

Université de Montréal

Potentiel de systèmes de culture bactériologique à la ferme et validation de la cytologie pour le diagnostic de l'endométrite chez la vache laitière en période post-partum

*Par*

Nicolas Barbeau Grégoire

Département de sciences cliniques

Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine vétérinaire  
en vue de l'obtention du grade de *Maîtrise ès sciences* (M. Sc.)  
en sciences vétérinaires, option sciences cliniques

Avril 2021

© Nicolas Barbeau Grégoire, 2021

Université de Montréal

Département de sciences cliniques, Faculté de médecine vétérinaire

---

*Ce mémoire intitulé*

**Potentiel de systèmes de culture bactériologique à la ferme et validation de la cytologie pour le diagnostic de l'endométrite chez la vache laitière en période post-partum**

*Présenté par*

**Nicolas Barbeau Grégoire**

*A été évalué par un jury composé des personnes suivantes*

**Marie-Ève Lambert**

Présidente-rapporteuse

**Jocelyn Dubuc**

Directeur de recherche

**Marjolaine Rousseau**

Codirectrice

**Alexandre Boyer**

Codirecteur

**Émile Bouchard**

Membre du jury

## Résumé

L'endométrite est une maladie affectant les performances en reproduction chez la vache laitière. Elle est définie par la présence d'inflammation excessive au niveau de l'utérus durant la période post-partum. Le traitement antibiotique sous forme d'infusion intra-utérine est l'une des approches curatives les plus utilisées et améliore les performances de reproduction subséquentes. Considérant les enjeux modernes en lien avec l'antibiorésistance et la réduction de l'utilisation d'antibiotiques en productions animales, il est justifiable de remettre en question l'utilisation d'une méthode diagnostique de l'endométrite basée uniquement sur la présence d'inflammation en vue de déterminer si un traitement antibiotique doit être utilisé. En ce sens, l'objectif principal de ce projet de recherche était de valider l'exactitude des résultats de milieux de culture bactériologique utilisés à la ferme (Tri-plate et Petrifilm) en se basant sur ceux obtenus en laboratoire diagnostique. Un objectif secondaire était de vérifier la concordance entre les résultats bactériens de laboratoire et ceux cytologiques. Pour ce faire, une étude observationnelle transversale a été réalisée au sein de deux troupeaux laitiers commerciaux faisant partie de la clientèle de la Clinique ambulatoire bovine de la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal. Un total de 189 vaches en période post-partum (30 à 43 jours de lactation) ont été enrôlées de façon systématique afin de recueillir 2 échantillons utérins à partir de cytobrosses lors d'un même examen. La première cytobrosse était utilisée pour inoculer directement le milieu de culture Tri-plate et ensuite être envoyée au laboratoire du Service diagnostique de la FMV de l'Université de Montréal pour culture bactérienne aérobie. La seconde cytobrosse était utilisée pour l'analyse cytologique (proportion de cellules polymorphonucléaires; PMNL), puis était diluée

dans 1 ml de solution saline pour inoculer le milieu Petrifilm. Après une période d'incubation de 24h, le décompte de colonies était fait pour chaque milieu de culture. À partir de ces données, les analyses statistiques ont été complétées dans le but d'optimiser la sommation de sensibilité et spécificité (Se+Sp) des deux milieux de culture en fonction des résultats du laboratoire de référence. Pour le milieu Tri-plate, le seuil de > 90 colonies a permis d'obtenir la Se+Sp maximale, soit 167,7. Pour le milieu Petrifilm, le seuil de >100 colonies a donné la Se+Sp maximale, soit 129. En ce qui concerne la concordance entre le diagnostic cytologique et bactériologique, les résultats de notre projet montrent que 64,3% des vaches positives au niveau cytologique (>6% PMNL) se sont avérées négatives à la culture bactérienne, démontrant un manque de concordance. En conclusion, les résultats de notre étude supportent la faisabilité et le potentiel de la culture bactérienne d'échantillons de l'endomètre à la ferme. Notre projet met également en évidence que l'utilisation d'un dépistage cytologique de l'endométrite afin d'utiliser un traitement antibiotique puisse causer un manque d'optimisation dans l'efficacité des traitements. Il semble donc pertinent que d'autres projets soient complétés afin d'approfondir le dépistage bactériologique de l'endométrite et d'analyser le potentiel diagnostique de celui-ci.

**Mots-clés** : Vache laitière, Endométrite, Diagnostic, Bactériologie, Cytologie.

## **Abstract**

Endometritis is a disease affecting reproductive performance in dairy cows. It is defined by the presence of excessive inflammation in the uterine body during the postpartum period. From a curative point of view, the use of antibiotic treatment in the form of intrauterine infusion is one of the most widely used methods which has a beneficial effect on subsequent reproductive performance in positive cases of endometritis. Considering the modern issues concerning the use of antibiotics in animal production, the use of a diagnostic method based on the presence of inflammation in order to administer antibiotic treatment is questionable. In that sense, the main objective of this research project was to validate the accuracy of the results of bacteriological culture medium used on the farm (Tri-plate and Petrifilm) based on the ones from diagnosis laboratory. A secondary objective was to verify the concordance between the bacterial and cytological results. To do this, a cross-sectional observational study was set up within two commercial dairy herds followed by the bovine outpatient clinic of the Faculty of Veterinary Medicine of the Université de Montréal. A total of 189 cows in the postpartum period (30 to 43 days in milk) were systematically enrolled in order to collect 2 uterine samples from cytobrush during the same examination. The first cytobrush was used to directly inoculate the Tri-plate medium and then be sent to the reference laboratory (Diagnostic service of the FVM of the Université de Montréal) for aerobic bacterial analysis. The second cytobrush was initially used to make a microscopic smear for cytological analysis (polymorphonuclear cell proportion (PMNL)) and subsequently diluted in 1 ml of saline to inoculate the Petrifilm medium. After an incubation period of 24 hours, the colony count was made for each culture medium. From these data,

statistical analyses were completed in order to optimize the summation of sensitivity and specificity (Se + Sp) of the two culture medium according to the results of the reference laboratory. For the Tri-plate medium, the cutoff of > 90 colonies resulted in the maximum Se + Sp, which was 167.7. For the Petrifilm medium, the threshold of >100 colonies gave the maximum Se + Sp, which was 129. Regarding the concordance between the cytological and bacterial diagnosis, the results of our project show that 64.3% of cows positive for cytological criteria (>6% PMNL) were found to be negative from a bacterial point of view. In conclusion, this study shows that Tri-plate and Petrifilm medium used on-farms were best to reproduce the results obtained by laboratory analysis using 90 and 100 colony threshold respectively. Our results also support a lack of agreement between cytological and bacterial diagnosis. It therefore seems relevant that other projects are completed in order to deepen the bacterial screening for endometritis and to analyze its diagnostic potential.

**Keywords** : Dairy cow, Endometritis, Diagnosis, Bacteriology, Cytology.

# Table des matières

Résumé.....	3
Abstract.....	5
Table des matières.....	7
Liste des tableaux.....	9
Liste des figures.....	10
Liste des sigles et abréviations.....	11
Remerciements.....	13
Chapitre 1 – Revue de littérature.....	15
1.1 Période post-partum chez la vache laitière.....	15
1.1.1 Processus d’involution utérine.....	15
1.1.2 Définition de l’endométrite.....	18
1.1.3 Prévalence de l’endométrite.....	21
1.1.4 Facteurs de risque.....	22
1.2 Effets négatifs de l’endométrite.....	25
1.3 Diagnostic de l’endométrite.....	27
1.3.1 Palpation et échographie transrectales.....	27
1.3.2 Évaluation du mucus vaginal.....	28
1.3.3 Analyse cytologique.....	30
1.3.4 Biopsie.....	32
1.3.5 Test d’estérase leucocytaire.....	33
1.3.6 Comparaison des méthodes diagnostiques.....	34
1.4 Traitement de l’endométrite.....	36

1.5 Évolution de la charge bactérienne de l’utérus post-partum.....	39
1.6 Culture bactériologique à la ferme .....	43
1.7 Objectifs et hypothèses.....	47
Chapitre 2 - Présentation de l’article .....	48
2.1 Abstract .....	50
2.2 Introduction.....	52
2.3 Materials and methods .....	54
2.2.1 Statistical analysis.....	57
2.4 Results .....	58
2.4.1 Petrifilm medium.....	59
2.4.2 Tri-plate medium.....	62
2.4.3 Diagnosis laboratory and PMNL count.....	62
2.5 Discussion .....	63
2.5.1 On-farm bacteriological mediums .....	63
2.5.2 Diagnosis laboratory and PMNL count results comparison.....	65
2.6 Conclusion .....	66
Chapitre 3 – Analyse biomoléculaire des cytokines pro-inflammatoires .....	68
Chapitre 4 - Discussion générale .....	74
Chapitre 5 - Conclusion générale .....	79
Références bibliographiques.....	80
Annexes .....	88
Annexe 1. Méthode de décompte de colonie sur Petrifilm.....	88
Annexe 2. Séquence des amorces utilisées pour la QPCR d’ARNm.....	89

## Liste des tableaux

Tableau 1. – Seuil optimal, sensibilité (Se) et spécificité (Sp) estimés pour chaque méthode diagnostique (adapté de Arango-Sabogal et al., 2019) .....	35
Tableau 2. – Diagnostic performance of Petrifilm on-farm culture medium based on different colony count thresholds in comparaison with reference laboratory (n=189).....	60
Tableau 3. – Diagnostic performance of Triplate on-farm culture medium based on different colony count thresholds in comparaison with reference laboratory (n=189).....	61
Tableau 4. – Contingent table for agreement between cytologic and bacterial (laboratory) diagnosis.....	63

## Liste des figures

Figure 1. – Évolution de la charge bactérienne durant la période post-partum chez la vache laitière (adapté de Prunner et coll., 2014) .....	17
Figure 2. – Évolution de la proportion de PMNL dans l'endomètre durant la période post-partum chez la vache laitière (adapté de Gilbert et coll., 2016).....	19
Figure 3. – Classification du mucus recueilli de la cavité vaginale avec Metrichick (adapté de Kawashima et coll., 2018) .....	29
Figure 4. – Frottis cytologique pour analyse du ratio de cellules polymorphonucléaires (carrés) versus le nombre de cellules épithéliales (cercles).....	31
Figure 5. – Liste des bactéries identifiées dans l'utérus bovin selon leur potentiel pathogénique (adapté de Carneiro et coll., 2016).....	39
Figure 6. – Colonies count distribution for the Petrifilm medium (n=189) .....	58
Figure 7. – Colonies count distribution for the Triplate medium (n=189).....	59
Figure 8. – Expression génique de TNF $\alpha$ en fonction de l'état inflammatoire .....	71
Figure 9. – Expression génique d'IL-8 en fonction de l'état inflammatoire.....	72
Figure 10. – Méthode de culture par épuisement utilisé au laboratoire de référence.....	77

## Liste des sigles et abréviations

AP : Apparent prevalence

*E.coli* : *Escherichia coli*

IL-8 : Interleukine 8

JEL/DIM : Jours en lactation (days in milk)

NPV : Negative predictive value

PGF2 $\alpha$  : Prostaglandine F2 alpha

PMNL : Compte de cellule polymorphonucléaire (polymorphonuclear cell count)

PPV : Positive predictive value

RPL-19 : Ribosomal Protein L-19

Se : Sensibilité (sensitivity)

Sp : Spécificité (specificity)

TNF- $\alpha$  : Tumor necrosis factor alpha

*T.pyogenes* : *Trueperella pyogenes*

VBLAB : Service diagnostique de la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal  
(veterinary bacteriology laboratory of the Université de Montréal)

*À ma belle Julie*

## Remerciements

Plusieurs personnes ont fait en sorte que mon parcours de maîtrise fut une expérience des plus enrichissante, autant d'un point de vue académique qu'humain :

Dans un premier temps, j'aimerais remercier ma compagne de vie Julie. Non seulement elle m'a accompagné d'un bout à l'autre de la province, elle a toujours été en mesure de m'encourager et de m'appuyer dans mes projets. Ton enthousiasme et ta spontanéité me font sentir vivant et je t'en remercie. Je t'aime profondément et je ferai tout en mon possible pour être l'homme que tu mérites à tes côtés.

Par la suite, j'aimerais remercier également Jean-Philippe Pelletier. Mon expérience de maîtrise n'aurait pas été la même sans toi. Ce fut un réel plaisir de travailler à tes côtés durant ces deux dernières années. J'aurais difficilement trouvé mieux comme partenaire pour nos longues discussions sur la route. Tes conseils en ce qui a trait à la restauration rapide (je ne cherche pas de problème donc aucun nom ne sera mentionné) m'ont également permis de profiter de chaque dollar investi dans ces repas décadents! Finalement, merci d'avoir partagé ton expérience et tes connaissances sur le terrain.

Un remerciement tout spécial est également de mise pour mon directeur de recherche Jocelyn Dubuc. Merci de m'avoir fait confiance et de m'avoir donné cette liberté durant mon programme. Malgré cette autonomie, tu as tout de même su balancer parfaitement l'encadrement et le soutien dont j'avais besoin pour bien progresser. Merci également d'avoir été indulgent avec mon horaire qui trop souvent s'est retrouvé très chargé. Tes aptitudes pédagogiques ainsi que ton approche d'analyse sont désormais des modèles pour moi que

j'espère intégrer dans ma vie professionnelle future. Au plaisir d'avoir la chance de travailler avec toi sur d'autres projets.

Merci à mon codirecteur Alexandre Boyer de m'avoir ouvert les connaissances sur un domaine qui m'était pratiquement inconnu. Ce fut une expérience très appréciée qui m'a permis d'avoir une vision plus globale des différentes sphères de la recherche.

Merci également à Marjolaine Rousseau et tout le comité-conseil pour leur support ainsi que leurs recommandations tout au long de ce projet de recherche.

Pour finir, je remercie également tous les organismes qui ont subventionné ce projet : le Fonds du centenaire FMV, le Réseau canadien sur la mammite bovine et la qualité du lait, le Fonds Novalait, le Fonds de recherche Zoetis et le Réseau québécois en reproduction.

# Chapitre 1 – Revue de littérature

## 1.1 Période post-partum chez la vache laitière

### 1.1.1 Processus d'involution utérine

Suite au vêlage, l'utérus de la vache doit passer à travers plusieurs étapes afin de revenir apte à supporter la gestation suivante. Ce processus consiste en l'involution utérine dont la durée est estimée à 40-50 jours en présence de conditions physiologiques normales (Sheldon et al.,2006). Parmi les étapes principales de ce processus, on note la diminution du volume de l'utérus, la régénération de l'endomètre, l'élimination de la charge bactérienne et le retour de l'activité ovarienne. L'initiation de ces étapes est enclenchée par l'évacuation du veau lors du vêlage et de ses membranes placentaires dans les heures qui suivent (Sheldon et al.,2008). Une partie significative de la perte de poids de l'utérus après le vêlage est causée par l'évacuation des tissus nécrosés de l'endomètre et des caroncules utérines sous la forme d'écoulements rougeâtres désignés lochies. Le col de l'utérus reste dilaté temporairement suite au vêlage, ce qui permet cette évacuation qui débute environ après 1 semaine post-partum pour se terminer généralement entre 15 à 23 jours post-partum (Wehrend et al.,2003; Sheldon,2004).

Durant l'involution utérine, il est normal d'observer la présence d'inflammation (Sheldon et al.,2014). Cette réaction est causée par la présence de cellules nécrosées de la couche épithéliale de l'endomètre (Chen et al.,2010). La libération du contenu de ces cellules cause l'initiation d'une cascade de réactions des cellules du stroma sous-jacent menant à la production de cytokines pro-inflammatoires et d'autres médiateurs chimiques (Jabbour et al.,2009). La

présence de ces molécules à l'intérieur des tissus vient amorcer la réaction inflammatoire locale, à savoir la vasodilatation des vaisseaux sanguins avoisinants ainsi que le recrutement de cellules immunitaires (neutrophiles, macrophages, lymphocytes, etc.) aux sites nécrosés (Jabbour et al.,2009). Cette réaction permet de favoriser l'élimination des tissus nécrosés et le contrôle de l'infection si présente. La production de modérateurs chimiques permet par la suite la diminution de l'inflammation et le retour vers un utérus normal (Sheldon et al.,2006; Sheldon et al.,2008). Au niveau de la régénération de l'endomètre, l'épithélium est généralement rétabli environ 25 jours suite au vêlage, mais il faudra quelques semaines supplémentaires avant le rétablissement complet de l'utérus (Mateus et al.,2002).

