed, that experienced an acute clinical *M. bovis* outbreak in dairy cows. The study was performed according to the Directive 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes, and approval was granted by the Dutch Central Authority for Scientific Procedures on Animals (license number 2015300) and the Animal Welfare Body of GD.

2.1. Selection of farms

Practitioners were asked to report dairy herds with several dairy cows with *M. bovis*-associated clinical signs of mastitis or arthritis within a 2-week period, confirmed by a confirmative laboratory test result for *M. bovis* (ELISA, PCR or culture from at least two cows). Only farms larger than 50 dairy cows were included which had no *M. bovis* clinically suspected animals in the preceding 12 months.

2.2. Study design

The outbreak farms were visited five times; within a week after confirmation of the outbreak (v0) and after 2 (v2), 5 (v5), 8 (v8) and 11 (v11) weeks. Dairy cows with clinical signs of mastitis or arthritis ('clinically suspected') were enrolled in the study, with a maximum of five cows per visit. Clinically healthy animals from three age groups (hereafter: 'healthy animals') were randomly selected prior to the first visit, using a selection list with a random number generated for each animal in the farm ('runiform' in Stata14/SE; StataCorp, Stata Statistical Software, 2015, Release 14). Cattle with the lowest selection number were selected for inclusion in the study. Groups included a cohort of a maximum of 13 dairy cows older than 24 months of age, 13 young stock between 7 and 24 months and 10 calves between 1 and 6 months and were sampled during each visit. When an animal was lost to follow-up due to culling, drying off or calving, a healthy animal that was next on the selection list or a new clinically suspected animal, was included during the following visit.

Samples were collected by trained veterinarians according to standard operating procedures. Serum blood samples were collected from the coccygeal vein. Conjunctival fluid samples from the medial eye corners of both eyes were collected with a dry sterile flocculated swab (Eswab, Copan, Italy) and directly stored in the standard transportation medium. Environmental samples were collected and stored only during v0 and v11, with the same Eswab system. Composite milk samples from four quarters and BTM were collected in sterile 10-mL and 50-mL tubes, respectively. All samples were cold stored and immediately sent to the laboratory for diagnostic analyses.

2.3. Laboratory processing of samples

Serum samples were analysed with the commercially available indirect ELISA kit for *M. bovis* antibody detection (BioX K260 Diagnostics, Rochefort, Belgium) conform the manufacturer's instructions. Based on these instructions, results were reported in six categories: - (no antibodies detected) and 1 + to 5 + (increasing amounts of antibodies detected), whereby 1 + and 2 + were considered a low positive response and 3 + or higher as a high positive response.

M. bovis DNA was detected by PCR in conjunctival fluid using an in-house competitive allele-specific, real time PCR. Briefly, DNA was isolated using an ABI MagMAX™ Total Nucleic Acid Isolation kit on a MagMax Express machine. The *M. bovis* specific primers were Fw primer 5'-GAA GGT GAC CAA GTT CAT GCT GGC AAA CTT ACC TAT CGG TGA C-3' and Rev primer 5'-AGG CAA AGT CAT TTC TAG GTG CAA-3'. *M. bovis* DNA was visualised after a series of reactions in which a quencher was separated from a fluorophore after which a fluorescent

signal was measured with the ABI-7500 machine. *M. bovis* DNA was considered to be present at a cycle threshold (Ct) value of ≤ 42 . The lower the Ct-value, the higher the concentration of *M. bovis* DNA in the sample, categorised as - (Ct >42), and 1 + to 5 + (increasing amounts of *M. bovis* present. Ct < 42: 1, Ct < 40: 2, Ct < 38: 3, Ct < 35: 4 and Ct < 32: 5). Samples with Ct-value > 40 (category 1 +) were considered outside the linearity range and below the lower limit of PCR quantification; therefore, these results had a higher measurement uncertainty and were interpreted with caution.

For *Mycoplasma* culture, individual milk (10 μ L) or BTM (100 μ L) were dispensed onto pleuropneumonia-like organism (PPLo) agar, which is a standard *Mycoplasma* medium used in many laboratories.¹ Inoculated PPLo-agar plates were incubated under normal atmospheric conditions but higher humidity (100%) for a maximum of 10 days at 37 °C. The growth of typical micro-colonies was assessed on days 3, 6 and 10 with use of a dissecting microscope.

2.4. Sample size

Sample size for detection of disease in the affected farms was calculated using the following assumptions: average Dutch farm (100 dairy cattle, 25 young stock and 15 calves); an outbreak in which 20% of animals showed seroconversion (assumption based on previous experience with outbreaks in the Netherlands), the calculated aimed sample sizes were 13 dairy cows, 13 young stock and 10 calves. This design ensured the ability to demonstrate the transmission of *M. bovis* with 95% confidence (WinEpi).²

2.5. Statistical analysis

The differences in prevalence in the age groups were examined across time using logistic regression models. Data were corrected for the fact that animals within the same farm are more similar than animals at different farms. Descriptions of the outbreak situation per farm at the first visit (v0; Table 1) were provided. It was recorded where the animals were housed at the start of infection (as far as possible), the extent to which healthy animals in all age groups became infected, based on ELISA, PCR and, if applicable, culturing results, the extent in which test results from clinically suspected animals contained *M. bovis* antibodies during the course of the study and the pathways and risk factors that may have played a role. All analyses were performed using STATA/SE version 14 software. The error of the presence of *M. bovis* found in the previous period was modelled using a general estimation equation (repeated option in PROC GENMOD, SAS, version 9.4).

3. Results

3.1. Descriptive statistics

Descriptive statistics of the 20 farms are listed in Table 1. Twelve of these herds (60%) experienced both mastitis and arthritis in dairy cattle. Five herds experienced clinical arthritis and mastitis, while *M. bovis* was only found in bulk milk. One herd experienced no mastitis during the outbreak and three herds had only *M. bovis* associated mastitis without arthritis. Two herds experienced respiratory signs in dairy cows and four herds respiratory signs in calves.

The number of clinically suspected dairy cows per farm varied from 1% to more than 10%. The farms were spread over the Netherlands. The average farm size (*n* minimum, maximum) was 30 calves (10, 129), 67

¹ See: Laboratory Handbook on Bovine Mastitis, NMC, 2017 page 119. http://www.academia.edu/50651208/Laboratory_Handbook_on_Bovine_Mastitis (Accessed 30 April 2022)

² See: WinEpi: Working IN EPIdemiology. <http://www.winepi.net/uk/sample/indice.htm>. (Accessed 30 April 2022).

Table 1
Descriptive statistics of the 20 farms with an acute clinical M. bovis outbreak.

Farm ID	M. bovis-associated clinical signs in dairy cows	No. of animals per age group (V ₀)			Purchase of cattle over the preceding 5 years	Mean milk production characteristics		
		1-6 months	7-24 months	> 24 months		kg milk/day	Fat %	Protein %
A	A, M	20	58	117	Yes	29.9	4.29	3.51
B	A, M	61	97	231	Yes	23.5	4.44	3.74
C	A, M	13	46	96	No	26.6	4.33	3.49
D	A, M	12	12	60	No	22.2	4.60	3.62
E	A, M	20	69	140	Yes	27.2	4.76	3.56
G	A, M	14	80	123	No	30.2	4.67	3.54
I	A, M	129	253	572	Yes	29.3	4.37	3.53
L	A, M	17	32	51	No	30.7	4.48	3.48
N	A, M	22	58	102	Yes	26.0	4.55	3.60
R	A, M	40	78	254	Yes	29.6	4.32	3.47
S	A, M	12	32	92	No	28.9	4.19	3.60
T	A, M	18	48	129	Yes	27.9	4.43	3.57
J	A, (M)	43	85	251	Yes	27.5	4.54	3.46
O	A, (M) ^{a, b and c}	26	74	166	Yes	28.9	4.28	3.45
M	A, (M)	22	46	165	Yes	30.0	4.20	3.53
P	A, (M)	63	118	325	Yes	28.6	4.52	3.72
H	M	28	66	147	No	25.6	4.01	3.46
F	M	18	46	143	Yes	25.9	4.49	3.48
K	M	10	17	50	No	30.1	3.87	3.42
Q	A	10	29	92	No	23.2	4.49	3.65

ID, Identification; V₀, first visit; A, arthritis; M, mastitis.

^a Milk samples of individual cows and bulk milk were all culture-negative (i.e. M. bovis associated mastitis was not demonstrated).

^b Individual milk samples of all M. bovis suspected cows were all culture-negative, but individual milk samples from different randomly selected cows and BTM samples were culture-positive.

^c Individual milk samples were all culture-negative, but BTM samples were culture-positive.

young stock (12, 253) and 165 dairy cows (50, 572) per farm. Over the last 5 years, 12 farms introduced animals into the herds. The average milk production was 27.6 kg milk/day with 4.39% fat and 3.54% protein

content.

In total, 116 clinically suspected and 808 healthy animals were sampled at v₀. These numbers decreased to 89 clinically suspected

Table 2
ELISA results (serum) and PCR results (conjunctival fluid) from clinically suspected animals^a and healthy cattle by age group per round (grouped into 0 = 'negative', 1/2 + = low 'positive' and 3/4/5 + = high 'positive'), including total number of samples.

Age group	Sampling time	ELISA results			PCR results			Number of samples
		0	1/2 +	3/4/5 +	0	1/2 +	3/4/5 +	
Clinically suspected cattle ¹	V ₀	41.9%	22.6%	35.5%	34.8%	35.9%	29.3%	93
	V ₂	45.8%	27.7%	26.5%	38.1%	36.9%	25.0%	83
	V ₅	54.0%	28.7%	17.2%	71.3%	23.0%	5.7%	87
	V ₈	67.8%	24.1%	8.0%	71.3%	21.8%	6.9%	87
	V ₁₁	72.3%	22.9%	4.8%	81.9%	14.5%	3.6%	83
	Average	56.1%	25.2%	18.7%	59.1%	26.6%	14.3%	433
Healthy dairy cows	V ₀	52.3%	31.6%	16.2%	34.1%	41.3%	24.6%	266
	V ₂	57.1%	32.3%	10.5%	38.2%	43.4%	18.4%	266
	V ₅	65.8%	27.4%	6.8%	70.3%	24.0%	5.7%	263
	V ₈	74.7%	21.5%	3.8%	69.8%	20.4%	9.8%	265
	V ₁₁	80.1%	18.8%	1.1%	77.8%	18.4%	3.8%	261
	Average	65.9%	26.3%	7.7%	58.0%	29.5%	12.5%	1321
Healthy young stock	V ₀	73.8%	20.7%	5.5%	66.0%	23.8%	10.2%	256
	V ₂	67.8%	27.1%	5.1%	71.4%	21.2%	7.5%	255
	V ₅	76.5%	16.9%	6.7%	81.6%	11.8%	6.7%	255
	V ₈	80.0%	17.3%	2.7%	76.5%	17.6%	5.9%	255
	V ₁₁	81.3%	16.8%	2.0%	80.1%	14.1%	5.9%	256
	Average	75.9%	19.7%	4.4%	75.1%	17.7%	7.2%	1277
Healthy calves	V ₀	76.5%	18.7%	4.8%	43.3%	33.2%	23.5%	187
	V ₂	70.7%	23.9%	5.4%	55.4%	29.9%	14.7%	184
	V ₅	70.7%	25.5%	3.7%	73.4%	19.1%	7.4%	188
	V ₈	60.8%	34.4%	4.8%	71.4%	22.2%	6.3%	189
	V ₁₁	58.0%	36.7%	5.3%	75.0%	18.6%	6.4%	188
	Average	67.3%	27.9%	4.8%	63.8%	24.6%	11.6%	936
Healthy cattle (total)	V ₀	66.4%	24.3%	9.3%	48.1%	32.8%	19.1%	709
	V ₂	64.5%	28.2%	7.2%	54.7%	31.9%	13.5%	705
	V ₅	71.0%	23.1%	5.9%	75.2%	18.3%	6.5%	706
	V ₈	72.9%	23.4%	3.7%	72.6%	19.9%	7.5%	709
	V ₁₁	74.6%	22.8%	2.6%	77.9%	16.9%	5.2%	705
	Average	69.9%	24.4%	5.7%	65.7%	23.9%	10.4%	3534

V, visit number, e.g., V₀, first visit etc.