Pour ce qui est de la charge bactérienne, 80 à 100% des vaches laitières font face à une contamination bactérienne plus ou moins importante de l'utérus durant les deux premières semaines post-partum (Sheldon et al.,2006; Sheldon et al.,2008; Ballas et al.,2021). Durant cette période, des cycles de nettoyage et de contamination vont s'enchaîner pour éventuellement arriver à des conditions considérées stériles environ trois à quatre semaines après le vêlage (Figure 1).

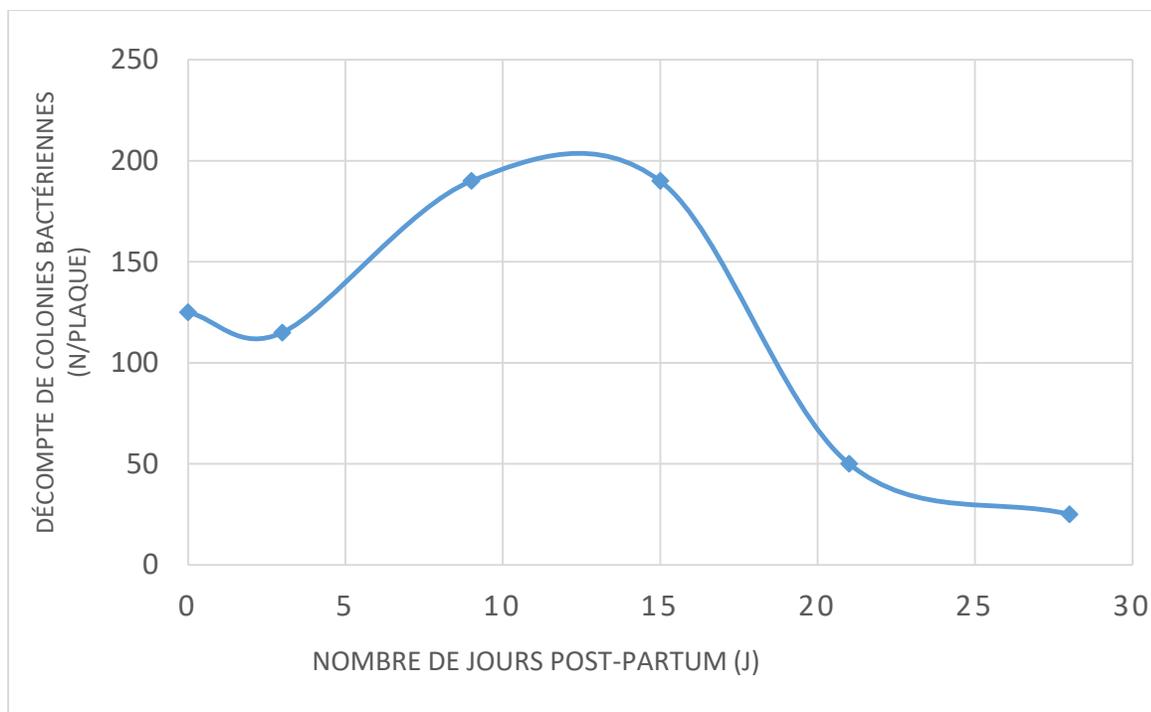


Figure 1. – Évolution de la charge bactérienne durant la période post-partum chez la vache laitière (adapté de Prunner et coll., 2014)

Finalement, la plupart des références convergent vers le fait que l'activité ovarienne s'amorce rapidement après le vêlage chez la vache laitière dans des conditions favorables (période de transition adéquate, alimentation bien équilibrée, bonne santé, etc.; Scully et coll., 2013). Effectivement, il est possible d'observer la production d'un premier follicule dominant entre 10 à 12 jours post-partum. Le retour de la cyclicité (ovulation) est quant à lui retrouvé normalement aux alentours de 21 jours post-partum (Sheldon et al., 2008).

La description du processus d'involution utérine se base sur les observations obtenues par plusieurs projets qui avaient pour objectif de décrire ce phénomène plutôt que d'établir les standards d'une évolution saine. Ainsi, la relation entre ces observations et les performances reproductives (nombre de jours ouverts, % de 1<sup>re</sup> saillie fécondante, etc.) n'a pas été évaluée

(Melendez et al.,2004). Par exemple, il a été mentionné que l'évacuation des tissus nécrosés se terminait environ 3 semaines après le vêlage. Or, l'influence d'une période plus ou moins courte d'évacuation des tissus sur le succès à la première saillie ou le nombre de jours ouverts reste à déterminer. Néanmoins, un élément intéressant à faire ressortir est la vitesse à laquelle l'activité ovarienne peut se réamorcer suite au vêlage. Ceci permet de mettre en évidence l'importance de compléter le plus rapidement possible l'involution utérine puisqu'elle constitue un facteur limitant à l'initiation et au maintien de la gestation suivante.

### 1.1.2 Définition de l'endométrite

Plusieurs problèmes médicaux peuvent allonger la période nécessaire à l'involution utérine. Parmi ceux-ci se trouve l'endométrite. L'endométrite se définit de façon générale comme étant la présence d'inflammation excessive localisée au niveau de l'endomètre après une certaine période de temps après le vêlage (LeBlanc et al.,2002; Sheldon et al.,2006). C'est un problème chronique qui affecte les fonctions reproductrices de la vache sans nécessairement influencer l'état de santé global de l'animal. Cette caractéristique peut être distinctive par rapport à un cas de métrite aiguë où l'animal présente généralement des signes systémiques (LeBlanc et al.,2002; Wagener et al.,2017).

Comme la présence d'inflammation est normale dans le processus d'involution utérine, on considère la situation problématique lorsque le niveau d'inflammation devient excessif et lorsque la période inflammatoire perdure, ralentissant par le même fait l'involution utérine (LeBlanc,2012). Pour déterminer à quel moment l'inflammation endométriale devient un problème significatif (ie. être considérée comme endométrite), on doit établir combien de temps après le vêlage et à quel niveau d'inflammation on observe un effet sur les performances

subséquentes en reproduction (risque de gestation, nombre de jours ouverts, % de 1<sup>res</sup> saillies fécondantes, etc.; Kasimanickam et coll., 2004). Encore récemment, aucun consensus quant aux critères et au moment optimal du diagnostic n'était encore établi, ce qui rend difficile la comparaison des articles portant sur le sujet. L'inflammation devrait diminuer avec le temps suite au vêlage (figure 2). De ce fait, une inflammation considérée excessive sera moindre à un examen plus tard comparativement à un examen tôt suite au vêlage. De plus, la variable de référence, soit la reproduction subséquente, est influencée par de multiples facteurs (environnement, alimentation, régie troupeau, etc.), dont plusieurs n'ont aucun lien avec la santé du système utérin (Formigoni et al.,2003; Rensis et al.,2003; Zebeli et al.,2015). Tous ces éléments doivent être tenus en considération lorsqu'on analyse les résultats d'études portant sur le sujet. Néanmoins, les études avec une analyse rapide suite au vêlage ont suggéré une période de 21 jours post-partum avant de permettre d'établir un diagnostic, ce qui concorde avec le retour estimé de conditions favorables à la gestation dans l'utérus (Gilbert et al.,2016).

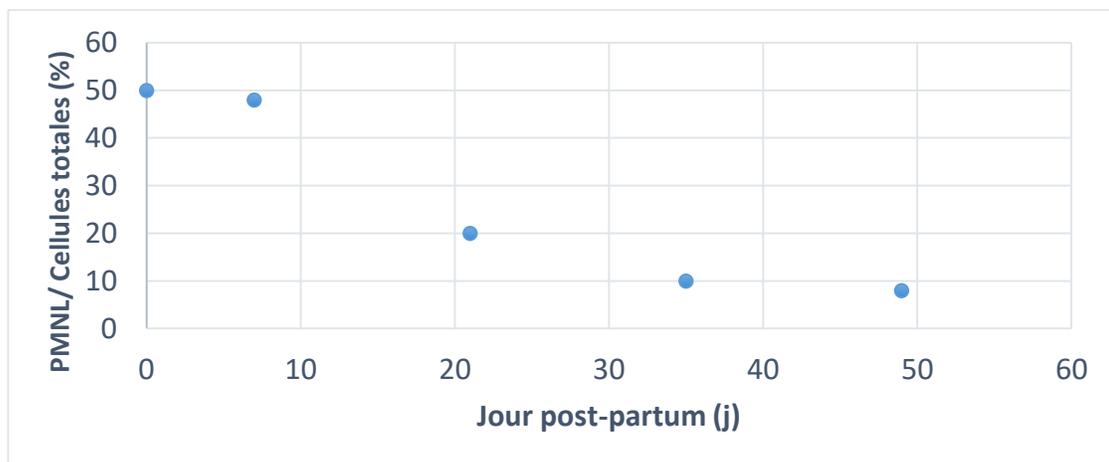


Figure 2. – Évolution de la proportion de PMNL dans l'endomètre durant la période post-partum chez la vache laitière (adapté de Gilbert et coll., 2016)

Il est important de considérer qu'à ce jour, la définition de l'endométrite a été fragmentée en sous-catégories selon la méthode d'analyse utilisée. Dans un premier temps, l'endométrite clinique se fait par un diagnostic établi à partir de l'évaluation du mucus dans la cavité vaginale (Dubuc et al.,2010). La proportion de pus à l'intérieur du mucus sert de critère diagnostique afin de classer les vaches avec ou sans endométrite clinique. En présence d'endométrite subclinique, le mucus vaginal possède une apparence normale et il est donc nécessaire d'identifier la présence d'inflammation excessive au niveau de l'endomètre (Wagener et al.,2017). Pour ce faire, une analyse cytologique évaluant la quantité de cellules polymorphonucléaires présentes au niveau de l'endomètre ou l'évaluation de la morphologie utérine par voie transrectale peuvent être réalisées. Même si cette classification semble simple, son application dans la littérature scientifique cause une certaine confusion. En effet, on constate qu'à peine plus de la moitié des études portant sur les maladies du système reproducteur chez la vache laitière possèdent une définition claire et précise de la maladie analysée. De plus, plusieurs études ne sont pas suffisamment détaillées afin de porter un jugement critique sur leur méthodologie ayant mené au diagnostic (De Boer et al.,2014). On remarque par exemple l'utilisation du terme endométrite subclinique sans avoir vérifié la présence de pus dans le mucus vaginal ou l'absence de référence quant au seuil critique utilisé. Considérant cette information et tenant en compte également de la quantité limitée d'études concernant l'endométrite chez la vache laitière, l'endométrite sera considérée comme un tout pour les sections qui suivent. La spécification sera utilisée lorsque nécessaire.

### 1.1.3 Prévalence de l'endométrite

La prévalence estimée de l'endométrite chez la vache laitière varie d'une étude à l'autre allant de 17 à 56 % des vaches enrôlées (Gilbert et al.,2005; Sheldon et al.,2009; Dubuc et al.,2010; Potter et al.,2010; Cheong et al.,2012; De Boer et al.,2014). Encore une fois, la comparaison de ces données peut être difficile considérant qu'elles ont été évaluées à des moments différents post-vêlage et par différentes méthodologies (outils diagnostiques). Une information beaucoup plus intéressante est la variation observée entre les différents troupeaux à l'intérieur d'une même étude. En effet, cela permet d'obtenir une comparaison entre les troupeaux ayant utilisé une même méthodologie. Dans ces situations, on peut constater que la prévalence d'endométrite dans les troupeaux laitiers varie de 4,8 à 52,6 % (Cheong et al.,2011) et selon d'autres auteurs de 37 à 74 % (Gilbert et al.,2005). Il est donc clair à partir de ces données que la prévalence de l'endométrite varie énormément entre les troupeaux. Cette information permet de supposer que l'environnement ainsi que les pratiques d'élevages sont des facteurs importants dans le développement de l'endométrite chez la vache.

Une autre étude basée sur l'analyse des troupeaux s'est intéressée aux facteurs de risque pouvant être reliés à de mauvaises performances en reproduction (Dubuc et al.,2017). Les résultats obtenus soutiennent que les troupeaux ayant plus de 18,8 % de vaches considérées positives à l'endométrite cytologique (définie par la présence de  $\geq 6$  % de cellules polymorphonucléaires lors de cytologie endométriale effectuée entre 30 et 43 jours post-partum) ont un risque plus élevé d'avoir un taux de succès à la première saillie considéré faible (moins de 40 %). En tenant compte des prévalences évaluées dans plusieurs autres études, il est juste de

considérer que l'endométrite est un problème qui peut affecter de façon significative les performances reproductives de plusieurs troupeaux laitiers.

#### 1.1.4 Facteurs de risque

Au niveau des facteurs de risque reliés à l'endométrite, on retrouve plusieurs facteurs liés aux complications au moment du vêlage : veau mort-né, dystocie, jumeaux, césarienne (Sheldon et al.,2008; Potter et al.,2010; Carneiro et al.,2016). Tous ces facteurs peuvent être des sources de contamination bactérienne ou de lésions à l'utérus et du même coup favoriser une infection secondaire. L'influence de la parité de la vache sur le risque d'endométrite n'est pas clairement déterminée. Alors que certaines études rapportent que les vaches primipares sont plus à risque de développer une endométrite, d'autres stipulent que les vaches multipares (3 parités ou plus) sont plus à risque (Potter et al.,2010; Cheong et al.,2011). La relation entre le nombre de parités et le risque d'endométrite peut également être confondue par le niveau de production laitière de la vache (Cheong et al.,2011). En effet, on remarque qu'une haute production laitière chez les vaches primipares semble augmenter le risque d'endométrite tandis qu'une haute production laitière chez les vaches multipares semble diminuer le risque d'endométrite. La rétention placentaire, soit une délivrance des membranes placentaires à plus de 12 à 24h du vêlage, représente également un facteur mis en évidence par les résultats de plusieurs recherches. En effet, un placenta retenu forme un milieu idéal pour favoriser la croissance bactérienne rétrograde de l'utérus, augmentant ainsi les chances d'endométrite (Potter et al.,2010; Carneiro et al.,2016).

Finalement, plusieurs études mettent en évidence le fait que le déséquilibre énergétique observé en fin de gestation et au début de lactation (période de transition) pourrait

être un facteur de risque important pour l'endométrite (Sheldon et al.,2008; Cheong et al.,2011; Carneiro et al.,2016; Wagener et al.,2017). Effectivement, on observe une baisse de la consommation volontaire de matière sèche (CVMS) par la vache durant les dernières semaines de la gestation, sans pour autant avoir une diminution des besoins énergétiques (Grummer,1995). Comme le pic de lactation arrive quelques semaines suite au vêlage et que la CVMS n'est généralement pas suffisamment élevée à ce stade afin de répondre à ce besoin énergétique supplémentaire, la vache se retrouve alors en balance énergétique négative. Afin de pallier à ce manque énergétique durant cette période, la vache doit alors mobiliser ses lipides corporels. La mobilisation des lipides se fait par la libération d'acides gras libres dans la circulation sanguine (Grummer et al.,2004). La présence d'une grande concentration sanguine d'acides gras libres causée par cette mobilisation lipidique fait en sorte que l'oxydation de ceux-ci au niveau du foie se fait partiellement. De ces réactions incomplètes résulte l'accumulation de corps cétoniques dans la circulation sanguine (Bertics et al.,1992). Plusieurs recherches ont démontré que les niveaux sanguins d'acides gras libres et de corps cétoniques peuvent affecter les capacités fonctionnelles des neutrophiles. En condition *in vitro*, la présence d'une concentration importante en corps cétoniques semble causer une diminution de la capacité phagocytaire ainsi que la production d'espèces oxydatives réactives par les neutrophiles. En ce qui a trait aux acides gras libres, les concentrations importantes durant le stade péripartum affectent également la capacité phagocytaire en plus d'influencer sur l'expression de certaines cytokines pro-inflammatoires des neutrophiles (Hammon et al.,2006; Alarcon et al.,2018). Ces résultats de recherche mettent en évidence l'importance de la période de transition pour la vache afin d'obtenir un début de lactation réussi et un système reproducteur sain. Réussir à bien contrôler

l'apport énergétique durant la période péripartum semble en fait un aspect prioritaire afin de prévenir des problèmes futurs en reproduction comme l'endométrite (Hammon et al.,2006; Zhou et al.,2015; Alarcon et al.,2018).