^a90% of clinically suspected animals were dairy cows (388/433 samples).

animals and 784 healthy at v11, mainly due to removal of cows. In total 9625 samples were collected and animals were sampled on average 4.3 times for blood and conjunctival fluid and 3.7 times for milk.

3.1.1. *Mycoplasma bovis* transmission within age groups over time

From the time an outbreak was confirmed, *M. bovis* infection was not only present in dairy cows, but also in young stock and calves (80% of the farms).

3.1.2. Dairy cows

At v0, 58.1% of clinically suspected and 47.8% of healthy dairy cows were ELISA-positive (1 +–5 +; Table 2). The serological response decreased over time in both clinically suspected and healthy cows (see Fig. 1A), but did not reach zero. Seroprevalence dropped over time (v5 to v11) from 45.9% to 27.7% for clinically suspected and from 34.2% to 19.9% for healthy dairy cows (Table 2). This decrease was highest in the groups with the strongest reaction (> 2 +). Within dairy cows ELISA-levels were correlated in three consecutive visits while in the remaining age groups ELISA-levels were highly correlated in two consecutive visits.

Overall herds a slight decrease in PCR ‘positive’ tests was seen in the first three visits, followed by a slight increase between v5 and v8 (Fig. 1A). At v0, 65.2% and 65.9% of clinically suspected and healthy dairy cows, respectively tested ‘positive’ for the presence of *M. bovis* DNA in the conjunctival fluid (Table 2). Among healthy cows these figures decreased to 29.7% at v5 and 22.2% at v11 (Table 2). The percentage of ‘positive’ results at v0 was higher in cows than in youngstock and calves, but the prevalence was comparable for all age groups at v11. A large proportion of samples at v11 contained low levels (1 +, 2 +) of

M. bovis DNA most probably a reflection of low levels of *M. bovis* DNA in the farm environment. Equal amounts of low positivity were observed when comparing clinically suspected and healthy cows ($P = 0.40$). Stronger PCR ‘positivity’ (3 +, 4 + or 5 +) was more often demonstrated in clinically suspected animals (14.3%) compared to healthy animals (10.4%; $P = 0.03$). As with serology, the percentages of strong responders (> 2 +) showed the steepest decline over time, a finding also observed in the other groups. The correlation between the PCR-levels at consecutive sampling periods within age groups was minimal.

3.1.3. Young stock

Young stock showed at v0 a seroprevalence of 26.2%, which increased to 32.2% at v2 and decreased to 18.7% at v11. The prevalence of positive conjunctival fluid PCR in young stock was 34.0% at v0 and decreased to 20.0% at v11 (Table 2 and Fig. 1B).

3.1.4. Calves

On average, 32.7% of the calves showed a serological response which increased from 23.5% (v0) to 42.0% (v11). An noticeable increase to 39.2% occurred at v8 mainly due to the increasing number of low positive (< 2 +) samples (Table 2). The percentage of PCR positive conjunctival fluid samples showed a different pattern over time. At v0, 56.7% of the healthy calves were PCR positive which decreased to 25.0% at v11 (Fig. 1C).

3.2. *Mycoplasma bovis* transmission between age groups over time

The serological responses of dairy cows, young stock and calves were not correlated within farms at the various sample times, but the

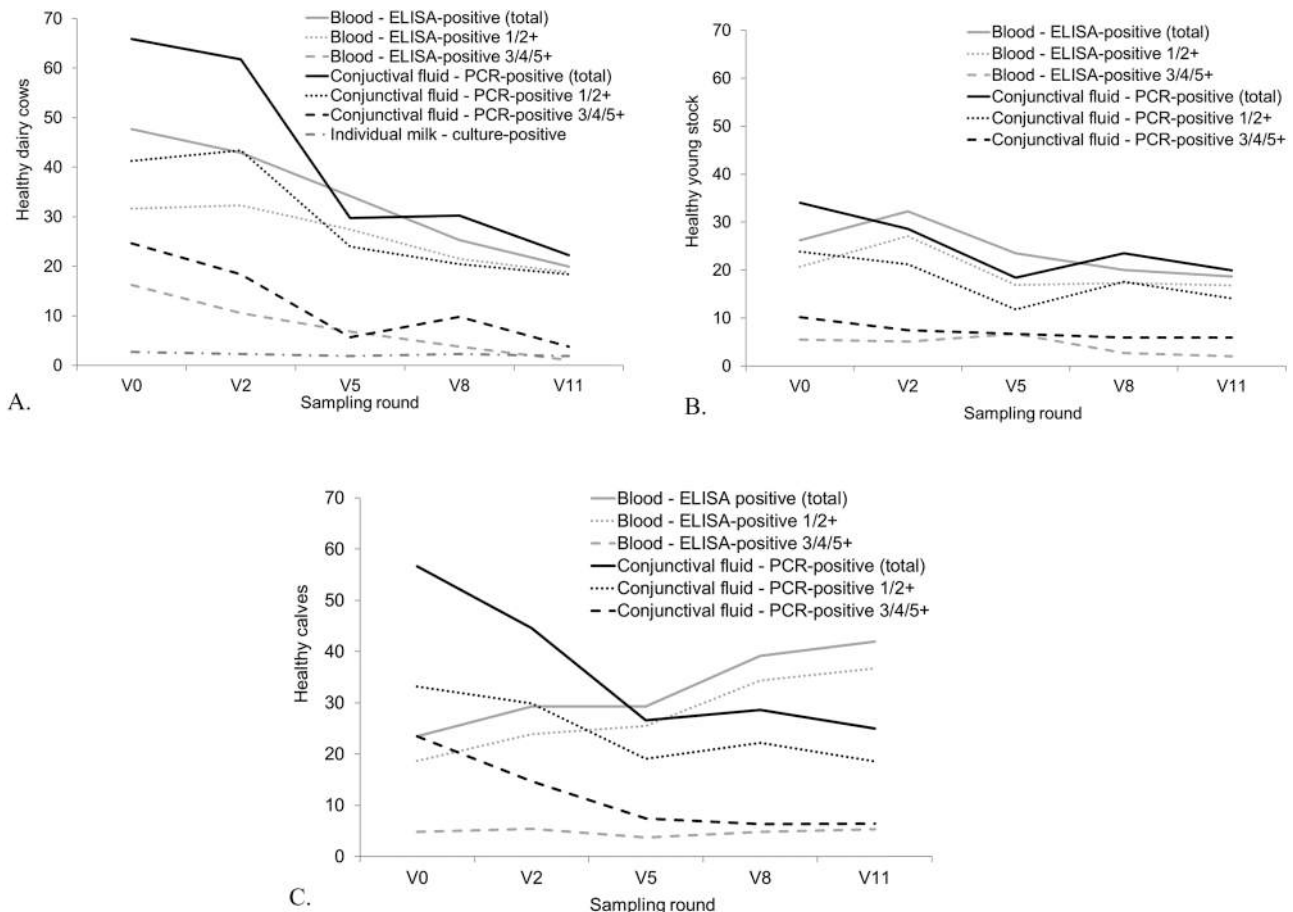


Fig. 1. A - C. *M. bovis* prevalence in healthy dairy cows (A), young stock (B) and calves (C) on outbreak farms based on ELISA (serum), PCR (conjunctival fluid) and, if applicable, culture (individual milk samples). V, visit number e.g., V0, first visit, V2, visit at week 2, etc.

Table 3 Mycoplasma bovis PCR test results of environmental samples at v0 and v11, grouped by farm and age-group. The numbers 0-5 indicate the amounts of M. bovis DNA detected (0 = 'negative', 1/2 = low 'positive' and 3/4/5 = high 'positive').

Farm	Sampling time v0	-Water troughs calves 1-6 mo.	-Water troughs young stock 7-12 mo.	-Water troughs young stock 12-24 mo.	-Water troughs dairy cows	-Lying cubicles dairy cows	-Water troughs cows	-Drinking buckets calves	-Water troughs calves 1-6 mo.	-Water troughs young stock 7-12 mo.	-Water troughs young stock 12-24 mo.	-Water troughs dairy cows	-Lying cubicles dairy cows	-Water troughs cows
		-Water troughs calves 1-6 mo.	-Water troughs young stock 7-12 mo.	-Water troughs young stock 12-24 mo.	-Water troughs dairy cows	-Lying cubicles dairy cows	-Water troughs cows	-Drinking buckets calves	-Water troughs calves 1-6 mo.	-Water troughs young stock 7-12 mo.	-Water troughs young stock 12-24 mo.	-Water troughs dairy cows	-Lying cubicles dairy cows	-Water troughs cows
A	2	3	0	0	2	2	1	3	1	0	0	1	0	0
B	5	4	3	3	4	3	3	0	0	0	0	0	1	0
C	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
E	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
H	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	0	3
I	1	0	0	0	1	3	3	0	1	1	0	0	0	0
J	0	2	1	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0
K	1	0	3	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0
L	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M	3	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
N	2	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
O	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0
P	2	3	1	0	1	0	3	0	0	0	0	0	0	0
Q	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0
R	4	3	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S	0	0	0	0	3	0	0	0	1	0	0	0	0	0
T	0	0	0	0	0	3	4	0	0	0	0	0	0	0

V0, first visit; V11, visit at week 11.

correlations of ELISA results between calves and young cattle showed a trend ($r^2 = 0.39$; $P = 0.09$). Correlation between the results of dairy cows and those of the other groups were not observed.

Based on PCR-results, the numbers of infected calves were correlated to that of young stock when comparing across visits. The *M. bovis* PCR ct counts in calves and young stock were highly correlated in all visits ($r_{total} = 0.81$; $P < 0.01$). No correlations between the *M. bovis* PCR-levels of dairy cows and those of calves, dairy cows and young stock were seen.

3.3. Environmental samples

M. bovis DNA was detected in at least one environmental sample in 80% of the farms at v0 and in 45% of farms at v11 (Table 3).

3.4. Milk samples

Most farms (17/20) had at least one milk sample in which *Mycoplasma* was cultured (i.e., 15 farms with positive individual milk samples and 12 farms with positive BTM samples). *Mycoplasma* was cultured in 54/1692 individual milk samples. Over the entire period, *Mycoplasma* was cultivated in milk in an average of 6.5% of clinically suspected and 2.2% of healthy dairy cows (Table 4). The prevalence of culture-positive milk samples from clinically suspected dairy cows ($n = 50$) dropped from 14.5% (v0) to 3.8% at v5 and 5.3% at v11. The prevalence of culture-positive milk samples from healthy dairy cows remained the same during the investigation (1.9-2.7%). Healthy dairy cows with culture-'positive' milk samples at v0 were more often culture-positive at v11 ($r = 0.70$; $P < 0.01$). At v0, the BTM was *Mycoplasma* culture-positive in 50% of the farms; the percentage decreased to 15% at v11.

At the end of the three-month study period (v11), at least one serum, conjunctival fluid or milk sample tested positive in 100%, 90% and 30% of the farms, respectively.

4. Discussion

Selected farms were associated with an early-phase *M. bovis* outbreak, that was expected to enable the monitoring of transmission within and between animal age groups. The detection of a *M. bovis* outbreak was based on the observations of the farmer, clinical investigation by the practicing veterinarian and a laboratorial diagnosis. However, based on test results, it was apparent that only four farms (A, I, Q and T) had no dissemination of *M. bovis* to other age groups at v0 yet and had possibly experienced an acute outbreak at the initiation of the sampling period. In all remaining farms the prevalence of ELISA-positive cows was already highest at v0, which may imply that *Mycoplasma* was already present in the farms. These results were not correlated with the farmer's or veterinarian's awareness of clinical signs, enabling the

Table 4 Mycoplasma culture results in percentages of individual milk samples of the clinically suspected dairy cows and healthy dairy cows during the five visits to investigate the persistence and transmission of the bacteria after introduction.

Animal group	Sampling time	Culture result		Number of samples
		Negative	Positive	
Clinically suspected dairy cows	v0	85.5%	14.5%	83
	v2	96.0%	4.0%	75
	v5	96.0%	4.0%	75
	v8	96.2%	3.8%	78
	v11	94.7%	5.3%	75
	Average	93.5%	6.5%	
Healthy dairy cows	v0	97.3%	2.7%	257
	v2	97.7%	2.3%	265
	v5	98.1%	1.9%	262
	v8	97.7%	2.3%	263
	v11	98.1%	1.9%	259
	Average	97.7%	2.2%	

V0, first visit; V2, visit at week 2, etc.

infections to spread substantially among dairy cows and further. Introduction may have also occurred in the other age groups which may have been obscured by the inclusion criteria used in the study.

A serological response was found before the last visit at v11, in line with our expectations and those of others, that seroconversion takes 2–3 weeks following exposure (Wawegama et al., 2014). Andersson et al. 2019 showed that the indirect Elisa kit used for this study had a lower sensitivity than others in a recent trial, suggesting the results in this study may have underestimated the true number of sero-positive samples. Due to intermittent excretion and loss of bacteria during sample transfer to the laboratory more cows were serologically positive than culture-positive (Nunez et al., 2008; Akan et al., 2014). The absence of *Mycoplasma*-related clinical signs in infected cattle is in line with a case report about a large dairy herd. Specifically, 13 cows had confirmed infection, among which only eight cows exhibited arthritis, and one had mastitis (Punyapornwithaya et al., 2011). Seroconversion of asymptomatic cows indicated that some cattle experienced *M. bovis* infection or became exposed without developing disease, an occurring that is not abnormal for infectious diseases (Morris et al., 1994).

Based on the PCR results, *M. bovis* was found at a comparable level in conjunctival samples of both clinically suspected and healthy animals. Via the nasolacrimal duct, lacrimal fluid is in direct contact with the mucous membranes in the upper part of the respiratory tract, where *Mycoplasma* resides. This may result in the presence of *M. bovis* in the conjunctival fluid and may be the reason for which this location is suggested as predilection site for *Mycoplasma* diagnostic samples (Maeda et al., 2003; Kleinschmidt et al., 2013; Oliveira et al., 2019). The *M. bovis* PCR levels of young stock and calves were highly correlated in all visits, indicating that calves and young stock were likely to be infected at the same level at the same time.

Contrary to general recommendations *Mycoplasma* was cultured under ambient CO₂ concentrations which could have given some false-negative results. However, *M. bovis* is known to be relatively insensitive to CO₂ concentration differences (Gourlay et al., 1979; Lowe et al., 2018). Lowe et al. (2018) discussed the evidence for CO₂ enrichment and suggested that the use of ambient CO₂ conditions might be an advantage for culture. Finally, in routine cultures of suspected calf pneumonia cases performed for more than 10 years, more than 50% positive results were observed, confirming that successful culture is feasible under ambient CO₂ conditions. For these reasons, unsuccessful culture was not viewed as a significant cause of false negative results. *Mycoplasma* spp. positive cultures were not confirmed by sequence analysis and could also imply other mycoplasma spp., such as *Mycoplasma bovirhinis*, *Mycoplasma bovigenitalium*, *Mycoplasma bovovulvi* or *Acholeplasma* spp. (Parker et al., 2018). However, the literature supports that *M. bovis* is the most important and frequently isolated *Mycoplasma* spp. associated with disease in cattle worldwide (Panciera and Confer, 2010; Fox, 2012).

Remarkably, only two herds experienced respiratory signs in a few dairy cows and four herds in calves, given aerogenic transmission is thought to be the main route of transmission in both calves and mature dairy cattle (Nicholas et al., 2016).

This study showed transmission between age groups in varying degrees in all farms. *M. bovis* could spread easily between young stock and calves. *M. bovis* infection in calves was correlated with that of young stock, which may indicate easy transmission between these groups. This could be due to direct contact, transmission by employees, and introduction of young animals into the older age groups. This is consistent with previous Swiss study in which transmission was correlated with contaminated milk. The mechanism of transmission was not investigated in our study. Whether the decreasing rate of infection was a consequence of a removal of active shedders or other farm measures, remains unclear (Aebi et al., 2015). An earlier study from Washington State University observed that the immediate culling of *Mycoplasma*-related mastitis cows was not associated with an accelerated end to new infections (Punyapornwithaya, et al., 2010, 2012). A factor that

influenced transmission was feeding pooled colostrum or raw mastitis milk to calves (Gille et al., 2020), which was practised in approximately 30% of herds investigated in this study.

To the best of our knowledge, this is the first study that aimed to closely monitor acute clinical *M. bovis* outbreaks in such a large number of farms (20). The results supported the hypotheses that *M. bovis* infects all age groups during the early outbreak stage despite separate housing and that animals, not exhibiting clinical signs, may nevertheless carry *M. bovis* bacteria. Findings also demonstrate that *M. bovis* is not likely to be eradicated from an outbreak farm within 3 months after the onset of clinical signs. Consistent with a previously published report (Nicholas et al., 2016) this study indicates that a *Mycoplasma* infection is clinically self-limiting at the herd level in most cases. However, disease patterns after the 3-month investigation periods are unknown.

5. Conclusions

Based on clinical and laboratory investigations the main conclusions of this study of the dynamics of *M. bovis* in Dutch dairy herds experiencing an acute clinical outbreak was that the infection was already dispersed throughout the farms. The occurrence and course of clinical signs were ostensibly unpredictable; despite the apparent presence of the agent 3 months after the start of the clinical outbreak, hardly any new clinical problems were observed.

Conflict of interest statement

This study was financially supported by the Dutch Dairy Industry (Zuivel NL), but the organisation did not play any role in the study design or in the collection, analysis and interpretation of data, nor in the decision to submit the manuscript for publication. The authors do not have any financial or personal relationships that could inappropriately influence or bias the content of the paper.

Acknowledgements

The authors would like to thank the participating farmers and their related veterinarians, other supporting Royal GD Animal Health colleagues (Ms Geralda Hop for previous reports and Mr. Wim Swart for statistical support), students, who participated in the study, Cambridge Proofreading LLC, for checking the correct language, the scientific Laboratorial staff for interpreting technical results and the funding suppliers Zuivel NL.

References

- Aebi, M., van den Borne, B.H., Raemy, A., Steiner, A., Pilo, P., Bodmer, M., 2015. *Mycoplasma bovis* infections in Swiss dairy cattle: a clinical investigation. *Acta Vet. Scand.* 57, 10.
- Akan, M., Babacan, O., Torun, E., Müştak, H.K., Öncel, T., 2014. Diagnosis of *Mycoplasma bovis* infection in cattle by ELISA and PCR. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 20, 249–252.
- Andersson, A., Aspán, A., Wisselink, H.J., Smid, B., Ridley, A., Pelkonen, S., Autio, T., Tølbøll-Lauritsen, K., Kenso, J., Gaurivaud, P., et al., 2019. A European inter-laboratory trial to evaluate the performance of three serological methods for diagnosis of *Mycoplasma bovis* infection in cattle using latent class analysis. *BMC Vet. Res.* 15, 369.
- Fox, L.K., 2012. *Mycoplasma* mastitis: Causes, transmission, and control. *Vet. Clin. N. Am. Food Anim. Pract.* 28, 225–237.
- Gourlay, R.N., Howard, C.J., Thomas, L.H., Wyld, S.G., 1979. Pathogenicity of some *Mycoplasma* and *Acholeplasma* species in the lungs of gnotobiotic calves. *Res. Vet. Sci.* 27, 233–237.
- Gille, L., Evrard, J., Callens, J., Supré, K., Grégoire, F., Boyen, F., Haesebrouck, F., Deprez, P., Pardon, B., 2020. The presence of *Mycoplasma bovis* in colostrum. *Vet. Res.* 511, 54.
- Haapala, V., Pohjanvirta, T., Vähänikkilä, N., Halkilahti, J., Simonen, H., Pelkonen, S., Soveri, T., Simojoki, H., Autio, T., 2018. Semen as a source of *Mycoplasma bovis* mastitis in dairy herds. *Vet. Microbiol.* 216, 60–66.
- Hazleton, M.S., Sheehy, P.A., Bosward, K.L., Parker, A.M., Morton, J.M., Dwyer, C.J., Niven, P.G., House, J.K., 2018. Short communication: shedding of *Mycoplasma bovis* and antibody responses in cows recently diagnosed with clinical infection. *J. Dairy Sci.* 101, 584–589.