Une étude a complété l'analyse des facteurs de risque à l'échelle troupeau (38 troupeaux analysés) et les facteurs type de litière dans le parc de vêlage et le type de logement des vaches fraîches étaient significativement liés au taux de prévalence d'endométrite dans le troupeau (Cheong et al.,2011). Selon leurs données, l'utilisation de paille comme litière dans les parcs de vêlage serait un facteur protecteur par rapport aux autres litières communes (sable, ripe, etc.). De plus, les vaches fraîchement vêlées seraient moins à risque de développer une endométrite si elles sont logées en stabulation libre plutôt qu'en parc de litière accumulée. Par contre, pour le facteur type de logement, il est important de mentionner que seulement 4 fermes possédaient un logement de type litière accumulée. De plus, considérant que cette étude était de type observationnel, il est difficile d'attribuer un effet de causalité direct aux facteurs statistiquement significatifs puisque le nombre total de troupeaux reste limité. Cet aspect mériterait une plus grande investigation dans le futur.

Malgré qu'on remarque une grande différence dans la prévalence de l'endométrite entre les troupeaux laitiers, il est surprenant de constater que très peu de recherches aient tenté d'en identifier les raisons. Une des explications de ce phénomène qui pourraient être en cause serait la difficulté d'enrôler un nombre suffisant de troupeaux à l'intérieur d'une étude dont l'unité d'intérêt est le troupeau afin d'obtenir une puissance statistique suffisante.

En bref, l'endométrite est une inflammation chronique et localisée de l'utérus qui peut causer un ralentissement du processus d'involution utérine. La prévalence d'endométrite varie de façon importante d'un troupeau à l'autre. Les facteurs de risque majeurs rapportés pour cette maladie sont reliés à des problèmes au moment du vêlage, un débalancement énergétique en début de lactation et à la parité de l'animal. Certaines pistes portent à croire que le type de logement et de litière utilisés peut également influencer la prévalence d'endométrite dans un troupeau. La prévalence estimée de l'endométrite à l'intérieur de plusieurs troupeaux étudiés suggère que l'endométrite est un problème d'importance ayant un réel impact négatif sur les performances reproductives. De ce fait, il devient nécessaire d'établir les effets de l'endométrite sur les vaches affectées.

## **1.2 Effets négatifs de l'endométrite**

Jusqu'à maintenant, il a uniquement été question dans ce texte du fait que l'endométrite soit un problème présent dans plusieurs troupeaux laitiers commerciaux et que sa prévalence d'un à l'autre soit très variable. À partir de cette information, il devient également nécessaire d'avoir une idée des impacts que peut avoir la présence de l'endométrite sur les performances d'un troupeau laitier bovin.

Étant une maladie localisée à l'utérus, les effets négatifs de l'endométrite touchent principalement les fonctions reproductrices subséquentes de la vache. L'endométrite est définie par la présence d'inflammation excessive des tissus de l'utérus (LeBlanc,2008). De ce fait, elle cause initialement un ralentissement de l'involution utérine (Sheldon et al.,2009). Ce ralentissement aura un impact sur les performances en reproduction de la vache. En effet, on

remarque une augmentation de la période de jours ouverts chez les vaches diagnostiquées positives à l'endométrite. Certaines études ont quantifié cette augmentation de 25 à 32 jours ouverts supplémentaires (Barlund et al.,2008; Carneiro et al.,2016). La présence d'inflammation semble également être un facteur nuisible au développement de l'embryon (Sheldon et al.,2006). En effet, l'endomètre permet l'attachement ainsi que les échanges entre l'embryon et la circulation sanguine de la mère (Sheldon et al.,2008). L'inflammation excessive des couches tissulaires de l'endomètre pourrait alors nuire au bon fonctionnement de l'interaction entre l'embryon et la mère. Cet élément pourrait également expliquer pourquoi une augmentation du nombre de saillies par conception ainsi qu'une diminution des chances d'avoir une première saillie fécondante sont observées chez les vaches positives à l'endométrite (Barlund et al.,2008). Considérant que la reproduction est un facteur essentiel à la production laitière, la présence d'une prévalence importante d'endométrite à l'intérieur d'un troupeau pourrait représenter un problème important pour celui-ci qui ne devrait pas être négligé. Dans cet ordre d'idée, une étude avait pour objectif de déterminer le seuil critique à partir duquel le niveau de prévalence de l'endométrite à l'intérieur d'un troupeau avait un effet négatif sur le succès à la première saillie (Dubuc et al.,2017). Les résultats obtenus supportent qu'à partir de 19 % de prévalence d'endométrite cytologique à l'intérieur d'un troupeau, il est plus probable que son succès à la première saillie soit faible (moins de 40 %). Pour les méthodes diagnostiques par test d'estérase leucocytaire et analyse du mucus vaginal, ce seuil critique était de 35 % et 5 %, respectivement. En considérant ces résultats et les observations de prévalence d'endométrite recensées par les divers travaux de recherche, on peut conclure que l'endométrite est un problème pouvant affecter de façon significative les performances en reproduction dans plusieurs troupeaux laitiers

commerciaux. Il devient alors primordial d'avoir les outils nécessaires afin de détecter les vaches affectées.

### **1.3 Diagnostic de l'endométrite**

À ce jour, le dépistage de l'endométrite et le développement de tests diagnostiques pour celle-ci se font sans véritable test de référence (De Boer et al.,2014). Comme expliqué précédemment, la majorité des recherches évaluent la performance d'un test à sa capacité de prévoir les performances en reproduction d'un animal à un moment futur dans le cycle de production. Dans cette section, les différentes méthodes diagnostiques seront décrites ainsi que leurs performances. Par la suite, les performances de ces tests seront comparées entre elles. Les méthodes présentées qui suivent représentent les diverses techniques utilisées à ce jour pour diagnostiquer l'endométrite, toutes sous-catégories confondues.

#### **1.3.1 Palpation et échographie transrectales**

La palpation transrectale ainsi que l'échographie transrectale sont deux méthodes permettant d'évaluer certaines caractéristiques morphologiques de l'utérus. Par palpation transrectale, les caractéristiques de l'utérus sont évaluées manuellement par un observateur (LeBlanc et al.,2002). Cette technique possède de grandes limites considérant la subjectivité des résultats et la précision de ceux-ci. Au niveau des performances diagnostiques, une étude a révélé que l'observation d'un col utérin de plus de 7,5 cm entre 27 à 33 jours post-partum est le seul critère relié à la palpation transrectale ayant un effet négatif sur le risque de gestation (LeBlanc et al.,2002). L'échographie transrectale permet quant à elle d'obtenir des images à l'aide d'ondes sonores non seulement de la paroi utérine, mais également de la quantité de fluide présente dans

la lumière utérine (Kasimanickam et al.,2004; Barlund et al.,2008). L'échographie permet d'avoir des valeurs plus objectives et du même fait plus facilement répétables entre chaque observateur. L'association entre les facteurs évalués et le diagnostic d'endométrite reste cependant non constante entre les études (Mateus et al.,2002; Barlund et al.,2008). De plus, il est difficile de confirmer que le fluide observé durant l'échographie soit relié à la présence d'inflammation.

Dans les deux cas, les résultats de ces deux techniques ont montré une capacité prédictive des performances subséquentes en reproduction inférieure par rapport à d'autres tests utilisés tel que la cytologie endométriale (Barlund et coll., 2008). Si la palpation transrectale a été délaissée en pratique depuis plusieurs années pour le diagnostic de l'endométrite, le perfectionnement de l'imagerie par échographie reste pour certains chercheurs une possibilité intéressante.

### 1.3.2 Évaluation du mucus vaginal

Une seconde méthode de diagnostic consiste à analyser la composition du mucus retrouvé dans la cavité vaginale. Pour ce faire, il est possible d'utiliser un vaginoscope afin d'observer directement l'intérieur de la cavité vaginale, le col ainsi que le mucus qui s'y retrouve. Un échantillon peut être prélevé à l'aide d'une main gantée ou d'un outil appelé Metricheck (Simcro Tech Ltd, Hamilton, Nouvelle Zélande) inséré à l'intérieur de la cavité vaginale. Dans les deux cas, l'observateur est en mesure de prélever un échantillon du mucus afin d'en faire l'appréciation qualitative. Le mucus est catégorisé selon l'importance de la présence de matériel purulent à l'intérieur de celui-ci (figure 3).

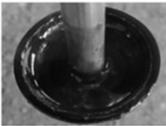
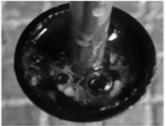
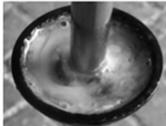
Score	Caractéristique	Photo typique
1	Mucus clair ou translucide	
2	Mucus avec présence de pus blanchâtre	
3	Présence de moins de 50% de matériel purulent	
4	Présence de plus de 50% de matériel purulent	
5	Score 4 avec odeur	

Figure 3. – Classification du mucus recueilli de la cavité vaginale avec Metricheck (adapté de Kawashima et coll., 2018)

Les résultats d'études sur la capacité prédictive de l'évaluation du mucus vaginal ont donné des résultats significativement positifs (McDougall et al., 2007). Effectivement, la présence d'un mucus de score mucopurulent (score  $\geq 3$ ) à environ 25 jours post-partum ou plus est associée à une augmentation du nombre de jours moyen avant d'être gestante (LeBlanc et al., 2002). Cependant, il est possible de surestimer le nombre de cas d'endométrite diagnostiqué si la présence de matériel purulent dans la cavité vaginale ne provient pas de l'utérus. Une étude s'est intéressée à cet aspect et sur les 230 vaches enrôlées considérées positives à l'endométrite clinique, 17 % se sont avérées négatives en considérant les facteurs cytologiques et bactériologiques (Westermann et al., 2010). Les résultats faux-positifs peuvent mener à l'utilisation de traitements antibiotiques non nécessaires et du même coup représenter des frais excédentaires pour l'entreprise laitière. Toutefois, la présence de pus indique probablement la

présence d'un autre problème infectieux pouvant être initié par une lésion à l'intérieur même de la cavité vaginale ou un problème centré au col utérin et non à l'endomètre (Dubuc et al.,2010). Il serait alors plus judicieux de parler ici d'un manque d'optimisation du traitement causé par un diagnostic insuffisamment précis. Ces réalisations ont mené à des suggestions quant à la modification de la désignation de l'endométrite clinique. En effet, il a été proposé que l'endométrite clinique soit désormais considérée plutôt comme la présence d'écoulement vaginal purulent. Dans le même ordre d'idée, des chercheurs proposent également que l'endométrite subclinique soit plutôt considérée comme l'endométrite cytologique. Cette nomenclature vient solutionner le problème lié avec l'utilisation du terme subclinique. En se basant sur cette nomenclature, une vache pourrait avoir la présence d'écoulement vaginal purulent, une endométrite cytologique ou les deux de façon simultanée (Dubuc et al.,2010).

### 1.3.3 Analyse cytologique

Au niveau histologique, l'inflammation dans les tissus utérins peut être reconnue par la présence de neutrophiles à l'intérieur de ceux-ci (Singh et al.,2008). Il est donc également possible de diagnostiquer l'endométrite en recueillant un échantillon cytologique de l'endomètre (Barlund et al.,2008). Dans ce cas, deux méthodes peuvent être utilisées (Kasimanickam et al.,2005). Tout d'abord, une cytobrosse montée au bout d'une tige métallique protégée par une double gaine peut être introduite à l'intérieur du col. Une fois à l'intérieur de l'utérus, la brosse est exposée à la paroi de l'utérus et une rotation de celle-ci est complétée afin d'échantillonner l'endomètre. On peut également utiliser un système de seringues et de tubes d'infusion afin d'injecter de la solution saline stérile dans la lumière utérine. Un massage du corps utérin par palpation transrectale permet l'exfoliation de cellules de l'endomètre dans la solution saline. La solution

contenant les cellules endométriales exfoliées est ensuite aspirée et constitue l'échantillon. À partir de ces deux méthodes de prélèvement, il est possible d'analyser la proportion de cellules polymorphonucléaires en rapport avec le nombre de cellules épithéliales utérines, ce qui nous informe sur l'importance de l'inflammation présent dans l'endomètre au moment du prélèvement (Kasimanickam et al.,2004; Barlund et al.,2008). Dans l'exemple présenté à la figure 4, on obtient une proportion de 55% de cellules polymorphonucléaires.

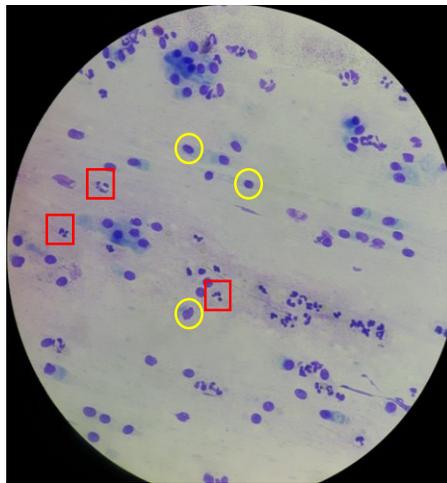


Figure 4. – Frottis cytologique pour analyse du ratio de cellules polymorphonucléaires (carrés) versus le nombre de cellules épithéliales (cercles)

Pour la cytobrosse, la brosse extraite est utilisée afin de faire un frottis sur une lame microscopique. Celle-ci est finalement fixée et colorée. Au niveau de l'échantillon liquide, une étape supplémentaire de centrifugation permet d'obtenir un dépôt sédimenté qui peut être utilisé de la même façon que celui obtenu par cytobrosse pour produire une lame microscopique. À noter que même si les deux techniques fournissent des résultats prédictifs relativement comparables, l'utilisation de la cytobrosse demeure plus répandue (Kasimanickam et al.,2005) pour plusieurs raisons. Dans un premier temps, il a été rapporté qu'il peut parfois être difficile

avec la technique de lavage utérin de récolter la solution finale. En effet, une étude a observé ce problème chez 17 % des vaches échantillonnées (Barlund et al.,2008). De plus, on remarque également un temps de procédure plus long par unité d'échantillonnage, un risque plus élevé d'abrasion au niveau de l'endomètre ainsi qu'une qualité de frottis cellulaire plus médiocre comparativement à l'utilisation de la cytobrosse (Kasimanickam et al.,2005; Barlund et al.,2008). Dans les deux cas, la nécessité d'utiliser un ensemble de coloration des lames et un microscope afin de compléter l'analyse cytologique des échantillons limite leur utilisation quotidienne sur les fermes. De plus, le fait d'avoir à compléter l'analyse après la visite sur la ferme et de reprendre contact avec le producteur afin de lui faire parvenir les résultats sont des éléments qui limitent encore une fois l'application de cette technique en contexte de ferme. Dans le but de permettre au producteur de prendre action le plus rapidement possible, il est favorable d'être en mesure d'obtenir un résultat en direct au moment de la procédure.

#### 1.3.4 Biopsie

L'utilisation d'une biopsie de l'endomètre pour évaluer l'inflammation dans l'endomètre par histopathologie est considérée par certains spécialistes comme étant la référence en termes de test diagnostique (Bonnnett et al.,1991). Cette méthode n'a cependant jamais été appliquée en élevage étant donné son coût et le temps exigé pour collecter un échantillon. De plus, le processus étant invasif est considéré comme risqué pour les performances futures de reproduction de l'animal (Sheldon et al.,2006). Plus récemment, des recherches ont également mis en doute la validité des échantillons récoltés par biopsie. Ces chercheurs supportent l'hypothèse que la proportion en cellules polymorphonucléaires dans les tissus profonds de l'endomètre varie durant les phases du cycle œstral de la vache (Madoz et al.,2014). Cette variation, qui n'aurait

aucune association avec l'état pathologique de l'utérus, ne semble pas observée avec les échantillons collectés par cytobrosse (Wagener et al.,2017). Il est donc possible qu'un biais d'interprétation puisse être présent avec les prélèvements de biopsie dépendamment à quel moment dans le cycle œstral de la vache l'échantillon a été collecté.

### 1.3.5 Test d'estérase leucocytaire

Finalement, il est également possible de diagnostiquer l'endométrite à l'aide d'un test d'estérase leucocytaire. Effectivement, cette protéine est présente sur la membrane des cellules polymorphonucléaires. La détection d'une concentration élevée de ce composé à l'intérieur d'un échantillon peut alors servir d'indicateur de la quantité de neutrophiles présents (Couto et al.,2013; Denis-Robichaud et al.,2015). Pour réaliser ce test, l'échantillon endométrial obtenu par cytobrosse est dissout dans une solution saline. Par la suite, une bandelette réactive (Multistix 10 SG; Bayer Corporation, Elkart, IN, USA) est mise en contact avec la solution ainsi obtenue durant une période de 2 minutes après laquelle l'analyse colorimétrique peut être complétée. Comme la majorité des tests sur bandelette, l'intensification de la couleur de l'indicateur d'intérêt sur la bandelette évaluée selon l'échelle fournie par le test permet d'estimer la concentration de notre substance cible dans l'échantillon (Bayer Corporation, Elkart, IN, USA). L'avantage de cette analyse est que le temps de réponse de l'indicateur est rapide et qu'elle peut être complétée directement à la ferme sans trop de difficulté (Denis-Robichaud et al.,2015). Ces caractéristiques font en sorte que l'utilisation de cette technique diagnostique en suivi de troupeaux est plus pratique et réaliste.

### 1.3.6 Comparaison des méthodes diagnostiques

La comparaison des différentes techniques d'analyse relève les mêmes difficultés rencontrées que pour définir l'endométrite en soi. Selon le critère de reproduction évalué et le moment de l'examen diagnostique, le seuil critique établi avec une méthode d'analyse peut varier. Ayant des seuils critiques différents pour une même technique diagnostique, on observe donc des performances prédictives qui varient d'une étude à l'autre pour une même méthode d'analyse (Wagener et al.,2017). Dans l'objectif d'obtenir des données de comparaison satisfaisante, une étude a complété une analyse rétrospective en combinant les données collectées de deux études précédentes ayant des caractéristiques et des protocoles d'examen similaires (jour d'examen, méthodologie de collecte, vaches enrôlées, protocole de reproduction des fermes, etc.) (Arango-Sabogal et al.,2019). Cette combinaison a permis d'obtenir un groupe d'échantillonnage fusionné d'une taille considérable (n=2092) permettant de faire une analyse statistique complexe basée sur une approche bayésienne. La cytologie endométriale, le test d'estérase leucocytaire ainsi que la présence d'écoulement vaginal purulent (Metricheck) furent les trois méthodes diagnostiques analysées. L'objectif principal était d'établir le meilleur seuil critique de ces trois techniques pour prédire l'état de santé de l'utérus au moment de l'examen. Cette analyse ne se concentre donc pas sur la détection d'une maladie spécifique, mais bien de l'état général du système reproducteur. On englobe alors tous les problèmes pouvant affecter ce système (métrite, endométrite, vaginite, etc.). Les résultats finaux sont sommairement présentés dans le tableau 1.

Tableau 1. – Seuil optimal, sensibilité (Se) et spécificité (Sp) estimés pour chaque méthode diagnostique (adapté de Arango-Sabogal et al., 2019)

<b>Méthode diagnostique (échelle de score)</b>	<b>Seuil optimal</b>	<b>Sensibilité (%)</b>	<b>Spécificité (%)</b>	<b>Sensibilité + spécificité</b>
<b>Score mucus vaginal (1-5)</b>	≥2	64,2	96,6	160,8
<b>Cytologie endométriale (0-100 %)</b>	≥6 %	45,9	92,2	138,1
<b>Test d'estérase leucocytaire (0/trace/1+/2+/3+)</b>	≥2	42,6	90,9	133,5

On conclut par ces résultats que la présence d'écoulement vaginal purulent est le facteur qui semble globalement le mieux prédire l'état de santé du système reproducteur au moment de l'examen (meilleure sommation Se+Sp). Au niveau des tests qui sont initialement spécifiques à l'endométrite (cytologie et estérase), on remarque que leurs performances sont similaires.

Peu de données de comparaison entre les autres techniques diagnostiques et la biopsie sont disponibles dû au fait qu'elle n'est pas utilisée de façon courante sur les fermes et en recherche (Barlund et al.,2008). Pour ce qui est de la palpation et de l'échographie transrectale, les indicateurs utilisés avec ces techniques (épaisseur du corps utérin, quantité de fluide présent dans l'utérus, etc.) manquent d'exactitude en comparaison avec les autres méthodes utilisées (Barlund et al.,2008).

En bref, plusieurs méthodes ont été mises à l'épreuve afin d'évaluer leur performance à diagnostiquer l'endométrite. Initialement, les méthodes utilisées se basaient sur une approche plus macroscopique en considérant la physionomie de l'utérus au moment de l'examen. Désormais, on remarque une popularité croissante pour une approche plus physiologique en tenant compte plutôt de la présence de cellules polymorphonucléaires à l'intérieur des tissus (De Boer et al.,2014). De ce fait, on compare de plus en plus les performances des méthodes par rapport à celles obtenues avec la cytologie qui s'impose comme la technique de référence. À noter également que certaines méthodes utilisées se sont avérées avoir un manque de précision quant à la possibilité de déterminer précisément la source du problème à l'intérieur du système reproducteur. Par exemple, la présence d'écoulement vaginal purulent est un indicateur valable de l'état de santé général du système de reproduction, mais il peut être difficile de cibler la région problématique. Finalement, la comparaison entre la cytologie et le test d'estérase révèle que leur performance est relativement comparable (Couto et al.,2013).

#### **1.4 Traitement de l'endométrite**

Étant donné que l'endométrite affecte la performance en reproduction des troupeaux laitiers, le développement de solutions pour contrôler la maladie s'est avéré nécessaire. Une hypothèse qui a été mise à l'épreuve considérait que l'injection de prostaglandine F2 alpha (PGF2 $\alpha$ ) durant la période post-partum permettrait de favoriser l'assainissement de l'utérus. Effectivement, cette idée se basait sur le principe que cette injection permettrait d'induire l'œstrus et diminuer le niveau de progestérone sanguin (Dubuc et al.,2011). Ces deux facteurs avaient théoriquement la capacité de favoriser l'évacuation des contaminants utérins et la réponse du système immunitaire. Au niveau pratique, les recherches ayant mis à l'essai ce

concept n'ont pas permis l'observation des améliorations escomptées au niveau de la reproduction (LeBlanc,2008; Galvão et al.,2009; Dubuc et al.,2011). Les divers résultats concordent plus ou moins et même dans certains cas, il a été observé une augmentation des jours ouverts (effet négatif du traitement) pour les vaches traitées n'ayant pas de corps jaune au moment de l'injection (LeBlanc et al.,2002).

Une alternative envisagée fut de tester l'utilisation d'antibiotiques afin d'éliminer la charge bactérienne et de faciliter par la suite l'involution de l'utérus (McDougall,2001). Dans les cas d'endométrite, quelques antibiotiques à large spectre ont été mis à l'essai avec quelques méthodes d'administration différentes (Kasimanickam et al.,2005; Dubuc et al.,2011). Le traitement avec les meilleurs résultats pour améliorer les performances reproductrices subséquentes de la vache atteinte d'endométrite est l'utilisation de céphapirine par infusion intra-utérine. En effet, plusieurs études ont observé un meilleur taux de succès de conception à la première saillie, une diminution du nombre de jours ouverts moyen et un meilleur taux de conception global à 120 jours chez les vaches précédemment diagnostiquées positives à l'endométrite traitées avec un tel protocole par rapport à un groupe de vaches positives n'ayant pas reçu de traitement (Denis-Robichaud et al.,2015; Tison et al.,2017).

L'utilisation d'antibiotiques est une pratique courante autant en médecine humaine que vétérinaire afin de contrôler les infections bactériennes. Leur utilisation est désormais remise en question à cause de la prise de conscience d'un problème majeur : l'antibiorésistance. On observe de plus en plus de bactéries tolérantes ou complètement résistantes aux antibiotiques anciennement efficaces contre elles (Call et al.,2008; European Food Safety et al.,2018). L'utilisation importante des antibiotiques de façon préventive et thérapeutique fait en sorte

d'augmenter la pression de sélection sur les bactéries ciblées. Cette réalité peut augmenter la prévalence des souches résistantes à l'intérieur de la population bactérienne (Koch et al.,2017). Le problème du développement de résistance aux antibiotiques devient d'une importance majeure lorsqu'on considère que très peu de nouveaux antibiotiques sont découverts et que le nombre de cas d'antibiorésistance répertorié en médecine vétérinaire ne cesse d'augmenter (European Food Safety et al.,2018). Afin de réagir à cette problématique qui prend une ampleur de plus en plus grande dans le milieu scientifique et dans la société civile, les professionnels du milieu ont lancé un mouvement de sensibilisation afin de prôner une utilisation ciblée des antibiotiques. Parmi les pratiques suggérées se trouve la limitation de l'utilisation d'antibiotiques dans une approche préventive. De nouvelles réglementations sont également mis en place afin d'apporter un appui législatif à ce mouvement (règlement MAPAQ 2019 sur l'utilisation des antibiotiques de catégorie 1). Il devient alors nécessaire pour justifier l'utilisation d'un antibiotique de confirmer la présence de l'agent pathogène ciblé. Lorsqu'on analyse les pratiques utilisées par rapport à l'endométrite, les méthodes préconisées pour faire le diagnostic (présence de pus vaginal et d'inflammation endométriale) n'évaluent pas de façon directe la présence de bactéries dans l'utérus au moment du traitement. Ces techniques se basent plutôt sur la réponse inflammatoire de la vache. Même avec la présence de pus à l'intérieur de la cavité vaginale, il est impossible de conclure sans un autre examen complémentaire que l'infection provient de l'utérus et s'il y a encore présence de bactéries nuisibles au moment du diagnostic d'endométrite par les méthodes actuellement utilisées. L'inflammation peut toujours persister sans pour autant que l'agent pathogène en cause soit encore présent.

## 1.5 Évolution de la charge bactérienne de l'utérus post-partum

L'inflammation observée dans un cas d'endométrite est généralement attribuée à une infection causée par une contamination bactérienne au moment du vêlage ou durant la période post-partum alors que le col utérin demeure ouvert pour un certain temps (Sheldon et al.,2006). Depuis plusieurs années, des chercheurs étudient les populations bactériennes retrouvées dans l'utérus suite au vêlage (Ruder et al.,1981). La compilation des résultats de ces divers travaux permet aujourd'hui de dresser le portrait des populations bactériennes rencontrées (figure 5). L'information liée à la pathogénicité restent uniquement à titre indicatif puisque l'association entre l'isolation d'une bactérie spécifique et le diagnostic de maladies utérines n'a été que peu étudiée.

Contaminants	Pathogènes potentiels	Pathogènes
<i>Aerococcus viridans</i>	<i>Acinetobacter spp.</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Clostridium butyricum</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Trueperella pyogenes</i>
<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Prevotella spp.</i>
<i>Corynebacterium spp.</i>	<i>Haemophilus somnus</i>	<i>Fusobacterium necrophorum</i>
<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Mannhiemia haemolytica</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Pasteurella multocida</i>	
<i>Micrococcus spp.</i>	<i>Peptostreptococcus spp.</i>	
<i>Providencia rettgeri</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	
<i>Providencia stuartii</i>	<i>Streptococcus uberis</i>	
<i>Proteus spp.</i>	<i>Bacteroidetes</i>	
<i>Propionobacterium granulosa</i>	<i>Firmicutes</i>	
<i>Staphylococcus species</i>	<i>Fusobacteria</i>	
<i>α-Haemolytic streptococci</i>		
<i>Streptococcus acidominimus</i>		

Figure 5. – Liste des bactéries identifiées dans l'utérus bovin selon leur potentiel pathogénique (adapté de Carneiro et coll., 2016)

La bactérie *Escherichia coli* fait partie des agents pathogènes régulièrement trouvés et cités (Williams et al.,2008; Carneiro et al.,2016). Toutefois, il n'est pas possible d'identifier un lien

direct entre la présence d'*E. coli* dans un échantillon et le risque de développer une endométrite (Williams et al.,2007; Sheldon et al.,2008). Son rôle semblerait plutôt d'être un précurseur d'infection par *Truperella pyogenes* au niveau de l'endomètre (Gilbert et al.,2016). La présence d'*E. coli* ne serait donc pas nécessaire au développement d'une endométrite, mais plutôt un adjuvant dans ce processus infectieux. Beaucoup plus d'études rapportent que la présence de *T. pyogenes* augmenterait le risque d'endométrite post-partum chez la vache (Madoz et al.,2014; Wagener et al.,2017). La présence de cette bactérie semble également corrélée avec l'augmentation du score du mucus vaginal ainsi que de la proportion de neutrophiles dans l'endomètre (Westermann et al.,2010; Gilbert et al.,2016; Madoz et al.,2017). Dans une étude expérimentale, l'inoculation utérine avec *T. pyogenes* a causé le développement d'endométrite (Amos et al.,2014). On note également que la présence de *T. pyogenes* combinée avec celle d'autres bactéries Gram négatif semble favoriser le développement d'infections (Mateus et al.,2002). De plus, il semble que la variable temporelle affecte le type de bactéries présentes au moment de l'examen. Effectivement, on remarque un pic de contamination par *E. coli* dans les prélèvements utérins plus rapidement par rapport à la contamination par *T. pyogenes* (Williams et al.,2007; Prunner et al.,2014). Cette information concorde avec l'idée qu'*E. coli* soit un précurseur d'une contamination par *T. pyogenes*. Finalement, certains chercheurs soutiennent l'hypothèse que certaines souches bactériennes, telles que staphylocoques coagulase négative et streptocoques  $\alpha$ -hémolytique auraient un effet protecteur lorsque présentes dans l'utérus en période post-partum (Sheldon et al.,2009).

Afin d'identifier les bactéries présentes, la mise en culture d'échantillons du mucus utérin sur des milieux de croissance bactérienne en condition aérobie fut la méthode la plus utilisée.

Pour ce faire, il est nécessaire de compléter une culture par épuisement et par la suite d'isoler une colonie. Cette méthode reste tout de même limitée considérant la compétition des différentes souches pour croître sur le milieu initial ainsi que la faible fraction des bactéries pouvant croître sur ces milieux de culture artificiels (Whitman et al.,1998). L'utilisation des nouvelles méthodes métagénomiques permettant l'analyse de grands « pools » d'ADN possède un potentiel beaucoup plus grand d'obtenir une image réaliste de la flore bactérienne retrouvée dans l'utérus. Les résultats obtenus à ce jour confirment la présence des groupes bactériens précédemment reconnus, mais également la présence non-négligeable de groupes bactériens ne faisant pas partie des bactéries cultivables connues. On remarque également que les bactéries pathogènes reconnues (*E. coli*, *T. pyogenes*) ne semblent représenter qu'une faible partie des bactéries présentes dans l'utérus durant la période post-partum (Santos et al.,2011; Knudsen et al.,2016).

Dans une optique moins spécifique, il peut être intéressant de se questionner à savoir si la quantité de bactéries à l'intérieur de l'utérus peut se révéler être un facteur de risque pour le développement de l'endométrite. Cette approche permettrait une analyse plus simplifiée et rapide de l'état d'un animal. Il a été démontré que la charge bactérienne intra-utérine suivait une distribution normale entre 0 à 28 jours post-partum et atteignait un pic à environ 15 jours (Prunner et al.,2014). Ce patron d'évolution semble être présent autant chez les vaches saines que chez les vaches souffrant d'endométrite (Prunner et al.,2014). Néanmoins, les vaches atteintes d'endométrite avaient une charge bactérienne significativement supérieure comparativement aux vaches saines (Williams et al.,2005). Également, les vaches avec une

endomérite clinique, donc plus sévère, avait une charge bactérienne plus élevée comparativement aux vaches ayant une endomérite subclinique (Prunner et al.,2014).