- Hazelton, M.S., Morton, J.M., Bosward, K.L., Sheehy, P.A., Parker, A.M., Dwyer, C.J., Niven, P.G., House, J.K., 2020. *Mycoplasma* species in vaginas of dairy cows before and after exposure to bulls and their association with conception. *J. Dairy Sci.* 103, 11795–11805.
- Kleinschmidt, S., Spersger, J., Rosengarten, R., Hewicker-Trautwein, M., 2013. Long-term survival of *M. bovis* in necrotic lesions and in phagocytic cells as demonstrated by transmission and immunogold electron microscopy in lung tissue from experimentally infected calves. *Vet. Microbiol.* 162, 949–953.
- Lima, S.F., Teixeira, A.G.V., Higgins, C.H., Lima, F.S., Bicalho, R.C., 2016. The upper respiratory tract microbiome and its potential role in bovine respiratory disease and otitis media. *Sci. Rep.* 6, 29050.
- Lowe, J.L., Fox, L.K., Enger, B.D., Progar, A.A., Gay, J.M., 2018. Effect of atmospheric carbon dioxide concentration on the cultivation of bovine *Mycoplasma* species. *J. Dairy Sci.* 101, 4660–4666.
- Maeda, T., Shibahara, T., Kimura, K., Wada, Y., Sato, K., Imada, Y., Ishikawa, Y., Kadota, K., 2003. *Mycoplasma bovis*-associated suppurative otitis media and pneumonia in bull calves. *J. Comp. Pathol.* 129, 100–110.
- Maunsell, F.P., Donovan, G.A., 2009. *Mycoplasma bovis* infections in young calves. *Vet. Clin. N. Am. Large Anim. Pract.* 25, 139–177.
- Maunsell, F.P., Woolums, A.R., Francoz, D., Rosenbusch, R.F., Step, D.L., Wilson, D.J., Janzen, E.D., 2011. *Mycoplasma bovis* infections in cattle. *J. Vet. Intern. Med.* 25, 772–783.
- Morris, R.S., Pfeiffer, D.U., Jackson, R., 1994. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections. *Vet. Microbiol.* 40, 153–177.
- Nicholas, R.A.J., Fox, L.K., Lysnyansky, I., 2016. *Mycoplasma* mastitis in cattle: to cull or not to cull. *Vet. J.* 2016, 142–147.
- Nunez, C., Salinas, E.M., Maya, J.J.M., Hernandez, L., 2008. Detection of subclinical bovine mastitis caused by mycoplasmosis by indirect ELISA test and isolation. *Vet. Mex.* 39, 161–171.
- Oliveira, T.E.S., Pelaquim, I.F., Flores, E.F., Massi, R.P., Jiménez Valdiviezo, M.J., Pretto-Giordano, L.G., Alfieri, A.A., Saut, J.P.E., Headley, S.A., 2019. *Mycoplasma bovis* and viral agents associated with the development of bovine respiratory disease in adult dairy cows. *Transbound. Emerg. Dis.* 10, 111.
- Panciera, R.J., Confer, A.W., 2010. Pathogenesis and pathology of bovine pneumonia. *Vet. Clin. N. Am. Large Anim. Pract.* 26, 191–214.
- Parker, A.M., Sheehy, P.A., Hazelton, M.S., Bosward, K.L., House, J.K., 2018. A review of *Mycoplasma* diagnostics in cattle. *J. Vet. Intern. Med.* 32, 1241–1252.
- Petersen, M.B., Pedersen, J., Holm, D.L., Denwood, M., Nielsen, L.R., 2018. A longitudinal observational study of the dynamics of *Mycoplasma bovis* antibodies in naturally exposed and diseased dairy cows. *J. Dairy Sci.* 101, 7383–7396.
- Punyapornwithaya, V., Fox, L.K., Hancock, D.D., Gay, J.M., Alldredge, J.R., 2010. Association between an outbreak strain causing *Mycoplasma bovis* mastitis and its asymptomatic carriage in the herd: a case study from Idaho, USA. *Prev. Vet. Med.* 93, 66–70.
- Punyapornwithaya, V., Fox, L.K., Hancock, D.D., Gay, J.M., Wenz, J.R., Alldredge, J.R., 2011. Incidence and transmission of *Mycoplasma bovis* mastitis in Holstein dairy cows in a hospital pen: a case study. *Prev. Vet. Med.* 98, 74–78.
- Punyapornwithaya, V., Fox, L.K., Hancock, D.D., Gay, J.M., Alldredge, J.R., 2012. Time to clearance of *Mycoplasma* mastitis: The effect of management factors including milking time hygiene and preferential culling. *Can. Vet. J.* 53, 1119–1122.
- Wawegama, N.K., Browning, G.F., Kanci, A., Marenda, M.S., Markham, P.F., 2014. Development of a recombinant protein-based enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Mycoplasma bovis* infection in cattle. *Clin. Vaccine Immunol.* 21, 196–202.
- Wilson, D.J., Skirpstunas, R.T., Trujillo, J.D., Cavender, K.B., Bagley, C.V., Harding, R.L., 2007. Unusual history and initial clinical signs of *Mycoplasma bovis* mastitis and arthritis in first-lactation cows in a closed commercial dairy herd. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 230, 1519–1523.

Treatment of follicular cystic ovaries in dairy cattle

A. F. Majeed , Q.M. Aboud, M.S. Hassan A.R Muhammad
Coll. of Vet. Med. / Univ. of AL-Anbar

Abstract

The study was conducted on 48 Friesian-Holstein cows suffering from follicular cystic ovaries, presented in alfayha station Babel governerate, the age of the animals ranged from 5-7 years and the number of calving ranged from 3-5 times. Rectal palpation was the criteria of diagnosis. The animals were divided randomly into four equal groups (each group contain 12 cows). The first group treated with HCG (3000 I.U. I.M)., The second group were treated with 0.5 mg GnRH I.M. The third group were treated with GnRH (0.5 M.G I.M) plus 20 mg PGF₂ α I.M. The fourth group received placebo treatment (5 c.c Distil water) serve as acontrol group. All cows were subjected to rectal palpation 14 days after injection of the therapy to know the effect of different treatments. The results showed that the third group (GnRH+PGF₂ α) gave the best results (91.6%) followed by treatment with GnRH alone (75%) or treatment with HCG (50%). It was concluded from this study that GNRH plus PGF₂ α can be used treatment of follicular cystic ovaries with high success rate.

Introduction

Follicular cystic ovaries (FCO) are an important cause of infertility in dairy cattle. It is still responsible for considerable economic loss in dairy cows (1) prolongation of the calving interval and treatment cost of FCO result in economic loss for the dairy farmer (2). They are defined as a follicular structure, with a diameter of at least 2.5 cm that persist more than ten days in the absence of luteal tissue (C.L) (3,4,5,6). It has been reported that deficiency in the release of

LH at estrous from pituitary glands. This may be a reflection of the failure of hypothalamic release of GnRH or might be due to excessive secretion of FSH (7,8,9). There are several methods used for treatments of the follicular cystic ovaries includes manual rupture and various hormonal regimens (1,3,10). The aim of this study was designed to compare the effect of different hormonal therapy such as HCG, GnRH alone and GnRH with PGF₂ α in treatment of FCO in dairy cattle.

Materials & methods

The study was carried out on 48 Friesian-Holstein cows suffering from follicular cystic ovaries presented in AL-FAYHA station. The age of the cows ranged from 5-7 years and the number of parturition was 3-5 times. Rectal palpation was criteria of diagnosis which includes, the presence of one or more of cyst of 2.5 cm in diameter in the one or both ovaries. The animals were divided randomly into four groups of equal numbers (n=12 cows). The first group were treated with human chorionic Gonadotropine (HCG) (3000 I.U. I.M); The second group were treated with 0.5 mg i.m of Gonadotropic releasing

hormone (GnRH); The third group were treated with 0.5 mg i.m of GnRH followed with 20 mg Prostaglandin F₂ α (PGF₂ α) after 9 days; The fourth group received placebo treatment (5 c.c Distil water) serve as a Control group. All cows were subjected to rectal palpation 14 days after injection of the therapy to know the effect of different treatments. The results were termed positive where the cyst regressed and negative where there was no change in shape and size of the cysts. The results were tabulated and subjected to statistical analysis using Chi-square test at 5% probability (11).

Results & discussion

All the cows under the study had unilateral cysts, affecting the right ovary more (36/48-75%) than the left one (12/48-25%). The number of the cyst were varied

from one to three while the size of the cyst varied from 2.7 to 3.5 cm in diameter. Out of 36 cows treated with different hormonal therapy, 26 cows responded positively to

the treatment Schedules .Treatment with GnRH followed 9 days with PGF₂α gave the best results (91.66%) followed by GnRH alone (75%), and HCG(50%).while the control group showed spontocows recovery in two cases (16.66%). There was a significant difference (P <0.05) between different hormonal treatments . The result obtained with GnRH plus PGF₂α with high response agreed with observations of several authors(1,9). This might be due to

the effect of GnRH which may cause leutinization of the cyst or ovulation of the follicles (3,12,13).GnRH has also a small molecular weight which can be repeated without immune response as occasionally produced by exogenous LH or HCG (3).PGF₂α injection have been used as a luteolytic agent which involute all the lutein tissue in the cystic ovarian structure (14,15)

Table-1: Showed the response to differentHormonal treatment of FCO

GROUP	TYPE OF TREATMENT	NO.OF TREATED ANIMAL	RESPONSE	EFFICACY%
I.	HCG 3000 i.u. i.m (1 st group)	12	6	50%*
II.	GnRH 0.5 mg i.m (2 nd group)	12	9	75%*
III.	GnRH 0.5 mg i.m+PGF ₂ α20 mg i.m after 9 days(3 rd group)	12	11	91.66%*
IV.	Distil Water sc.c (Control group)	12	2	16.66%*

*There was a significant difference(P<0.05) between different treatments.

The response to GnRH treatment agreed with other worker's (1,10,13).Cows not responded to GnRH treatment might be attributed to degeneration of theca and granulosa cell layers (14).Similar observation has been made by Majeed and Ali (13), Kesler and Garverick(3) and Garverick(1).The response obtained with HCG is is in conformation with the

previous reports (10,13,14). The low response to HCG treatment might be due to absence of uterine irritation which has been reported to improve the blood supply of the endometrium and thus enhanced its regeneration (16).From this study ,it was concluded that GnRH plus PGF₂α can be used for treatment of follicular cystic ovary with high success rate.)

References

1. Garverick ,H.A., 2007.Ovarian follicular cysts, in:current Therapyin large Animal Theriogenology by R.S. Youngquist and W.R. Threlfall ED. Saunders,Elgevier P.379.
2. Vanholder ,T., Opsomer ,G and Dekruif,A., 2006. Etiology follicles in dairy cattle :a review. Reprod.Nytr.Dev-46:105-119.
3. Kesler, D.J. and Garverick ,H.A., 1982. ovarian Cysts in dairy cattle: a review.J.Anim.Sci.,55:1147-1159.
4. Youngquist, R.S., 1986. Cystic Follicular degeneration in the cow .In: Morrow ,D.(Ed). Current Therapy intheriogenology ,2nd ed ,WB Saunders Co.,Philadelphia ,P.243-246.

5. Day,N.,1991. The diagnosis ,differentiation ,and pathogenesis of cystic ovarian disease, Vet.Med.,86:753-760
6. Woolums ,A.R. and Peter ,A.T., 1994.Cystic ovarian Condition in cattle .Prt I .folliculogenesis and ovulation. Compend Contain .Edu . Pract. Vet.(Food Animal), 16:935-942.
7. Noakes ,D.E.,2008.,Infertility in the cow. In:Vet.Reprod. and Obstet.Arthur,G.H., Noakes ,D.E., Pearson, H.and Parkinson,T.J.ed.,7th ed .PP.345-388.W.B.Saunders,Co.,London.
8. Opsomer ,G., Wensing, Th,Lavens, H., Coryn, M .,and Dekruif. ——— 1999,Insulin resistance: The link between metabolic disorders and Cystic ovarian disease in high yielding dairy cows. Anim.Repord.SCI.,56:211-222 .
9. Nobele, K.M., Tebble, J.E., Harvey, D. and Dobson,tl., 2000. Ultrasonography Dobson,tl., 2000. Ultrasonography.
10. Nanda,A.S.,ward,W.R.,Williams,P.C. Wetal.,1988. Retrospectivean alysis of the efficacy of different hormone treatments on Cystic ovarian disease in cattle.Vet.Rec.,122:155.
11. Steele,R.D. and Torrie ,J.H.,1980. Principles and Procedures of Statistics , Toronto, Mc Graw Hill Inc.
12. Grunert,B.,Hoffman,B.and Ahlers ,D.,1981.Treatment of Cystic varies in Cattle .Dt.tieraztl. Wschr. 81:373
13. Majeed,A.F. and Ali, J.B., 1987. Treatment of follicular Cystic ovaries in dairy cattle. Indian Vet.J .,64:340-342.
14. Roberts, S.J.,1986. Cystic ovaries. In : Vet ,Obstet.and Genit.Dis. Robert, S.J.ed ., 3rd ed .PP.478-492. Edward Bros ., In'c ,Ann Arobor MI.
15. Ndossi,D.,Kamimura,S.,Ando,T.etal., 2004. Efficacy of CIDR Treatment against ovarian Follicular Cyst in cows Mem. Fac. Agr. Kagoshima Univ., 39:45.56.
16. Fathalla ,M.A. and Fahmi ,H., 1979.Treatment of follicular Cyst in beef cattle. Case report, Iraqi vet. med,J .,3:123.