D'emblée, certains résultats de recherche sont contradictoires quant à l'efficacité de l'utilisation d'échantillons cytologiques de l'utérus afin d'ensemencer un milieu artificiel de croissance bactérienne. Si dans plusieurs des cas il a été possible d'obtenir des résultats concrets, il a été relevé dans une étude l'incapacité de faire croître des bactéries pour les vaches ayant un diagnostic d'endomérite subclinique (Madoz et al.,2014). De plus, certains résultats suggèrent qu'il n'y a que peu de concordance entre les résultats obtenus par un comptage bactérien et ceux obtenus par l'évaluation de la proportion de cellules polymorphonucléaires. On obtient, par exemple, un nombre de vaches positives à l'endomérite (diagnostic par compte de cellules polymorphonucléaires) plus élevé que le nombre de vaches considérées avec une infection bactérienne de l'utérus. Ces résultats supportent donc la présence d'autres causes d'inflammation qui ne seraient pas reliées directement aux infections bactériennes ou que la charge bactérienne présente serait mal évaluée (McDougall et al.,2011; Baranski et al.,2012). La proportion importante de cellules polymorphonucléaires dans l'endomètre peut être causée, à titre d'exemple, par une baisse de l'efficacité de la réponse immunitaire, la présence d'hormones stéroïdiennes sexuelles ou de corps cétoniques (Zerbe et al.,2000; Wira et al.,2005).

À la lumière de ces observations, il semble nécessaire que d'autres recherches soient effectuées afin d'éclaircir les résultats obtenus à ce jour. Considérant la difficulté de certains projets à obtenir une croissance bactérienne sur les milieux de culture, il est possible que ceci explique le peu de corrélation entre l'analyse de l'inflammation et la charge bactérienne observé dans certaines études. En effet, il est possible que la charge bactérienne ait simplement été sous-

estimée. Il serait intéressant, voire nécessaire, que ces difficultés de mise en culture soient analysées et comprises. Encore une fois, il est important de considérer les périodes étudiées afin de comparer les résultats de projets de recherche entre eux. Les projets ayant obtenu une corrélation entre la charge bactérienne et l'état de santé de l'utérus ont basé leurs analyses sur des échantillons prélevés précocement suite au vêlage et sur un suivi continu des vaches durant la période post-partum (Williams et al.,2007; Prunner et al.,2014). Certaines études avec des conclusions contraires ont utilisé seulement un ou deux moments fixes plus tardifs par rapport au moment du vêlage pour la collecte de leurs données (McDougall et al.,2011; Madoz et al.,2014). On peut également penser que le manque de concordance entre les deux méthodes puisse en partie être attribué à la présence d'inflammation résiduelle dans certains cas. En effet, une réaction inflammatoire excessive en réponse à une contamination bactérienne peut causer une inflammation persistante une fois la charge bactérienne contrôlée. Il serait alors possible de retrouver une inflammation non négligeable dans l'utérus (positive d'un point de vue cytologique) sans avoir la présence de bactéries de façon simultanée. Dans ce même ordre d'idée, on commence à voir certains chercheurs utiliser la spécification endométrite bactériologique afin de catégoriser les cas avec présence ou absence de bactéries (Madoz et al.,2017).

## **1.6 Culture bactériologique à la ferme**

L'évaluation de la présence bactérienne peut représenter une méthode diagnostique intéressante de l'endométrite afin de se conformer aux objectifs d'utilisation plus rationnelle des antibiotiques. En effet, cette technique se trouve à être une des seule permettant de confirmer directement la présence d'agents bactériens au moment du dépistage. Cependant, la faisabilité de cette étape diagnostique à la ferme demeure à investiguer. On cherche à obtenir un test

rapide, simple, praticable en milieu de production et qui ne demande pas d'analyses complexes. À partir de ces caractéristiques voulues, il peut être intéressant de réviser les méthodes diagnostiques utilisées pour d'autres maladies infectieuses rencontrées chez la vache laitière.

Dans plusieurs régions du monde, une des principales causes menant à l'utilisation d'antibiotiques en production laitière est la mammite (Murphy et al.,2017). La mammite est une maladie infectieuse du pis qui se développe suite à l'introduction de bactéries pathogènes à l'intérieur d'un ou des quartiers de la vache. Selon la gravité de l'infection, les conséquences peuvent aller d'une augmentation du compte de cellules somatiques dans le lait à la réforme de la vache (Blowey et al.,2010). Dans tous les cas, des pertes économiques substantielles pour le producteur sont à craindre lorsque la prévalence de mammite dans le troupeau devient importante (Hogeveen et al.,2011). L'impact négatif potentiel de cette maladie dans les troupeaux laitiers a donc favorisé l'utilisation d'antibiotiques en prophylaxie et en traitement afin de prévenir l'éclosion de cas à l'intérieur des troupeaux. Dans l'objectif de diminuer cette utilisation des antibiotiques à titre préventif, un système de dépistage bactériologique à la ferme a été mis en place (Mansion-de Vries et al.,2014; Royster et al.,2014). Le test consiste en un milieu de culture aérobique sur lequel un échantillon de lait est déposé. Les milieux de culture généralement utilisés sont les modèles Tri-plate/Bi-plate (Université du Minnesota) et Petrifilm (3M, London, On, Canada). Dans les deux cas, il est possible d'identifier à quel groupe (gram négative, gram positive) et même à quel genre, voir espèce, les colonies présentes sur les milieux de culture sont associées. En effet, les milieux de culture Triplate/Biplate utilisent différentes géloses (Factor/McConkey pour le Bi/plate et Factor/McConkey/Focus pour le Triplate) permettant l'identification des colonies cultivées. Au niveau du Petrifilm, plusieurs types de

plaques sont disponibles avec des caractéristiques spécifiques selon l'analyse souhaitée. Dans les deux cas, une période d'incubation de 24h à 48h à 37°C est nécessaire suite à l'inoculation. Une fois complétée, les colonies bactériennes qui sont apparues sur le milieu de culture sont dénombrées. En phase expérimentale, les recherches ont permis d'établir différents seuils de compte selon le milieu utilisé afin d'établir si une vache est considérée positive ou négative à l'infection mammaire (McCarron et al.,2009; Mansion-de Vries et al.,2014). Pour le producteur, il suffit donc de prendre un échantillon de lait du quartier soupçonné, d'inoculer le milieu avec cet échantillon, d'attendre la période d'incubation de 24h et de faire le décompte des colonies. Il est alors possible de justifier l'utilisation d'un antibiotique par une preuve directe de la présence de l'agent infectieux. Les études ayant mis à l'épreuve la capacité de ces tests à catégoriser correctement les animaux selon leur état de santé mammaire sont plutôt unanimes : les milieux Tri-plate et Petrifilm possèdent une bonne capacité prédictive (McCarron et al.,2009; Mansion-de Vries et al.,2014; Kabera et al.,2020).

Une critique pouvant être faite sur ce type de tests faits à la ferme est la difficulté de vérifier la présence de contamination dans les échantillons prélevés (McCarron et al.,2009). Effectivement, il est impossible de distinguer les colonies provenant de l'échantillon inoculé ou de celles pouvant être générées suivant une contamination environnementale. Cette situation peut être problématique considérant que le milieu de travail à la ferme possède de multiples sources de contamination et plusieurs facteurs permettent la propagation d'agents contaminants (ventilation, mouvement des animaux, etc.). Il est donc primordial de mettre une emphase sur l'importance de suivre un protocole précis à la ferme visant à limiter les possibilités de

contamination avec les producteurs qui souhaitent débiter l'utilisation de cette technique de diagnostic.

Malgré cette limite, cette méthode reste la solution la plus efficace en milieu de production afin d'obtenir une analyse bactériologique de la mammite. La simplicité de l'analyse ainsi que le peu de matériel nécessaire ont permis à cette méthode de facilement s'installer dans les protocoles de routine des producteurs. À la lumière de ces observations, il est donc logique de se questionner à savoir si une telle procédure serait applicable au niveau de la santé utérine. En considérant les résultats obtenus en santé mammaire, il est juste d'espérer des résultats appréciables pour ce qui a trait à la santé utérine. Une étude avait pour but de mettre à l'épreuve ces deux mêmes milieux de culture bactériologique (Tri-plate et Petrifilm) afin de détecter la présence d'*E. coli* dans l'utérus de la vache post-partum (Dubuc,2017). Les résultats obtenus ont montré une concordance quasi parfaite avec les résultats obtenus de culture bactérienne en laboratoire. L'utilisation du Petrifilm a également été mise à l'essai pour la détection de l'endométrite chez la vache laitière (Madoz et al.,2017). Les résultats de cette étude ont révélé que l'utilisation d'un traitement antibiotique basé sur la croissance de colonies ou non sur le milieu Petrifilm permettait d'obtenir des performances en reproduction ainsi qu'un taux de guérison clinique similaires à ceux obtenus en se basant sur un diagnostic avec le Metricheck, mais avec une réduction de 57 % du nombre de traitement antibiotique (Madoz et al.,2017). Dans les deux cas, aucune de ces études n'a évalué la relation entre les résultats de cultures sur les fermes d'échantillons de l'endomètre et ceux de cultures de laboratoire toutes bactéries confondues.

## **1.7 Objectifs et hypothèses**

Considérant ces informations, l'objectif principal de mon projet vise donc à évaluer la concordance entre la culture bactérienne à la ferme et l'analyse bactériologique de laboratoire à partir d'échantillons de l'endomètre chez la vache laitière post-partum. L'hypothèse de départ est que la culture bactériologique sur les fermes d'échantillon de l'endomètre donne des résultats comparables à ceux obtenus en culture bactériologique de laboratoire. L'objectif secondaire de ce projet est de valider les résultats cytologiques obtenus. Notre hypothèse est que les résultats cytologiques sont caractéristiques de l'inflammation de l'utérus au moment de l'examen, mais qu'il y a un manque de concordance par rapport à la charge bactérienne présente. Ce projet se veut être une première étape afin de justifier et d'ouvrir la porte à d'autres projets subséquents qui permettraient d'approfondir l'analyse bactériologique de l'endométrite.

## Chapitre 2 - Présentation de l'article

Nicolas Barbeau Grégoire, Alexandre Boyer, Marjolaine Rousseau and Jocelyn Dubuc:  
Potential analysis of on-farm bacteriologic culture systems and validation of cytology for diagnosis  
of endometritis for dairy cow in post-partum. (À soumettre au *Journal of Dairy Science*)

**Potential analysis of on-farm bacteriologic culture systems and validation of cytology for diagnosis of endometritis for dairy cow in post-partum**

**N. Barbeau Grégoire, A. Boyer, M. Rousseau and J. Dubuc**

Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal

C.P.5000, Saint-Hyacinthe, Québec, J2S 2M2, Canada

**Corresponding author**

Nicolas Barbeau Grégoire

Email: [Nicolas.barbeau-gregoire@umontreal.ca](mailto:Nicolas.barbeau-gregoire@umontreal.ca)

## 2.1 Abstract

Endometritis is a disease affecting reproductive performance in dairy cows. It is defined by the presence of excessive inflammation in the uterine body during the postpartum period. From a curative point of view, the use of antibiotic treatment in the form of intrauterine infusion is one of the most widely used methods which has a beneficial effect on subsequent reproductive performance in positive cases of endometritis. Considering the modern issues concerning the use of antibiotics in animal production, the use of a diagnostic method based on the presence of inflammation in order to administer antibiotic treatment is questionable. In that sense, the main objective of this research project was to validate the accuracy of the results of bacteriological culture medium used on the farm (Tri-plate and Petrifilm) based on the ones from diagnosis laboratory. A secondary objective was to verify the concordance between the bacterial and cytological results. To do this, a cross-sectional observational study was set up within two commercial dairy herds followed by the bovine outpatient clinic of the Faculty of Veterinary Medicine of the Université de Montréal. A total of 189 cows in the postpartum period (30 to 43 days in milk) were systematically enrolled in order to collect 2 uterine samples from cytobrush during the same examination. The first cytobrush was used to directly inoculate the Tri-plate medium and then be sent to the reference laboratory (Diagnostic service of the FVM of the Université de Montréal) for aerobic bacterial analysis. The second cytobrush was initially used to make a microscopic smear for cytological analysis (polymorphonuclear cell proportion (PMNL)) and subsequently diluted in 1 ml of saline to inoculate the Petrifilm medium. After an incubation period of 24 hours, the colony count was made for each culture medium. From these data, statistical analysis were completed in order to optimize the summation of sensitivity and

specificity (Se + Sp) of the two culture medium according to the results of the reference laboratory. For the Tri-plate medium, the cutoff of > 90 colonies resulted in the maximum Se + Sp, which was 167.7. For the Petrifilm medium, the threshold of >100 colonies gave the maximum Se + Sp, which was 129. Regarding the concordance between the cytological and bacterial diagnosis, the results of our project show that 64.3% of cows positive for cytological criteria (>6% PMNL) were found to be negative from a bacterial point of view. In conclusion, this study shows that Tri-plate and Petrifilm medium used on-farms were best to reproduce the results obtained by laboratory analysis using 90 and 100 colony threshold respectively. Our results also support a lack of agreement between cytological and bacterial diagnosis. It therefore seems relevant that other projects are completed in order to deepen the bacterial screening for endometritis and to analyze its diagnostic potential.

**Keywords** : Dairy cow, Endometritis, Diagnosis, Bacteriology, Cytology.

## 2.2 Introduction

Endometritis is defined as the presence of localized inflammation in superficial layers of the uterine body (endometrium) at 21 days post-partum or more (Sheldon et al.,2006; Sheldon et al.,2008). Even if this condition does not affect the general health status of cows, it can still have significant impact on subsequent reproductive performance. Endometritis was shown to increase the number of days open and of artificial insemination per conception, as well as decrease conception rate at first artificial insemination. The magnitude of these effects depends on the severity of inflammation found in the endometrium of cows (Sheldon et al.,2006; Barlund et al.,2008; Carneiro et al.,2016; Dubuc et al.,2017).

Diagnosis of endometritis is still an active subject of research (Dubuc et al.,2010; Arango-Sabogal et al.,2019). Endometritis is generally diagnosed based on the inflammation level at which the cow subsequent fertility will be negatively affected (Dubuc et al.,2010). However, different approaches have been developed over the last 20 years to diagnose endometritis (Barlund et al.,2008; Wagener et al.,2017). For instance, diagnosis of clinical endometritis is based on the presence of clinical signs, like uterine horn or cervix size as well as a classification of intra-vaginal discharge. Cytological endometritis is based on the level of inflammation found in the endometrium, like the proportion of polymorphonuclear cells found in uterine body wall or the leukocyte esterase test result. It is generally agreed by most researchers that diagnosing cytological endometritis is the most accurate way to determine the endometritis status of dairy cows (Sheldon et al.,2006; Wagener et al.,2017).

The use of intra-uterine infusion of cephalosporins is currently the treatment of choice in Canada for endometritis as multiple studies have shown its efficacy (McDougall,2001; LeBlanc et al.,2002; Kasimanickam et al.,2005; Tison et al.,2017). However, the use of antibiotics in animal production is likely to evolve over the next decade. Considering the new information available on antibiogenesis, veterinarians keep adapting their use of antibiotics based on the most rational way possible. With this idea in mind, confirming the presence of specific pathogens causing a disease is becoming more and more common before making a decision to use antibiotics. A good example of this situation is how selective antibiotic therapy at dry-off has become common over the last years and will likely replace systematic therapy over time (Kabera et al.,2020). In such context, performing a bacteriological culture test on milk samples before dry-off to determine if bacterial pathogens are present will generally be the decision criteria to administer antibiotics at dry-off. Practical on-farm bacterial culture mediums such as Petrifilm (3M, London, On, Canada) and Tri-plate (University of Minnesota, Mn, USA) can even be used with great accuracy by veterinarians and farmers in order to implement selective dry cow therapy (McCarron et al.,2009; Mansion-de Vries et al.,2014; Kabera et al.,2020).

Similarly to dry cow therapy, confirming the presence of bacterial pathogens in the uterus of cows would help to justify the use of an intra-uterine antibiotic for endometritis treatment. Even though identification of specific bacteria in endometritis cases has been investigated in some studies (Carneiro et al.,2016), little is still known about the relationship between response to antibiotic treatment and uterine bacteria presence. Furthermore, there are almost no data about the diagnostic accuracy of on-farm bacteriological culture mediums like Petrifilm and Tri-

plate for quantifying the presence of bacterial pathogens in the endometrium of cows (Dubuc,2017).