علاج تكيس المبايض الجريبي في الأبقار الحلوب الخلاصة

عبد الستار فرج مجيد قصي محمد عبود مصطفى صلاح حسن احمد ياسين محمد
كلية الطب البيطري /جامعة الانبار

اجريت الدراسة على 48 بقرة من سلالة الفريزيان- هوليشتاين تواجدت في محطة الفيحاء التابعة لمحافظة بابل. تراوحت أعمار الأبقار بين 5-7 سنوات وعدد الولادات من 3-5 ولادات. شخّصت حالات تكيس المبايض عن طريق الجس عن طريق المستقيم. قسمت الأبقار عشوائيا الى اربع مجاميع متساوية (كل مجموعة 12 بقرة). عولجت المجموعة الاولى بحقنها بالعضل بمحرض القند المشيمي (HCG) (3000وحدة دولية) ،وعولجت المجموعة الثانية بحقنها بالعضل بمحرر محفزات القند (GnRH) (0.5 ملغم) ،وعولجت المجموعة الثالثة بحقنها (GnRH) (0.5 ملغم بالعضل) مع البروستوكلاندين (PGF_{2α}) (20 ملغم بالعضل) ،أما المجموعة الرابعة فأعطيت 5 مل من الماء المقطر بالعضل وجعلت مجموعة سيطرة. أظهرت النتائج تفوق المجموعة الثالثة 91.66% عند مقارنتها مع المجموعة الأولى والثانية ومجموعة السيطرة لوحظ وجود فرق معنوي (>0.5%) بين المجاميع المعالجة ومجموعة السيطرة. وقد أستنتج من الدراسة إمكانية استخدام الـGnRH وPGF_{2α} في معالجة تكيس المبايض الجريبي في أبقار الحلوب.

Submitted: 30/11/2021

Accepted: 20/03/2022

Published: 04/04/2022

Generation of an inactivated vaccine for avian pathogenic *Escherichia coli* using microarrays: A more rational approach to inactivated vaccine design

Xiangmei Zhou^{1,2†}, Philip Richards^{1,3†}, Daniel Windhorst⁴, Ariel Imre^{1,5}, Agnes Bukovinski¹, Jessica Ruggeri⁶, Altayeb Elazomi⁷ , and Paul Barrow^{1,8*} 

¹School of Veterinary Medicine and Science, University of Nottingham, Sutton Bonington Campus, Loughborough, UK

²Department of Veterinary Pathology, College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing, China

³School of Biosciences, University of Nottingham, Sutton Bonington Campus, Loughborough, UK

⁴Cargill Animal Nutrition, Rotterdam, Netherlands

⁵CEVA Phylaxia, Budapest, Hungary

⁶Veterinary Services, ATS Brescia, Brescia, Italy

⁷Medical Laboratories Department, Medical Technology Faculty, University of Zawia, Zawiya, Libya

⁸School of Veterinary Medicine, University of Surrey, Guildford, UK

[†]Both authors contributed equally to this work

Abstract

Background: *Escherichia coli* remains a major pathogen of poultry. Most vaccines are inactivated and produced empirically. Although inactivated *Salmonella* vaccines have been produced by culture under conditions of Fe deprivation, no vaccines have been produced which are likely to express all the proteins expressed during infection of antigen-presenting cells.

Aim: The aim was to produce a more protective inactivated vaccine by culturing the avian *E. coli* in a synthetic medium that resembled the environment of the phagolysosome.

Methods: Global gene expression in a pathogenic avian O78:K80 strain of *E. coli*, harvested from infected avian macrophage-like HD11 cells, was compared by microarray with bacteria cultured in a tissue culture medium. A liquid synthetic medium was produced based on the environmental conditions identified to which the bacteria were exposed intracellularly. A bacterin was produced from this strain and its protective ability was assessed in chickens.

Results: The changes in *E. coli* gene expression observed included the use of different electron acceptors and carbon sources such as ethanolamine, β -glucosides, galactonate, dicarboxylic acids, and amino acids, up-regulation of genes associated with Fe and Mn uptake, and up-regulation of type-1 and curli fimbriae, other adhesion genes and down-regulation of sialic acid synthesis genes. The bacterin produced in the synthetic medium was statistically more protective than a bacterin prepared from bacteria cultured in the nutrient broth when tested in vaccinated chickens challenged with a different virulent *E. coli* O78:K80 strain.

Conclusion: The approach of using gene expression to produce synthetic media for the generation of more effective bacterins could be used for a number of intracellular bacteria pathogens including Enteroinvasive *E. coli*, *Salmonella*, and the *Pasteurella/Riemerella/Mannheimia* group of organisms.

Keywords: Microarray, Vaccine, Chicken, Gene expression, Synthetic medium.

Introduction

Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) is a major poultry pathogen causing septicemia and polyserositis in the immediate post-hatching period (Nolan *et al.*, 2013) or following infectious bronchitis (Dho-Moulin and Fairbrother, 1999) or turkey rhinotracheitis metapneumovirus infection (Picault *et al.*, 1987).

As a taxon, APEC comprises related clusters of strains expressing a range of virulence determinants associated with individual syndromes (Gyles and Fairbrother, 2010). No single combination of virulence determinants characterizes virulence. Identified determinants include

individual fimbriae and other adhesins and invasins, serum resistance factors, and toxins (Nolan *et al.*, 2013). The availability of several annotated genome sequences (Johnson *et al.*, 2007; Dziva and Stevens, 2008; Dziva *et al.*, 2013; Mangiamele *et al.*, 2013), has facilitated the identification of new candidate virulence genes. Some serotypes are associated with both avian and human infection (Johnson *et al.*, 2007).

Although septicemia is characteristic of many poultry infections, the highest numbers of bacteria are isolated from the spleen, in addition to other organs, most probably located within macrophages (Smith *et al.*, 1985; Barrow *et al.*, 1998). The microbial behavior in

*Corresponding Author: Paul Barrow. School of Veterinary Medicine, University of Surrey, Guildford, UK.

Email: paul.barrow@surrey.ac.uk

this site and within antigen-presenting cells (APCs) is also important in initiating the immune response.

Control of infection by chemotherapy inevitably selects for antibiotic resistance, especially in countries where regulation is less stringent (Wang *et al.*, 2010). Inactivated vaccines (bacterins) are generally regarded as being less effective than live, attenuated vaccines because the latter stimulates both humoral and cellular immunity. However, issues including the use of genetically manipulated vaccines suggest that inactivated vaccines will be used for the foreseeable future. Attempts have been made to develop more rational inactivated bacterial vaccines (Woodward *et al.*, 2002) by culturing the bacteria under conditions of iron restriction. However, studies with *Salmonella typhimurium* infecting mouse macrophages (Eriksson *et al.*, 2003) and with avian serovars in chicken macrophages (Imre *et al.*, 2013) indicate that Fe restriction is not the only feature characterizing the intracellular environment.

We hypothesized that an analysis of the conditions inside macrophages using data generated by bacterial transcriptional analysis could lead to the development of a medium reproducing those conditions more accurately. A bacterin produced in this way should more closely resemble bacteria within macrophages and other APCs antigenically than bacteria cultured in nutrient broth (NB) and should be more protective. The Objective was therefore to infect the avian macrophage-like cell line HD11 with an APEC strain, carry out transcriptional analysis on the harvested bacteria by microarray and identify from the pattern of gene expression the environmental conditions to which the bacteria are subjected intracellularly. These conditions would be reproduced in a synthetic medium to culture the bacteria which would then be evaluated as a bacterin in chickens challenged with a different APEC strain.

Material and Methods

Bacterial strains and culture

Escherichia coli O78:K80 strains F31 and F135 were isolated from cases of avian colibacillosis. Both are virulent for chickens when inoculated parenterally (Barrow, unpublished results; Smith *et al.*, 1985). NB (Oxoid, CM67) cultures were incubated at 37°C for 24 hours. These contained between 1 and 3×10^9 cfu/ml. Bacterial enumeration was made using the method of Miles *et al.* (1938) culturing on MacConkey agar plates (Oxoid CM0007).

Cell culture and in vitro infection model

Avian macrophage-like HD11 cells (Beug *et al.*, 1979) were grown in RPMI-1640 medium supplemented with 20 mM L-glutamine (Gibco), 2.5% fetal calf serum (Gibco), 2.5% chicken serum (Sigma) and 10% tryptose phosphate broth (Sigma). For each bacterial infection, a total of 3×10^7 HD11 cells were seeded in each of three tissue culture flasks (175 cm², Nunc).

Overnight NB cultures of bacterial strain F31 were diluted 20-fold in the cell culture medium described above and grown statically for 2 hours (5% CO₂), then added onto the HD11 cells at a Multiplicity of Infection of ≈ 100 . After co-incubation for 1 hour under the above conditions, the medium was replaced with a medium supplemented with 100 µg/ml gentamicin (Gm, Gibco). After the first 1 hour incubation, the medium was replaced with one containing 15 µg/ml Gm. Sampling points were at 0, 4, 8, 12, 24 and 48 hours post-infection. Cells were lysed (Barrow and Lovell, 1989) for bacterial enumeration.

RNA extraction and processing

The RNA extraction protocol for F31 bacteria extracted from the infected cells and broth culture was that of Eriksson *et al.* (2003) and used by Imre *et al.* (2013). At 4 and 8 hours after infection, cells were lysed with 0.1% SDS, 1% phenol, and 19% ethanol in water for 30 minutes on ice. Bacteria were collected by centrifugation (5,000 g, 10 minutes, 4°C), treated with protective lysozyme and Proteinase K, and total RNA was prepared using the RNeasy Mini Kit (Qiagen). Bacterial RNA was also harvested from bacteria cultured in RPMI for 2 hours, which had been inoculated with a 20-fold dilution from the overnight NB culture, to produce bacterial numbers similar to those applied to the cell monolayers. RNA from bacteria grown in a cell culture medium was isolated using the same RNA purification kit. The quality of bacterial RNA and host RNA contamination was checked by a 2100 Bioanalyzer (Agilent). The RNA was amplified using the MessageAmp™ II-Bacteria Kit (Ambion), resulting in aminoallyl-UTP labeled amplified RNA (aRNA). For labeling, 6 µg aliquots of the aRNA samples were coupled with the fluorescent dyes Cy3 and Cy5 (Amersham). Cy3 was coupled to *in vitro* control RNA, while Cy5 was used to label bacterial RNA extracted from macrophages.