Consequently, the first objective of this study was to quantify and maximize the accuracy of Petrifilm and Tri-plate on-farm bacterial culture mediums results compared to those obtained from a standard bacteriological laboratory analysis. The hypothesis was that on-farm culture mediums will yield results similar to standard laboratory analysis. The second objective of this study was to compare the agreement between cytological and laboratory bacteriological results. The hypothesis was that cytology would give more positive cases than bacteriology since inflammation without or after infection could be present in some cows.

### **2.3 Materials and methods**

A cross-sectional study was conducted on two commercial dairy farms selected by convenience for being located within one hour of the Bovine Ambulatory Clinic of the Faculté de médecine vétérinaire of the Université de Montréal (St-Hyacinthe, QC, Canada). Both herds had Holstein cows and lactating herd size was 200 and 225 cows for herds A and B, respectively. Cows from herd A were housed in a freestall barn whereas cows from herd B were housed in a tiestall barn.

Data were collected between September 2018 and May 2019. During the project duration, both farms were visited every 14 d by a research team (a graduate student and an animal health technician). All cows having 30 to 43 days in milk (DIM) at the visit, no consideration of their health status, were systematically enrolled in the study. All cows enrolled had not received any treatment before our sampling. The estimated sample size for this study was 200 cows based on

finding a sensitivity and specificity of 80% with a minimal acceptable lower confidence limit of 55%, and a prevalence of bacterial contamination of 20% (Flahault et al.,2005).

For each cow enrolled in the study, two samples of the endometrium were collected with a cytobrush. The technique used was adapted from the one of Kasimanickam (Kasimanickam et al.,2004). Specifically, the vulva was cleaned with a solution of chlorexidine gluconate concentrated at 2% (Chlorhexidine 2% Solution, Partner Animal Health, Ilderton, On, Canada). After, a first operator inserted a sterile plastic sheath through the cervix of the cow by rectal palpation. A second operator then inserted a sterile cytobrush (Cytobrush Plus GT, CooperSurgical inc, Trumbull, USA) mounted on a sterile steel rod into the sheath. At this point, the first operator was able to sample endometrial cells by exposing and turning the cytobrush onto the endometrial wall. When the first sample was collected, the second operator retrieved the first cytobrush and inserted a second one into the plastic sheath that remained inserted through the vagina and cervix by the first operator. The second sample was taken exactly like the first one. The first cytobrush was used to inoculate directly the on-farm culture medium Tri-plate by rolling the brush on the three sub-mediums. The same brush was then place in a transportation medium (BBL Port-a-cult Tube, Bioquest, Div. of Becton, Dickinson &Co., Cockeysville, Md.) to be sent to the Veterinary Bacteriology Laboratory of the Université de Montréal (St-Hyacinthe, QC, Canada; VBLAB). The second cytobrush was used to prepare a microscope slide for polymorphonuclear cell count (PMNL) and to inoculate the on- farm culture medium AC Petrifilm. Specifically, the brush was rolled on a microscope slide at the farm before being put in 1 ml of saline solution (NaCl 0,9%, ICU Medical Canada inc., Saint-Laurent, Qc, Canada) in order to inoculate the on-farm culture medium AC Petrifilm. Back at our laboratory, both on-farm culture mediums were then

incubated for 48h in standard conditions (37°C). Once the incubation period was completed, an observer visually counted the number of colonies on each medium based on recommended technique from manufacturer. For the Tri-plate medium, if there was too many colonies on a medium to be able to count them individually, the medium was given a maximum number of 100. The count of the 3 types of culture medium (focus, factor and MacConkey) were kept separately. Since the focus medium and the factor medium allowed growth of the same kind of bacteria (gram-positive), having the separate count results gave us the opportunity to only consider the factor medium and MacConkey medium to avoid duplicate count. For the Petrifilm medium, if the number of colonies exceeded 300, count was estimated based on the interpretation guide of the company (Annexe 1). The observer counting the Triplate and Petrifilm mediums was blinded to the other medium result.

For the VBLAB, the samples were kept at 4°C and sent within 24h of the collection. Standard aerobic bacterial culture was performed for each sample. Specifically, uterine cytobrush were used to inoculate BD Columbia agar medium with 5% of sheep blood. Inoculation was done using an impoverishment technique with four dials (section) in total: first dial was inoculated and a swab of the first dial was used to inoculate the second dial. The same pattern was repeated using dial 2 and 3 to inoculate dial 3 and 4, respectively. Incubation lasted 24h at 35°C. Systematically, each sample was also inoculated in a bacterial culture broth which was used as an enriched medium. The importance of growth was classified according to the number of colonies (VBLAB chart): enriched only (bacteria was only identified in the culture broth), rare (one colony growth on first dial), few (2 to 4 colony growth on first dial), 1+ (five or more colony growth on first dial), 2+ (presence of colony on second dial), 3+ (presence of colony on third dial) and 4+

(presence of colony on fourth dial). A sample was considered positive to bacterial endometritis if a bacteria was present at a growth level of 2+ or more.

For the cytology analysis, the microscope slide was stained on the day of collection using a Diff Quick kit (Jorgensen Laboratories, Loveland, Co, USA). Once dried off, slides were examined under a microscope at 100x to get a general appreciation of the slide. After that, the observer zoomed at 400x to complete a differential cell count of 100 cells focusing on PMNL and endometrial cells. The count was repeated three times at different spots on the slide and an average was calculated. All the slides were read by the same trained observer. A confirmation was completed for the slides with a count around 6% (5 to 7%) of PMNL. Those samples were read again by a trained animal health technician to confirm the final count. This confirmation was completed to insure that cows were classified in the right group, since the threshold used in this study was 6% of PMNL (more than 6% was consider positive) based on previous research (Dubuc et al.,2010). The two observers were both blinded to the results of culture mediums at the moment of the slide reading.

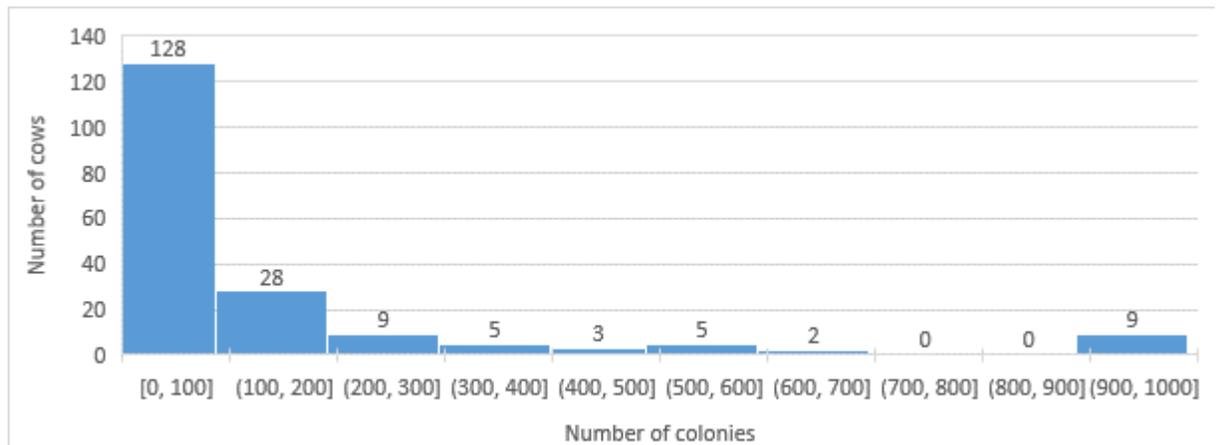
#### 2.2.1 Statistical analysis

All statistical analyzes were performed using the program SAS version 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC). The cow was the research unit of this study. For all statistical analyzes, the reference test was VBLAB. For each on-farm culture medium (Tri-plate and Petrifilm) and based on their distributions of the colony counting results, different dichotomization thresholds using constant intervals were obtained. From 2x2 tables (PROC FREQ) based on these thresholds, the performance of the different diagnostic approaches were evaluated considering the following statistics: sensitivity (Se), specificity (Sp), positive predictive value (PPV), negative predictive value

(NPV) and apparent prevalence (AP). Since our goal was to minimize misdiagnosis rate (less false positive and false negative as possible), highest summation of sensitivity and specificity was considered the reference statistic to acknowledge the best threshold for each on-farm bacterial test. For the two best thresholds based on highest summation of sensitivity and specificity, kappa statistic was calculated to evaluate agreement between VBLAB and culture mediums. In order to compare the results from VBLAB and PMNL counts, a 2x2 table was computed to obtain agreement beyond chances.

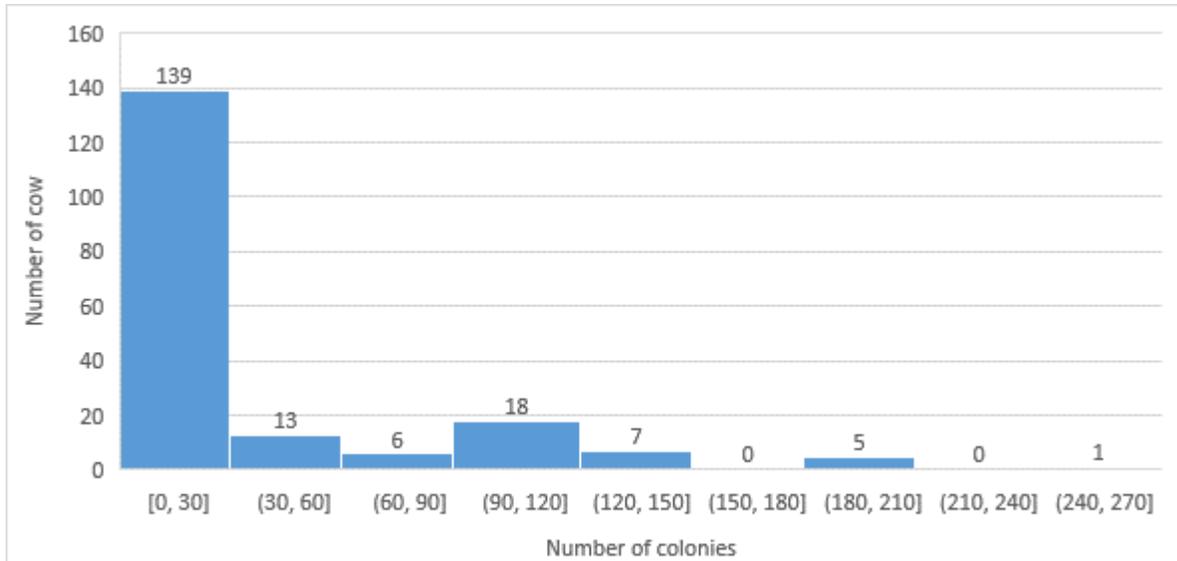
## 2.4 Results

A total of 203 cows (herd A n=93, herd B n=96) were enrolled in the study. Because of a period of transportation too long between sampling and reception to VBLAB, the samples from 14 cows were not correctly preserved. For that reason, the results of 189 cows were used for the statistical analysis. Based on the VBLAB, the prevalence of bacterial endometritis was 15.8% (n=30). Colonies count distributions for both culture mediums are presented in figure 6 and figure 7.



( )= Exclusive limit [ ]= Inclusive limit

Figure 6. – Colonies count distribution for the Petrifilm medium (n=189)



( )=Exclusive limit [ ]=Inclusive limit

Figure 7. – Colonies count distribution for the Triplate medium (n=189)

#### 2.4.1 Petrifilm medium

The Petrifilm medium results are presented in Table 1. Observed prevalence when using different thresholds varied from 73% (n=138; threshold>20 colonies) to 17% (n=33; threshold>200 colonies). Highest summation of sensitivity and specificity (129.0) was reached when using the threshold of > 100 colonies, with Se and Sp of 56.7% and 72.3%, respectively. Kappa statistics using this threshold was 0.2. Positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) are also shown for each threshold in Table 2.

Tableau 2. – Diagnostic performance of Petrifilm on-farm culture medium based on different colony count thresholds in comparison with reference laboratory (n=189)

Threshold (colony count)	Sensitivity (%) [95%CI]	Specificity (%) [95%CI]	Sensitivity +Specificity (%)	Positive Predictive Value (%)	Negative Predictive Value (%)	Apparent Prevalence (%)
> 20	83.3 [65.3;94.4]	28.9 [22.0;36.6]	112.3	18.1	90.2	73.0
> 40	63.3 [43.9;80.1]	48.4 [40.4;56.5]	111.8	18.8	87.5	53.4
> 60	60.0 [40.6;77.3]	61.0 [53.0;68.6]	121.0	22.5	89.0	42.3
> 80	56.7 [37.4;74.5]	68.6 [60.7;75.7]	125.2	25.4	89.3	35.4
<b>&gt; 100</b>	<b>56.7 [37.4;74.5]</b>	<b>72.3 [64.7;79.1]</b>	<b>129.0</b>	<b>27.9</b>	<b>89.8</b>	<b>32.2</b>
> 120	50.0 [31.3;68.7]	76.7 [69.4;83.1]	126.7	28.8	89.1	27.5
> 140	46.7 [28.3;65.7]	80.5 [73.5;86.4]	127.2	31.1	88.9	23.8
> 160	43.3 [25.5;62.6]	83.0 [76.3;88.5]	126.4	32.5	88.6	21.2
> 180	43.3 [25.5;62.6]	84.9 [78.4;90.1]	128.2	35.1	88.8	19.6
> 200	40.0 [22.7;59.4]	86.8 [80.5;91.6]	126.8	36.4	88.5	17.5

In bold the best threshold to optimize summation of sensibility and specificity

Tableau 3. – Diagnostic performance of Tri-plate on-farm culture medium based on different colony count thresholds in comparison with reference laboratory (n=189)

Threshold (colony count)	Sensitivity (%) [95%CI]	Specificity (%) [95%CI]	Sensitivity +Specificity (%)	Positive Predictive Value (%)	Negative Predictive Value (%)	Apparent Prevalence (%)
> 10	76.7 [57.7;90.1]	51.6 [43.5;59.6]	128.2	23.0	92.1	52.9
> 20	73.3 [54.1;87.7]	73.0 [65.4;79.7]	146.3	33.8	93.5	34.4
> 30	73.3 [54.1;87.7]	82.4 [75.6;88.0]	155.7	44.0	94.2	26.5
> 40	73.3 [54.1;87.7]	86.2 [79.8;91.1]	159.5	50.0	94.5	23.3
> 50	73.3 [54.1;87.7]	89.9 [84.2;94.1]	163.3	57.9	94.7	20.1
> 60	73.3 [54.1;87.7]	90.6 [84.9;94.6]	163.9	59.5	94.7	19.6
> 70	73.3 [54.1;87.7]	91.8 [86.4;95.6]	165.2	62.9	94.8	18.5
> 80	73.3 [54.1;87.7]	92.5 [87.2;96.0]	165.8	64.7	94.8	18.0
<b>&gt; 90</b>	<b>73.3 [54.1;87.7]</b>	<b>94.3 [87.2;96.0]</b>	<b>167.7</b>	<b>71.0</b>	<b>94.9</b>	<b>16.4</b>
> 100	70.0 [50.6;85.3]	95.6 [91.1;98.2]	165.6	75.0	94.4	14.8

In bold the best threshold to optimize summation of sensibility and specificity

#### 2.4.2 Tri-plate medium

The Tri-plate culture medium results are shown in Table 3. Apparent prevalence vary from 14.8% (n=28; threshold > 100 colonies) to 52.9% (n=100; threshold > 10 colonies). Highest summation of sensitivity and specificity (167.7) was reached at the threshold of > 90 colonies, with Se and Sp of 73.3% and 94.3% respectively. Using this threshold, kappa statistic was 0.67. Positive predictive value and NPV are also shown for each threshold in Table 2.

#### 2.4.3 Diagnosis laboratory and PMNL count

The agreement between cytology and bacteriology diagnostic (VBLAB) results is presented in Table 4. A total of 67 cows were considered positive to endometritis based on cytology ( $\geq 6\%$  of PMNL). That represents an apparent prevalence of 35.4% in our sampling group. The number of positive cases was 30 using bacteriology diagnostic criteria (one bacteria or more at a growth level of 2+ or higher). Overall, 80% (24/30) of bacteriology positive cases were also positive based on cytology. On the other hand, 64.2% (43/67) of positive cases with cytology happen to be negative with the bacterial approach. This leaves a disagreement of 67,1% in the classification of positive cases between the two techniques.

Tableau 4. – Contingent table for agreement between cytologic and bacterial (laboratory) diagnosis

Bacterial diagnosis <sup>2</sup> (laboratory analysis)	Cytologic diagnosis <sup>1</sup>		Total
	-	+	
-	116	43	159
+	6	24	30
Total	122	67	189

1-Cow was considered positive if PMNL was  $\geq 6\%$

2-Cow was considered positive if one bacteria or more was at 2+ or more for growth level

## 2.5 Discussion

### 2.5.1 On-farm bacteriological mediums

To our knowledge, this is the first study designed to evaluate the agreement between results from veterinary bacteriological laboratory analysis and on-farm bacteriological culture growth when using uterine samples from cytobrush. The thresholds obtained to maximize the total sum of sensibility and specificity and hence to minimize the number of diagnostic errors were  $> 90$  and  $> 100$  colonies for the Tri-plate and Petrifilm mediums, respectively.

The agreement between Petrifilm medium results and VBLAB was low ( $\kappa=0.20$ ). For the sensitivity, performance was acceptable in this context based on performance of other tests. For the specificity, performance was lower than tests already use for diagnosis of endometritis (Arango-Sabogal et al.,2019). Accuracy results for Petrifilm medium (Table 1) showed that as the threshold increases, the gain in specificity was too small to compensate for the lost in sensitivity. Thus, it globally did not improve the sum of sensitivity and specificity a lot. That observation indicates that in our sampled group, many positive and negative cows based on VBLAB results

had comparable colony count. Considering that our inoculum was not diluted and that on-farm contamination was omnipresent, it is possible that Petrifilm medium was just too sensitive for the growth of bacteria in our farm data collection situation. Perhaps the background bacteria contamination was too high for a medium like Petrifilm. This result does not corroborate with the application used in another study (Madoz et al.,2017). They used Petrifilm medium (aerobic and enterobacteria) with a threshold of 5 colonies ( $\geq 5$  colonies was considered a positive case) to do a selective antibiotic treatment on cows considered with endometritis based on abnormal vaginal discharge ( $\geq 1$  score of vaginal discharge). It has to be noted that in their samples, only cows previously tested positive to vaginal discharge were then tested with Petrifilm. The uterine swabs were also diluted in 3 ml of lysogenic broth medium in comparison to 1 ml of saline solution in our study. Nevertheless, future studies should consider this difference when building their approach.

For the medium Tri-plate, accuracy compared with VBLAB was high ( $\kappa=0.67$ ). The sensitivity (73.3 [54.1;87.7]) obtained in this context is good based on performance of other tests. For the specificity (94.3 [87.2;96.0]), it is comparable with tests already use for diagnosis of endometritis (Arango-Sabogal et al.,2019). Our results show that the sensitivity did not decrease much between the thresholds 20 and 90 (it stays at 73%). We can then conclude that no positive cows based on VBLAB results had a colony count between 20 and 90. This observation suggests that most of the positive cows based on diagnosis laboratory had a lower colony count than 20 and that the rest were way higher (over 90).

Considering sensitivity, specificity and agreement results (based on kappa statistic with VBLAB), the results of this study would suggest the use of Tri-plate medium for on-farm

bacteriological culture of uterine swabs to be numerically better than the Petrifilm medium when compared to results from bacteriology laboratory. However, this research was not designed to determine if on-farm bacterial culture could be a good tool for diagnosis and treatment of endometritis. Cows that were enrolled in this project were not followed to look at subsequent reproductive performance. Also, the sample size of this study was not estimated to have enough statistical power to observe the effect of the uterine bacterial charge on subsequent reproductive performance.

#### 2.5.2 Diagnosis laboratory and PMNL count results comparison

The second objective of our study was to assess the agreement between the PMNL criteria and the VBLAB results. Based on Figure 1, the majority of cows positive to bacterial diagnostic criteria were also positive for cytological diagnostic criteria. For the 6 cows that were positive only to bacterial criteria, the PMNL proportion was between 3 to 5%. So even in those cases, PMNL proportion was not zero, but too low to be considered positive. On the other hand, about two third of the positive cows based on PMNL proportion were negative to bacterial criteria. Consequently, when used on-farm, there might be a significant proportion of case in which the inflammation observed is not correlated with the presence of a bacterial and this could be due to residual inflammation (high inflammation after the elimination of the bacterial contamination). However, it can't be assumed that the disagreement between the two approaches is only due to this factor. When planning the study, we made the choice to only use aerobic bacteriological culture medium (VBLAB, Petrifilm, Tri-plate) to be coherent with the fact that such analyze would need to be doable on a farm. Since anaerobic bacteria could be present in the uterine body (such as *F. necrophorum*, *P. melaninogenica*, *Clostridium spp* and *Bacteriodes spp.*), it is possible that

inflammation observed is caused in part by those bacteria (Williams et al.,2005; Foldi et al.,2006). We also have to keep in mind that competition between bacteria to grow on culture medium is present and that not all the bacteria have the capacity to grow on them. This could also limit our ability to estimate properly the real bacteria population at the moment of sampling. These factors have to be considered when interpreting results of this study. If the main goal of a research project was to identify all bacteria present at the time of sampling, genomic analysis should be considered. Our study results also suggest that correlation between inflammation and the presence of bacteria in the uterine body post partum should be further investigated. Methods used in this research did not allow to identify all possible bacteria present at the moment of the data collection. Technique like PCR analysis or purification growth colonies could have given a more complete image. However, our protocol showed the relevance of on-farm bacteria growth from uterine swabs in a way that could be use in day-to-day herd management routine. Relation between endometrial bacterial charge and subsequent reproductive performance should also be clarified. Effectiveness of antibiotics treatment in cases of endometritis based on bacterial charge diagnosis should be considered in future studies.

## **2.6 Conclusion**

In this study, Tri-plate culture medium showed a good accuracy compared to the reference laboratory analysis test results when using a threshold of > 90 colonies; sensitivity and specificity of 73.3% and 94.3% were obtained, respectively. The Petrifilm medium optimal threshold to maximize sensitivity and specificity was obtained at > 100 colonies and were 56.7% and 72.3%, respectively. Overall, its accuracy with the reference test was low. Comparison of bacteriological results with cytological ones showed a lack of agreement; disagreement between the two

techniques was noted in 67% of the cases. Our data support the possibility that cytology approach might overestimate the number of cases in which antibiotic treatment could be useful. Further research is needed to better understand these results.

## **Chapitre 3 – Analyse biomoléculaire des cytokines pro-inflammatoires**

Étant donné que l'article se trouve à être un texte relativement bref qui vise à se concentrer sur un aspect principal, certains résultats de notre projet de recherche n'ont pas été abordés. La partie qui suit porte sur ces résultats complémentaires à ceux présentés dans l'article de la partie précédente.

Depuis quelques années, des projets de recherche se sont concentrés à analyser la réponse immunitaire lié au développement de l'endométrite chez la vache laitière au niveau de l'expression génétique. Dans le processus inflammatoire, plusieurs cytokines dites pro-inflammatoires jouent un rôle important dans le recrutement et l'activation des fonctions phagocytaires des différents acteurs du système immunitaire primaire comme les macrophages et les leucocytes polymorphonucléaires (PMN). Parmi celles-ci se trouve l'interleukine-8 (IL-8) et Tumor Necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ). Dans le cas d'IL-8, les connaissances à ce jour supportent un rôle direct dans l'initiation du recrutement des PMN à l'intérieur de l'endomètre. Pour ce qui est de TNF $\alpha$ , son rôle à l'intérieur de la réponse inflammatoire semble être plutôt régulateur (Ghasemi et al.,2012). Dans les deux cas, plusieurs recherches appuient le fait que leur niveau d'expression à l'intérieur de l'endomètre soit corrélé avec le diagnostic d'endométrite chez la vache. L'objectif était donc de comparer les valeurs d'expression génique d'IL-8 et TNF $\alpha$  entre un groupe de vaches atteintes d'une endométrite et un second groupe de vaches saines basé sur un diagnostic cytologique. Les résultats de cette démarche auront pour effet de valider l'approche

utilisée pour évaluer l'inflammation dans l'utérus au moment de notre examen et du même coup renforcer la crédibilité de nos analyses subséquentes.

Pour chacun des groupes (vaches avec endométrite cytologique et vaches saines), un nombre cible de 10 vaches était visé. L'échantillonnage c'est fait à l'intérieur même de la population cible du projet de recherche principale. Durant une période d'environ un mois, toutes les vaches répondant au critère de sélection pour le projet principal (être entre 30 à 43 jours en lait (JEL)) ont été prélevé avec une troisième cytobrosse en utilisant le même protocole décrit dans l'article. L'évaluation cytologique (% PMN) de chaque vache étant obtenue le jour même, la prise d'une troisième cytobrosse a continué jusqu'à l'obtention d'un minimum de 10 vaches positives et 10 vaches négatives à l'endométrite cytologique considérant un seuil diagnostique de 6 % de PMN (plus de 6 % considéré positif). Une fois prélevée, la brosse était immédiatement mise dans un éprouvette contenant 1,5 µl d'ARNlater (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, Ca, USA) pour ensuite être stocké à 4°C.

Avant de débiter l'extraction de l'ARN, chaque échantillon était vortexé pendant 5 secondes. Les cytobrosses étaient par la suite jetées en prenant soin d'essorer celles-ci sur les côtés de l'éprouvette afin de conserver le plus de matériel possible. L'extraction totale de l'ARN des échantillons a été complétée en utilisant l'ensemble d'extraction RNA Total Mini Kit (Froggabio, Concord, On, Canada) et le protocole fourni par le fournisseur. L'ARN obtenu a été analysé par spectrophotométrie à l'aide d'un NanoDrop-1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific). L'ARN totale extraite fut par la suite transcrite en ADN complémentaire à l'aide de l'ensemble SuperScrip Vilo cDNA Synthesis (Invitrogen) et du protocole établi par le fournisseur. À partir de cette ADN complémentaire, une analyse par PCR quantitatif (qPCR) a permis de

quantifier l'expression des gènes cibles (TNF $\alpha$  et IL-8). Les réactions PCR ont été complétées à l'aide d'un CFX96 Touch thermal cycler instrument (Bio-rad, Mississauga, On, Canada) et d'une solution Supergreen Advanced qPCR MasterMix (Wisent, St-Bruno, Qc, Canada). Chaque réaction PCR contenait 7,5  $\mu$ l de SYBR Green MasterMix, 2,3  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O et 0,6  $\mu$ l de chaque amorce sens et anti-sens spécifique au gène ciblé. Afin de valider les amorces, plusieurs courbes standardisées ont été complétées à partir de dilution de l'ADN complémentaire. Les valeurs d'efficacité d'amplification (E) ont été obtenues en utilisant la pente de la partie linéaire du logarithme dérivée de la formule  $E=e^{-1/\text{pente}}$ . Seules les paires d'amorces avec une efficacité d'amplification entre les valeurs 1.8 à 2.2 ont été utilisées. Un seul et même patron de cycles thermales fut utilisé pour toutes les réactions d'amplification PCR : 3 minutes à 95°C, 40 cycles de 15 secondes à 95°C, 30 secondes à 60°C et 30 secondes à 72°C. Rpl-19 a été utilisé comme gène de référence afin de quantifier l'expression des gènes d'intérêt, en considérant comme ratio  $R = (E_{\text{Ct Rpl19}}/E_{\text{Ct target}})$ . Les séquences des amorces utilisées sont présentées à l'Annexe 2.

Au final, 8 et 14 vaches avec et sans inflammation (basée sur diagnostic cytologique) ont été considérées pour l'analyse de l'expression génique de TNF $\alpha$  et IL-8. Deux vaches avec cytologie positive à l'inflammation ont dû être exclues en raison de la mauvaise qualité de l'ARN extrait. L'expression relative de ces gènes selon l'état cytologique des vaches est présentée dans les figures suivantes.

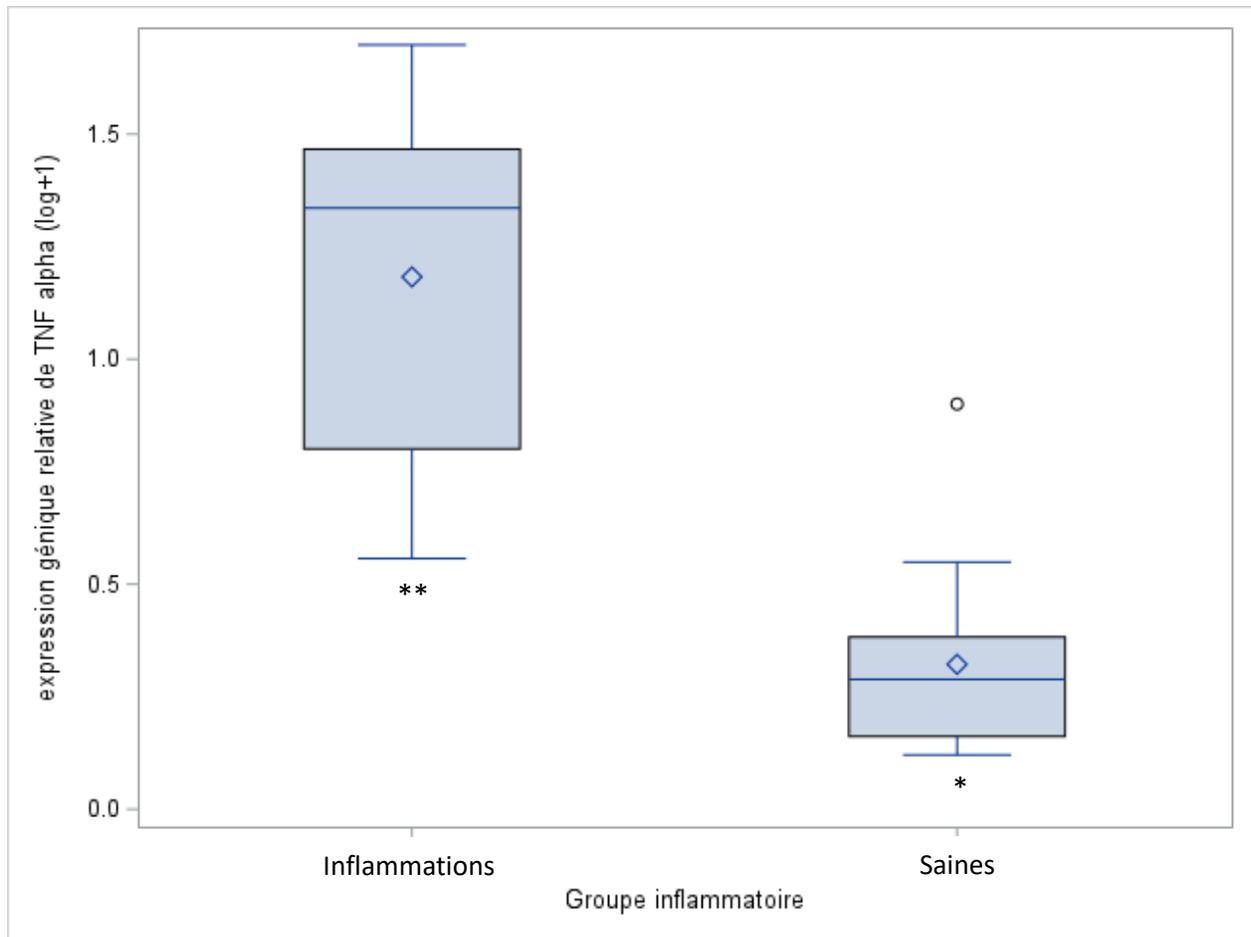


Figure 8. – Expression génique de TNF $\alpha$  en fonction de l'état inflammatoire