Microarray design and data analysis

The sequence used for the array design was the APEC O1:K1:H7 reference strain (NC 008563) (Johnson *et al.*, 2007). All predicted ORFs were designated for probe design. The web-based Agilent eArray system (Agilent Technologies, <https://earray.chem.agilent.com/earray/>) was used with the following settings during the microarray probe design: Tm (70°C) matching methodology, 60-mer probe length, 3 probes/target. The protocol, experimental setup, RNA extraction, amplification, labelling, and hybridization are described in detail at <http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/>. Data analysis was done using GeneSpring GX 10.0 (Agilent).

The ultimate purpose of this analysis was to develop a synthetic medium reproducing these conditions as near as possible. For this reason, a full analysis of gene expression was not carried out by COGs gene classes. They were grouped according to genes likely to affect intracellular survival, response to stress, and virulence gene expression as indicated below.

Synthetic Macrophage Medium (SMM-1)

The composition of the SMM-1 was: 100 mM Tris-Cl, pH 5.0, 2 mM D-glucose, 2 mM D(+)-galactose, 20 mM glycerol, 20 mM glycerol-3-phosphate, 20 mg/L L-valine, 50 mg/L L-leucine, 50 mg/L L-isoleucine, 65 mg/L L-cysteine 2HCl, 5 mg/L L-tryptophan, 1 mM MgCl₂, 200 μM 2,2-dipyridyl, 500 μM CaCl₂, 3 mM ZnSO₄, 50 mM K₂SO₄, 100 mM NaCl, 7.5 mM (NH₄)₂SO₄ in 100 ml ultrapure water. The pH was adjusted to 5 with hydrochloric acid and the final medium filter sterilized.

Bacterin production

A 5 ml aliquot of an overnight NB culture of *E. coli* F31 was added to 95 ml RPMI1640 medium (Invitrogen Ltd., Paisley, UK) pre-warmed to 37°C. This was incubated statically for 2 hours at 37°C in 5% CO₂. Bacterial cells were recovered and washed twice in fresh SMM-1 medium or NB before being resuspended in fresh SMM-1 or NB respectively. These cultures were incubated statically at 37°C under aerobic conditions for 4 hours and the viable counts were estimated on nutrient agar (NA). A 0.2 ml aliquot of 40% formalin was added to 10 ml of the SMM-1 and NB cultures and allowed to stand for approximately 12 hours at ambient temperature followed by a 24 hours period at 4°C. Both formalinised preparations were centrifuged at 1,500 g for 30 minutes and both pellets were resuspended separately in 10 ml PBS. 100 μl aliquots were removed and cultured in NB (37°C, overnight) to determine sterility. These formalin-treated cell suspensions were adjusted to a density equivalent to ~1 × 10⁹ CFU/ml before use as vaccine.

Vaccination studies

Three groups (A, B, and C) of 25 1-day-old Hy-Line layers were housed in separate rooms on solid floors with shavings. At 4 and 18 days of age groups, A and B were inoculated with the bacterins without adjuvant. Birds were vaccinated simultaneously orally (100 μl with a blunt-ended needle) and intra-muscularly (100, 50 μl into each breast muscle), in the case of group A, with the SMM-1 bacterin, group B with the NB bacterin and group C with PBS. At 29 days of age, all birds were challenged intravenously with 1 × 10⁵ cfu of a 24 hours NB culture of an O78:K80 *E. coli* strain F135. At 30, 31, 33 days of age, 5 birds, and at 36 days, 10 birds were killed from each group and the numbers of the inoculated challenge strain in homogenized samples of liver, spleen, and blood were counted on MacConkey agar. The protective effect was measured as reductions in the severity of frequency of morbidity if these occurred or by reductions in bacterial numbers in the blood, liver, and spleen.

Ethical approval

Animal experiments were carried out under a UK government Home Office Project and Personal Licence held by Prof. Barrow and reviewed internally by the University of Nottingham Animal Welfare and Ethical Review Body prior to initiation of the work.

Results

The viable numbers of the F31 strain in the cultured HD11 cells fell from Log₁₀ 3.8 at 4 hours to 3.7 at 12 hours. RNA was therefore recovered 8 hours post-infection.

Transcriptional profile of bacteria harvested from HD11 cells

The patterns of gene expression of strain F31 in the intra-macrophage environment 8 hours after infection and grouped by activity, are shown in Tables 1 and 2. Genes showing statistically significant increases in expression of more than 10-fold are shown in Table 1. A more limited selection of genes of microbiological interest that were similarly significantly down-regulated is shown in Table 2. The ultimate purpose of this analysis was to develop a synthetic medium reproducing these conditions as near as possible. For this reason, a full analysis of gene expression was not carried out by COGs gene classes. They were grouped according to genes likely to affect intracellular survival, response to stress and virulence gene expression as indicated below (i – vi).

- (i) Electron transport. Upregulation of putative oxidoreductases and dehydrogenases coincided with downregulation of nitrate and nitrite reductases including *nirBD* (nitrite reductase), *narGHI* (nitrate reductase), and *napAC* (nitrate reductase with additional functions). Pyruvate kinase I (*pykF*) and formate dehydrogenase sub-unit I (*fdnG*) were also down-regulated. This suggested that the macrophage phagolysosome environment had a relatively high redox value as indicated by Turner *et al.* (2003).
- (ii) Carbon sources. A number of different loci associated with carbon sources utilized by the bacteria showed changes in expression although there was no clear picture. There was evidence that dicarboxylates were utilised as carbon sources suggested by up-regulation of the *dcuB* transporter gene and a diacid regulator *cdaR*. The *gntR* gene which regulates the *gntI* operon associated with gluconate utilization was up-regulated. The involvement of gluconate was emphasised by the up-regulation of *idnK*, a gluconate kinase. Expression of *glcC* was up-regulated. This is an activator of the *glc* operon which is associated with the transformation of glycolate to glyoxalate, and therefore may also be associated with osmotic stress rather than a prime carbon source (Núñez *et al.*, 2001). Its regulation requires Integration Host Factor which affects virulence and responses to stressful conditions. Glyoxalate is also an important intermediate in the glyoxalate bypass involved in acetate or fatty acids as major energy sources (Pellicer *et al.*, 1999). Other carbohydrates such as ethanolamine, mannose, and xylan may also have been important although the evidence through up-regulation of single genes *eutA*, *gmd*, and *yieL*, respectively was not strong as indicated by low changes in gene expression.

Table 1. Changes in gene expression in *E. coli* F31 cultured in HD11 cells measured by microarray which were up-regulated by greater than 10-fold after 8 hours culture in HD11 cells.

Gene class	Gene	Function or product	Mean change in expression 8 hours
Electron transport	<i>nadA</i>	Quinolate synthetase A	13.65
	<i>norV</i>	Flavorubredoxin oxidoreductase	35.2
	<i>sdhA</i>	Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit	11.17
	<i>ycdW</i>	Putative dehydrogenase	21.26
	<i>ydiR</i>	Predicted electron transfer flavoprotein, FAD-binding	12.13
	<i>ydjG</i>	Putative oxidoreductase	13.57
	<i>yehL</i>	Putative ATPase	14.96
	<i>ygcU</i>	Putative FAD containing dehydrogenase	11.41
	-	Putative dihydrolipoamide dehydrogenase	10.68
Carbon sources	<i>astA</i>	Arginine N-succinyltransferase	11.69
	<i>atoA</i>	Acetyl-CoA: acetoacetyl-CoA transferase, beta subunit	10.79
	<i>bglH</i>	Carbohydrate-specific outer membrane porin, cryptic	19
	<i>cdaR</i>	Carbohydrate diacid regulator	14.79
	<i>dadX</i>	Alanine racemase 2, catabolic	15.39
	<i>dcuB</i>	Anaerobic C4-dicarboxylate transporter DcuB	19.76
	<i>dgoD</i>	2-oxo-3-deoxygalactonate 6-phosphate aldolase/galactonate dehydratase	13.05
	<i>eutA</i>	Ethanolamine utilization protein EutA	15.23
	<i>gclR</i>	Putative regulatory protein GclR	13.01
	<i>glcC</i>	Glc operon transcriptional activator	14
	<i>gltA</i>	Citrate synthase	13.18
	<i>gmd</i>	GDP-mannose 4,6-dehydratase	13.11
	<i>idnK</i>	Thermosensitive gluconokinase	10.84
	<i>metF</i>	5,10-methylenetetrahydrofolate reductase	11.66
	<i>rbsA</i>	Putative ribose transport ATP-binding protein RbsA	13.98
	-	Putative hexuronate transporter	15.61
	<i>wzb</i>	Tyrosine phosphatase	13.49
	<i>xapR</i>	Santhosine operon regulatory protein	12.77
	<i>ybbA</i>	Putative ABC-type transport protein YbbA	14.75
	<i>ydjH</i>	Putative sugar kinase	10.84
	<i>ygfT</i>	Putative NADPH-dependent glutamate synthase beta chain	18.55
	<i>ygjK</i>	Putative glycosyl hydrolase	13.39
	<i>yieL</i>	Putative xylanase	13.72
	<i>yphF</i>	ABC-type sugar transport system, periplasmic component YphF	15.39
	-	Putative regulatory protein, GntR family	20.87
	-	Putative lactate dehydrogenase	10.93

Continued

Gene class	Gene	Function or product	Mean change in expression 8 hours
Ion and other transport	<i>cniT</i>	Putative carnitine transporter CniT	11.34
	<i>cysA</i>	Sulfate transport ATP-binding protein CysA	11.56
	<i>cysW</i>	Sulfate/thiosulfate transporter subunit CysW	10.66
	<i>entS</i>	EntS/YbdA MFS transporter	10.33
	<i>fepC</i>	Ferric enterobactin transport ATP-binding protein FepC	13.5
	<i>fes</i>	Enterochelin esterase	12.13
	<i>livJ</i>	Leu/Ile/Val-binding protein precursor	12.22
	<i>mglC</i>	Galactoside transport system permease protein MglC	23.74
	<i>mntH</i>	Manganese transport protein MntH	18.8
	<i>nhaA</i>	Na ⁺ /H antiporter, pH dependent	10.86
	<i>sbp</i>	Periplasmic sulfate-binding protein	10.39
	<i>tauC</i>	Taurine transport system permease protein TauC	19.85
	<i>ybtU</i>	Yersiniabactin biosynthetic protein	17.66
	<i>ydjE</i>	Putative metabolite transport protein	13.9
	<i>yejB</i>	Predicted oligopeptide transporter subunit	10.29
Key regulatory functions	<i>bglJ</i>	BglJ 2-component transcriptional regulator	17.08
	<i>rseA</i>	Sigma-E factor, negative regulatory protein	12.6
	<i>ycdT</i>	Predicted diguanylate cyclase	22.83
	<i>ygaA</i>	Putative sigma-54-dependent transcriptional regulator YgaA	23.69
Surface and virulence functions	<i>bfr</i>	Bacterioferritin, iron storage and detoxification protein Bfr	17.69
	<i>csgE</i>	Assembly /transport component in curli production	11.24
	<i>eaeH</i>	Attaching and effacing protein, pathogenesis factor EaeH	12.16
	<i>fimD</i>	Outer membrane usher protein FimD precursor	13.79
	<i>sinH</i>	Putative intimin/invasin (SinH-like protein)	17.4
	<i>yfcV</i>	Putative Yfc fimbriae subunit YfcV precursor	19.6
	-	FimF protein precursor	11.67
	<i>wcaF</i>	Putative colanic acid biosynthesis acetyltransferase	11.11
	<i>yohK</i>	Putative serotonin transporter	10.25
	<i>betB</i>	Betaine aldehyde dehydrogenase, NAD-dependent	10.58
Stress responses	<i>betI</i>	Regulatory protein BetI	13.57
	<i>cpxP</i>	Periplasmic repressor of cpx regulon by interaction with CpxA	28.27
	<i>htrA</i>	Periplasmic serine protease Do, heat shock protein HtrA	19.53
	<i>osmC</i>	Osmotically inducible protein OsmC	13.14
	<i>proP</i>	Proline/betaine transporter	15.89
	<i>pspA</i>	Phage shock protein A	28.09
<i>pspE</i>	Phage shock protein E precursor	20.53	

Continued

Gene class	Gene	Function or product	Mean change in expression 8 hours
Stress responses	<i>recA</i>	DNA strand exchange and recombination protein with protease and nuclease activity	11.57
	<i>recN</i>	DNA recombination and repair protein RecN	14.4
	<i>recX</i>	Regulatory protein for RecA	12.03
	<i>rseA</i>	Sigma-E factor, negative regulatory protein	12.6
	<i>rspA</i>	Starvation sensing protein RspA	10.89
	<i>umuC</i>	Mutagenesis and repair protein UmuC	33.2
	<i>umuD</i>	Mutagenesis and repair protein UmuD	17.42
	-	Putative phage lysin	54.63
	<i>ygaA</i>	Putative sigma-54-dependent transcriptional regulator YgaA	23.68
Miscellaneous	<i>marA</i>	Multiple antibiotic resistance protein MarA	12.75
	<i>psiA</i>	PsiA—plasmid SOS inhibition	10.72
	<i>traN</i>	TraN—mating pair stabilisation protein	12.8
	<i>traR</i>	TraR—quorum sensing and plasmids	14.39
	<i>traW</i>	TraW—transfer pilus assembly F plasmid	15.02

- (iii) Transport. Many of the transport genes up-regulated in macrophages were associated with the uptake of carbohydrates and other potential carbon sources. These included galactoside transport permease (*mgIC*), a C4-dicarboxylate binding protein (*dcuB*, mentioned above), a putative hexuronate transporter, and transport proteins for oligopeptides (*yejB*), and long-chain fatty acids (*fadL*). Up-regulation of genes encoding ion transport proteins for sulfate (*cysA*, *cysW*, *sbp*, *tauC*), manganese (*mntH*), and ferric iron (*fepC*, *entS*, *fes*, *ybtU*), and iron storage (*bfr*) indicated restriction for these ions.
- (iv) Stress. In comparison with growth in NB, the bacteria were subjected to higher osmotic stress as indicated by a number of genes related to the biosynthesis of betaine (*betAB*), its regulator (*betL*), *proP* which transports both proline and betaine and *osmC*. The heat stress-related proteins *htrA* and *cpxP* were up-regulated. Stresses to DNA are indicated by up-regulation of *recA* and its regulator *recX*, *recN*, and *umuC*, and *umuD*. This is probably also linked to increased prophage activity with a number of genes up-regulated including *pspA* and *pspE*, a prophage integrase, *intD* and a putative phage lysin.
- (v) Surface and virulence proteins. The major virulence genes up-regulated were associated with fimbriae elaboration (*csgE*, *fimD*, *fimF*, and *yfcV*) and adhesins/invasins (*eaeH* and *sinH*). One of the colanic acid biosynthesis genes *wcaF* was up-regulated. These changes were accompanied by down-regulation of genes associated with sialic acid capsule formation. Genes encoding surface porins

OmpF, NmpC, and the OmpN precursor were also down-regulated.

Confirmation of levels of gene expression by qRT-PCR was not carried out. Although there are some limitations in the range of signal intensity obtainable with microarrays, most publications show very good correlation between levels of expression measured by microarray and by qRT-PCR or other quantitative methods, including *E. coli in vitro* (Richmond *et al.*, 1999), Enterohaemorrhagic *E. coli* in contact with rabbit cells (Dahan *et al.*, 2004), *S. typhimurium* in murine macrophages (Eriksson *et al.*, 2003), in human and canine epithelial cells (Hautefort *et al.*, 2008), the chicken intestine (Dhawi *et al.*, 2011; Harvey *et al.*, 2011) and with four different *Salmonella enterica* serovars in HD11 cells (Imre *et al.*, 2013).

Synthetic medium and vaccine development

The microarray results showed changes in gene expression indicative of availability of gluconate, succinate, and cysteine with Fe and Mn restriction and osmotic and heat stress, although the preferred carbon source was unclear. This information combined with published literature, indicating low phagosome pH, (Rathman *et al.*, 1996), was used to develop a synthetic medium (SMM-1), the full composition which is described in Materials and Methods. This was used to generate a bacterin of *E. coli* F31 for vaccination studies.

Vaccination experiment

The protective effects of the F31 bacterin produced by culture in medium SMM-1 against intravenous challenge of an O78:K80 strain F135 compared to those induced by a bacterin prepared using the same strain cultured in NB are shown in Table 3.

Table 2. Changes in gene expression in *E. coli* F31 cultured in HD11 cells measured by microarray which were down-regulated by greater than 10-fold after 8 hours culture in HD11 cells.

Gene class	Gene	Function or product	Mean change in expression 8 hours
Electron transport and metabolism	<i>fdnG</i>	FdnG, alpha subunit of formate dehydrogenase-N	13.92
	<i>napA</i>	Periplasmic nitrate reductase precursor	20.72
	<i>napC</i>	Nitrate reductase, cytochrome c-type, periplasmic	15.05
	<i>narG</i>	Nitrate reductase 1, alpha subunit	16.09
	<i>narH</i>	Nitrate reductase 1, beta (Fe-S) subunit	10.38
	<i>narI</i>	Respiratory nitrate reductase 1 gamma chain	11.15
	<i>nirB</i>	Nitrite reductase, large subunit, NAD(P)H-binding	17.43
	<i>nirD</i>	Nitrite reductase (NAD(P)H) subunit	20.94
	<i>pykF</i>	Pyruvate kinase 1	15.72
Surface and virulence functions	<i>kpsC</i>	Capsule polysaccharide export protein KpsC	13.53
	<i>kpsM</i>	Polysialic acid transport protein KpsM	14.68
	<i>kpsS</i>	Polysialic acid capsule synthesis protein KpsS	12.56
	<i>kpsT</i>	Polysialic acid transport ATP-binding protein KpsT	16.01
	<i>neuA</i>	Acylneuraminate cytidyltransferase	50.32
	<i>neuB</i>	Sialic acid synthase NeuB	24.04
	<i>neuC</i>	Polysialic acid biosynthesis protein	45.91
	<i>neuD</i>	Sialic acid synthase NeuD	32.51
	<i>neuS</i>	Poly-alpha-2,8 sialosyl sialyltransferase NeuS	42.5
	<i>nmpC</i>	NmpC precursor	41.75
	<i>ompF</i>	OmpF	38.29
<i>ompN</i>	Outer membrane protein N precursor	34.26	

None of the birds showed any signs of illness. Tissue samples from a proportion of the birds from both the unvaccinated birds and those which had been vaccinated with the bacterin prepared from NB remained infected while the birds vaccinated with the bacterin cultured in the synthetic SMM-1 medium had cleared the challenge bacteria from their tissues almost by day 4 post-challenge.

A comparison of the number of samples from which the challenge strain was isolated revealed a statistically significant difference between control unvaccinated and the NB vaccine group ($\chi^2 = 3.75, p = 0.05$), and between the control and synthetic medium group ($\chi^2 = 8.45, p = <0.01$) but no statistically significant difference between the nutrient both and synthetic medium groups ($\chi^2 = 1.01, p = 0.4$). The differences were more marked for the blood and spleen samples than for the bacterial counts in the liver. Compared with the control group the level of significance for the synthetic medium group was higher than for the NB bacterin group.

Discussion

Vaccination is more desirable than chemotherapy to control APEC. Early protection mediated by high

titre circulating specific antibodies may be important as indicated by the protection against parenteral avian *Salmonella* infections using the commercial Salenvac vaccine which stimulates high titer antibodies (Woodward *et al.*, 2002). That high titer antibody correlates to some extent with protection is indicated by the fact that passively transferred antibody may protect against challenge with the homologous strain (Arp, 1980; Bolin and Jensen, 1987; Kariyawasam *et al.*, 2004).

The ultimate purpose of this analysis was to develop a synthetic medium reproducing these conditions as near as possible. For this reason, a full analysis of gene expression was not carried out by COGs gene classes. They were grouped according to genes likely to affect intracellular survival, response to stress, and virulence gene expression.

Our microarray studies here were designed to identify genes likely to affect intra-cellular survival, response to stress, and virulence gene expression. Although detailed analyses of gene expression were not carried out it was clear that the experiments showed that *E. coli* O78:K80 when established within avian macrophages, show patterns of physiology that are different from growth in

Table 3. The effect of vaccination with bacterins produced by culture in NB or SMM-1 on the numbers of *E. coli* F135 in the tissues of chickens challenged intravenously. Log₁₀ (\pm SD) of *E. coli* F135 in the blood, liver or spleen together with the number of chickens in each group from which the challenge strain was isolated.

Day	Medium	Synthetic			NB			Control		
		Blood	Spleen	Liver	Blood	Spleen	Liver	Blood	Spleen	Liver
Day 1	Mean	0.93 \pm 1.92	0.84 \pm 1.70	3.29 \pm 0.31	0.94 \pm 1.93	1.49 \pm 1.08	2.97 \pm 0.99	1.27 \pm 1.66	1.93 \pm 1.10	3.53 \pm 0.55
	No. +ves	1 of 5	1 of 5	5 of 5	1 of 5	3 of 5	5 of 5	2 of 5	4 of 5	5 of 5
Day 2	Mean	<1 \pm 0.00	<1 \pm 0.00	1.9 \pm 0.69	1.08 \pm 2.23	1.16 \pm 1.84	2.15 \pm 1.70	1.01 \pm 1.88	0.9 \pm 1.16	2.56 \pm 1.04
	No. +ves	0 of 5	0 of 5	5 of 5	1 of 5	2 of 5	4 of 5	2 of 5	2 of 5	5 of 5
Day 4	Mean	<1 \pm 0.00	<1 \pm 0.00	<1 \pm 0.00	<1 \pm 0.00	<1 \pm 0.00	0.58 \pm 0.72	0.88 \pm 1.79	0.69 \pm 1.36	0.78 \pm 1.56
	No. +ves	0 of 5	0 of 5	0 of 5	0 of 5	0 of 5	2 of 5	1 of 5	1 of 5	1 of 5
Day 7	Mean	<1 \pm 0.00	<1 \pm 0.00	<1 \pm 0.00	<1 \pm 0.00	0.32 \pm 0.70	0.27 \pm 0.54	0.22 \pm 0.40	1.08 \pm 1.50	0.37 \pm 0.85
	No. +ves	0 of 10	0 of 10	0 of 10	0 of 10	1 of 10	1 of 10	1 of 10	4 of 10	1 of 10
Total +ve/organ		1 of 25	1 of 25	10 of 25	2 of 25	6 of 25	10 of 25	6 of 25	11 of 25	12 of 25
TOTAL +ve		12 of 75			18 of 75			29 of 75		

liquid RPMI medium. These changes include a trend toward respiration with oxygen as a terminal electron acceptor indicating that oxygen was available as the preferred electron acceptor. There were indications from individual genes (*gntR*, *gmd*, *glcC*, *ylcL*, and *dcuB*) that different carbohydrates (gluconate, mannose, glycolate, xylan, and dicarboxylate acids, respectively) may have been used but the picture was not clear from the small number of genes involved in each case.

Osmotic stress was indicated by the expression of *osmY* and *osmC* (Yim and Villarejo, 1992) and the *proU* operon encoding a transport system for glycine, betaine, and proline, two osmo-protectant compounds (Haardt *et al.*, 1995). In the absence of solid information on the importance of amino acids to *E. coli* within the macrophage, information was taken from the literature and from Imre *et al.* (2013) to develop SMM-1. Manganese was omitted and iron availability was restricted by the addition of 2, -2-dipyridyl. Osmolarity was adjusted with K⁺ and Na⁺ to a water activity less than that in RPMI.

The SMM-1 medium clearly did not reflect all of the conditions within the macrophage. This was an approximation since the major carbon sources were unclear and we modeled this to include a reduction in glucose availability. Further studies could evaluate this in more detail and include incubation at a temperature closer to that of birds (41.5°C) which could also lead to even better immunogenicity and protection.

The bacterin produced by culture in the synthetic medium produced a level of protection above the control which was more statistically significant than the bacterin produced by culture in NB. We propose that such an approach may be used for several bacterial pathogens for which inactivated vaccines are still produced regularly and this approach merits further investigation.

Funding

The corresponding author would like to acknowledge the financial support of the Lower Saxony Federal Government (SLP137) and of a Biotechnology and Biological Sciences Research Council (BBSRC), UK China Partnership Award (CPA 1497) to Barrow.

Conflict of interest

The authors have no conflict of interest associated with this work.

Authors contribution

All authors consented to participation in the work and its publication. Barrow and Windhorst conceived the study and Barrow and Elazomi wrote and edited the manuscript. The work was carried out by Zhou, Imre, Bukovinski and Ruggeri (microarray work), Richards (vaccine development) and Barrow (animal work).

References

Arp, L.H. 1980. Consequences of active or passive immunization of turkeys against *Escherichia coli* O78. Avian Dis. 24, 808–815.

- Barrow, P.A. and Lovell, M.A. 1989. Invasion of Vero cells by the *Salmonella* genus. *J. Med. Microbiol.* 28, 59–67.
- Barrow, P.A., Lovell, M.A. and Berchieri, A. Jr. 1998. Use of lytic bacteriophage for control of experimental *Escherichia coli* septicaemia and meningitis in chickens and calves. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 5, 294–298.
- Beug, H., von Kirchbach, A., Doderlein, G., Conscience, J.F. and Graf, T. 1979. Chicken hematopoietic cells transformed by seven strains of defective avian leukemia viruses display three distinct phenotypes of differentiation. *Cell* 18, 375–390.
- Bolin, C.A. and Jensen, A.E. 1987. Passive immunization with antibodies against iron-regulated outer membrane proteins protects turkeys from *Escherichia coli* septicemia. *Infect. Immun.* 55, 1239–1242.
- Dahan, S., Knutton, S., Shaw, R.K., Crepin, V.F., Dougan, G. and Frankel, G. 2004. Transcriptome of Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157 adhering to eukaryotic plasma membranes. *Infect. Immun.* 72, 5452–5459.
- Dhawi, A.A., Elazomi, A., Jones, M., Lovell, M.A., Li, H., Emes, R.D. and Barrow, P.A. 2011. Adaptation to the chicken intestine in *Salmonella* Enteritidis PT4 studied by transcriptional analysis. *Vet. Microbiol.* 153, 198–204.
- Dho-Moulin, M. and Fairbrother, J.M. 1999. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Vet. Res.* 30, 299–316.
- Dziva, F., Hauser, H., Connor, T.R., van Diemen, P.M., Prescott, G., Langridge, G.C., Eckert, S., Chaudhuri, R.R., Ewers, C., Mellata, M., Mukhopadhyay, S., Curtiss II, R., Dougan, G., Wieler, L.W., Thomson, N.R., Pickard, D.J. and Stevens, M.P. 2013. Sequencing and functional annotation of avian pathogenic *Escherichia coli* serogroup O78 strains reveal the evolution of *E. coli* lineages pathogenic for poultry via distinct mechanisms. *Infect. Immun.* 81, 838–849.
- Dziva, F. and Stevens, M.P. 2008. Colibacillosis in poultry: unravelling the molecular basis of virulence of avian pathogenic *Escherichia coli* in their natural hosts. *Avian Pathol.* 37, 355–366.
- Eriksson, S., Lucchini, S., Thompson, A., Rhen, M. and Hinton, J.C. 2003. Unravelling the biology of macrophage infection by gene expression profiling of intracellular *Salmonella enterica*. *Mol. Microbiol.* 47, 103–118.
- Gyles, C.L. and Fairbrother, J.M. 2010 *Escherichia coli*. In: Pathogenesis of bacterial infections in animals. Eds., Gyles, C.L., Prescott, J.F., Songer, J.G. and Thoen, C.O. Ames, IO: Wiley-Blackwell, pp: 267–308.
- Haardt, M., Kempf, B., Faatz, E. and Bremer, E. 1995. The osmoprotectant proline betaine is a major substrate for the binding-protein-dependent transport system ProU of *Escherichia coli* K-12. *Mol. Gen. Genetics* 246, 783–786.
- Harvey, P.C., Watson, M., Hulme, S., Jones, M.A., Lovell, M.A., Berchieri, A. Jr., Young, J., Bumstead, N. and Barrow, P.A. 2011. *Salmonella enterica* serovar typhimurium colonizing the lumen of the chicken intestine grows slowly and upregulates a unique set of virulence and metabolism genes. *Infect. Immun.* 79, 4105–4121.
- Hautefort, I., Thompson, A., Eriksson-Ygberg, S., Parker, M. L., Lucchini, S., Danino, V., Bongaerts, R.J., Ahmad, N., Rhen, M. and Hinton, J.C. 2008. During infection of epithelial cells *Salmonella enterica* serovar typhimurium undergoes a time-dependent transcriptional adaptation that results in simultaneous expression of three type 3 secretion systems. *Cell. Microbiol.* 10, 958–984.
- Imre, A., Bukovinski, A., Lovell, M.A., Li, H., Zhou, X. and Barrow, P.A. 2013. Gene expression analysis of *Salmonella enterica* SPI in macrophages indicates differences between serovars that induce systemic disease from those normally causing enteritis. *Vet. Microbiol.* 167, 675–679.
- Johnson, T.J., Kariyawasam, S., Wannemuehler, Y., Mangiamele, P., Johnson, S.J., Doetkott, C., Skyberg, J.A., Lynne, A.M., Johnson, J.R. and Nolan, L.K. 2007. The genome sequence of avian pathogenic *Escherichia coli* strain O1:K1:H7 shares strong similarities with human extraintestinal pathogenic *E. coli* genomes. *J. Bacteriol.* 189, 3228–3236.
- Kariyawasam, S., Wilkie, B.N. and Gyles, C.L. 2004. Resistance of broiler chickens to *Escherichia coli* respiratory tract infection induced by passively transferred egg-yolk antibodies. *Vet. Microbiol.* 98, 273–284.
- Mangiamele, P., Nicholson, B., Wannemuehler, Y., Seemann, T., Logue, C.M., Li, G., Tivendale, K.A. and Nolan, L.K. 2013. Complete genome sequence of the avian pathogenic *Escherichia coli* strain APEC O78. *Genome Announc.* 1(2), e0002613; doi: 10.1128/genomeA.00026-13
- Miles, A.A., Misra, S.S. and Irwin, J.O. 1938. The estimation of the bactericidal power of the blood. *J. Hygiene (Lond)* 38, 732–749.
- Nolan, L.K., Barnes, H.J., Vaillancourt, J.P., Abdul-Aziz, T. and Logue, C.M. 2013. Colibacillosis. In: Diseases of poultry. Ed. Swayne, D.E. 13th ed. Ames, IO: Wiley-Blackwell. pp: 751–805.
- Núñez, M.F., Pellicer, M.T., Badía, J., Aguilar, J. and Baldomà, L. 2001. The gene yghK linked to the glc operon of *Escherichia coli* encodes a permease for glycolate that is structurally and functionally similar to L-lactate permease. *Microbiology* 147, 1069–1077.

- Pellicer, M.T., Fernandez, C., Badía, J., Aguilar, J., Lin, E.C. and Baldom, L. 1999. Cross-induction of *glc* and *ace* operons of *Escherichia coli* attributable to pathway intersection. Characterization of the *glc* promoter. *J. Biol. Chem.* 274, 1745–1752.
- Picault, J.P., Giraud, P., Drouin, P., Guittet, M., Bennejean, G., Lamande, J., Toquin, D. and Gueguen, C. 1987. Isolation of a TRTV-like virus from chickens with swollen-head syndrome. *Vet. Rec.* 121, 35.
- Rathman, M., Sjaastad, M.D. and Falkow, S. 1996. Acidification of phagosomes containing *Salmonella typhimurium* in murine macrophages. *Infect. Immun.* 64, 2765–2773.
- Richmond, C.S., Glasner, J.D., Mau, R., Jin, H. and Blattner, F.R. 1999. Genome-wide expression profiling in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Res.* 27, 3821–3835.
- Smith, H.W., Cook, J.K.A. and Parsell, Z.E. 1985. The experimental infection of chickens with mixtures of infectious bronchitis virus and *Escherichia coli*. *J. Gen. Virol.* 66, 777–786.
- Turner, A.K., Barber, L.Z., Wigley, P., Muhammad, S., Jones, M.A., Lovell, M.A., Hulme, S. and Barrow, P.A. 2003. The contribution of proton-translocating proteins to the virulence of *Salmonella enterica* serovars typhimurium, *S. gallinarum* and *S. Dublin* in chickens and mice. *Infect. Immun.* 71, 3392–3401.
- Wang, X.M., Liao, X.P., Zhang, W.J., Jiang, H.X., Sun, J., Zhang, M.J. 2010. Prevalence of serogroups, virulence genotypes, antimicrobial resistance, and phylogenetic background of avian pathogenic *Escherichia coli* in south of China. *Foodborne Pathogens Dis.* 7, 1099–1106.
- Woodward, M.J., Gettinby, G., Breslin, M.F., Corkish, J.D. and Houghton, S. 2002. The efficacy of Salenvac, a *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* serotype Enteritidis iron-restricted bacterin vaccine, in laying chickens. *Avian Pathol.* 31, 383–392.
- Yim, H.H. and Villarejo, M. 1992. *osmY*, a new hyperosmotically inducible gene, encodes a periplasmic protein in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 174, 3637–3644.