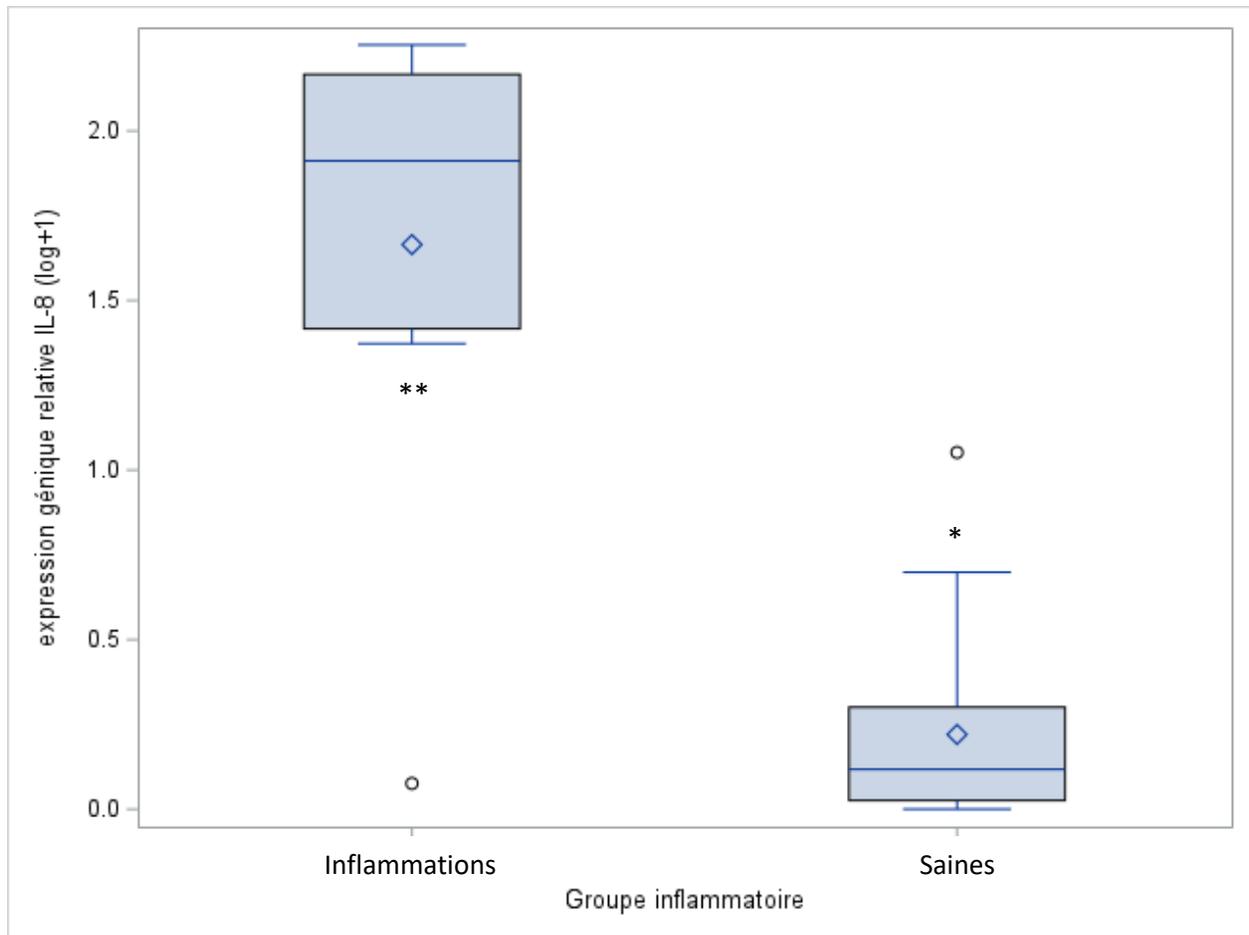


Figure 9. – Expression génique d’IL-8 en fonction de l’état inflammatoire

L’expression génique de TNF $\alpha$  et de IL-8 étaient significativement plus élevée chez le groupe de vaches avec inflammation par rapport au groupe de vaches considérées saines. Ces résultats concordent avec ceux obtenus dans plusieurs autres études. Dans le cas de TNF $\alpha$ , on rapporte dans certains cas une différence significative tandis que dans d’autres uniquement une tendance (Ghasemi et al.,2012; Loyi et al.,2013; Kim et al.,2014; Brodzki et al.,2015; Dadarwal et al.,2019). Même si ici l’augmentation de l’expression génique est clairement significative, on peut tout de même remarquer une plus grande variation dans le niveau d’augmentation de son expression en comparaison avec la distribution plus homogène d’IL-8 dans les cas positifs. Cette observation

vient également appuyer l'hypothèse qu'IL-8 soit un facteur avec un effet plus direct dans la réaction inflammatoire au niveau de l'utérus de la vache (Ghasemi et al.,2012). L'utilisation de la cytobrosse à des fins d'analyse génétique de l'endomètre s'avère encore une fois appropriée. Il serait intéressant de confirmer la répétabilité de ses résultats. L'utilisation de la cytobrosse afin d'analyser le compte de PMN s'est avéré une méthode efficace, mais peu d'information existe au niveau de sa précision pour l'analyse des interleukines. Il faudrait considérer dans une étude subséquente établir un protocole avec doublon afin d'obtenir deux analyses des interleukines pour la même vache et quantifier la concordance. La même analyse complétée ici aurait été intéressante d'un point de vue bactériologique. En effet, sélectionner un groupe de vaches positives en se basant sur un diagnostic bactériologique pour faire une analyse de l'expression des interleukines pourrait permettre d'amener une seconde comparaison entre l'approche inflammatoire et bactériologique. Plusieurs autres projets ont également rapporté l'évolution dans le temps des niveaux d'expression génique (Kim et al.,2014; Brodzki et al.,2015; Dadarwal et al.,2019). Un protocole cohorte considérant l'évolution de la charge bactérienne ainsi que l'évolution du niveau de concentration d'interleukines dans l'endomètre pourrait amener un aspect intéressant d'un point de vue du développement de la maladie.

En conclusion, ce résultat de notre projet pilote a confirmé la présence de réponse inflammatoire dans l'endomètre chez les vaches avec endométrite cytologique. Ces données viennent confirmer l'efficacité de cette méthode d'analyse tout en consolidant les analyses de notre recherche principale.

## Chapitre 4 - Discussion générale

Au niveau statistique, le milieu Tri-plate avec un seuil de >90 colonies a donné les meilleures performances au niveau de la concordance avec les résultats du VBLAB. Le milieu de culture Tri-plate est un milieu qui peut relativement bien s'implanter dans la routine sur la ferme. Étant donné que l'échantillon de l'endomètre prélevé avec la cytobrosse peut être directement utilisé pour inoculer le milieu de culture, les manipulations restent simples et rapides.

D'un point de vue du vétérinaire praticien ou d'un producteur, certaines critiques supplémentaires peuvent être faites. Au niveau du seuil critique de 90 colonies, il devient plus difficile à appliquer. Considérant que dans notre étude le décompte utilisé représentait seulement le dénombrement des sections Factors et MacConkey, on parle d'un minimum de 45 colonies sur un ou les deux milieux. À cette concentration, la distinction des colonies peut parfois être difficile étant donné l'agglomération de celles-ci. Ce constat cause une difficulté quant à l'application directe des résultats que nous avons obtenus. D'un point de vue scientifique, une solution à ce problème pourrait être de suggérer une dilution de l'échantillon avant l'inoculation. Il serait alors possible d'obtenir un comptage plus petit sur les milieux de cultures. Cependant, exiger une dilution signifie l'ajout d'une étape au processus d'analyse et pourrait probablement devenir un frein à l'utilisation en milieu commercial. Une autre option serait de diminuer le seuil critique utilisé sachant néanmoins ne pas être au niveau optimal de performance. Dans les faits, un seuil avoisinant 50 colonies serait beaucoup plus réaliste d'un point de vue pratique. Les résultats de notre étude montrent qu'à ce niveau, le milieu Tri-plate performait encore de façon satisfaisante (se= 73,3%, sp=89,9%). Considérant cette information,

les études subséquentes devraient tenter d'établir un seuil d'utilisation qui tiendrait compte des performances statistiques et du potentiel pratique.

Finalement, établir un seuil critique bactériologique fut également une difficulté dans ce projet. N'ayant aucune référence quant à l'utilisation des résultats d'un laboratoire de référence pour établir un seuil de charge bactérienne, il a été nécessaire de trancher arbitrairement cette valeur par nous-même. Une pré investigation a donc été complétée afin d'établir le seuil de notre test de référence. Sachant que le milieu de culture utilisé était fort propice à une contamination environnementale, des échantillons contrôles ont été pris. Afin d'imiter le plus possible la contamination d'un réel échantillon, les mêmes manipulations ont été complétée avec les cytobrosse contrôles, à l'exception que la cytobrosse soit exposée dans une solution saline (0,9% NaCl) plutôt qu'à l'intérieur du corps utérin. L'humidification de la cytobrosse permettait d'avoir un contrôle plus similaire à un vrai échantillon par rapport à une cytobrosse sèche. Une fois les résultats des contrôles obtenus, force était de constater que plusieurs bactéries étaient présentes sur les échantillons à des niveaux très variables allant d'une présence en enrichissement jusqu'à 1+. À partir de cette information, cibler un groupe de bactéries dans les contrôles et les considérées comme base de contamination aurait été une solution. Il aurait été par la suite possible de classer les vaches comme positives s'il y avait présence d'une ou plusieurs autres bactéries. Cette idée a été écartée pour plusieurs raisons. Dans un premier temps, l'objectif ici était d'avoir un test qui pourrait éventuellement s'implanter dans un contexte de ferme commerciale. Le résultat doit être obtenu rapidement sans avoir à compter sur des analyses extérieures. Dans cette optique, les producteurs doivent être en mesure de faire le diagnostic uniquement sur le décompte de bactéries plutôt que l'identification de souches. Dans un

deuxième temps, on ne peut pas considérer que toutes les bactéries présentes à l'intérieur de l'utérus sont forcément problématiques. Comme mentionné précédemment, plusieurs recherches mettent en évidence qu'une flore bactérienne saine est présente dans l'utérus et même que certaines souches peuvent être bénéfiques pour la santé utérine. Il aurait donc été nécessaire d'estimer également les souches présentes dans les échantillons qui ne sont pas nuisibles ou facteurs de risque dans le développement de l'endométrite. D'un point de vue fondamental, cette information peut être intéressante à connaître, mais cette analyse ainsi que ces résultats dépassaient largement l'objectif principal de ce projet de recherche.

La solution retenue fut donc d'analyser les données de décomptes bactériologiques obtenus dans notre échantillon en faisant varier le seuil critique de niveau de croissance bactérien du laboratoire de référence et ce, toutes bactéries confondues. La sommation de sensibilité et spécificité des deux milieux de cultures a été retenue comme variable d'intérêt. Pour ce qui a trait au laboratoire de référence, les niveaux de croissance rare, quelques colonies et 1+ ont été combinés.

La méthode d'analyse utilisée au laboratoire d'analyse vient également justifier l'utilisation du niveau de croissance 2+ comme seuil critique dans notre situation. Jusqu'au niveau de croissance 1+, la culture bactérienne est considérée comme étant primaire (voir figure 10). C'est donc dire que l'inoculation du milieu est faite directement à partir de l'échantillon récolté. L'analyse à ce niveau est donc sensible à la détection de faibles quantités de bactéries. À partir du niveau de croissance 2+, l'inoculation se fait par épuisement. Ce que ça signifie, c'est que l'inoculation du deuxième cadran (niveau de croissance 2+) est faite à partir d'un sous échantillon de l'inoculum du premier cadran. On vient donc diluer la concentration bactérienne de notre

échantillon initiale. Ces niveaux de croissance indiquent donc une importante charge bactérienne initiale qui nécessite une dilution afin d'identifier des souches spécifiques. Considérant le protocole utilisé dans notre projet de recherche et la confirmation d'une contamination bactérienne environnementale par les contrôles, il est évident que les niveaux de croissances faibles (en enrichissement, rare, quelques colonies) ne seraient pas vraiment applicables dans notre cas. De plus, utiliser un seuil critique plus élevé que 2+ viendrait à conclure que la plupart des échantillons avaient une concentration élevée de bactéries et qu'une dilution initiale aurait été souhaitable. C'est donc en tenant compte de toutes ces informations que le seuil critique de 2+ fut établi pour les analyses de notre projet.

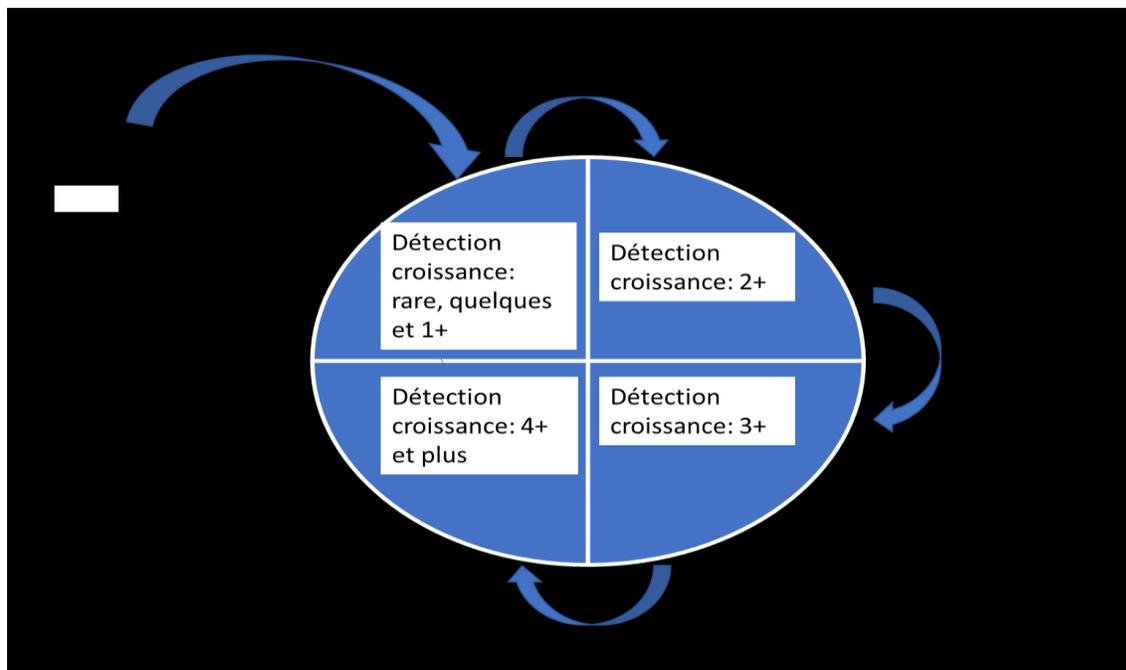


Figure 10. – Méthode de culture par épuisement utilisé au laboratoire de référence

Les analyses de cette étude mettent en évidence le potentiel d'une nouvelle voie de diagnostic de l'endométrite : l'analyse bactériologique. Autant au niveau de l'endométrite clinique que subclinique, l'efficacité d'un traitement antibiotique dans les cas positifs vient

montrer que le contrôle de la charge bactérienne sous-jacente joue un rôle important dans le rétablissement du cycle reproducteur de la vache. L'utilisation de la cytologie comme indicateur de l'inflammation de l'utérus est de plus en plus reconnue comme étant la méthode de référence. À la lumière de ces informations, il devient essentiel que d'autres projets de recherche se concentrent à éclaircir le manque de concordance entre nos résultats bactériologiques et l'état inflammatoire. Si l'hypothèse que les vaches négatives au niveau bactériologique présentent une inflammation principalement résiduelle s'avère juste, le potentiel d'amélioration de l'efficacité des traitements antibiotiques en se basant sur un dépistage bactériologique pourrait être important. Dans le même ordre d'idée, il serait être intéressant de tester des traitements alternatifs dans les cas où la culture bactérienne ne justifie pas l'utilisation d'un antibiotique. Avant d'avancer dans ce sens, il serait également important de faire le point sur la corrélation entre les résultats bactériologiques et l'amélioration les performances en reproduction. Très peu d'information porte en ce moment sur ce sujet. Notre projet d'étude étant principalement exploratoire, les ressources nécessaires (plusieurs visites des fermes, accès aux données vétérinaires de reproduction, nombre d'animaux enrôlées, nombre de fermes enrôlées) afin de compléter le suivi de la reproduction dans le temps et d'obtenir des analyses suffisamment puissantes d'un point de vue statistique n'étaient pas prévues.

## Chapitre 5 - Conclusion générale

L'objectif principal de ce projet était d'évaluer la capacité des milieux de culture bactériologiques utilisés sur des fermes à produire des résultats comparables à l'analyse bactériologique obtenue en laboratoire. Le milieu Petrifilm a obtenu un optimum de performance à un seuil de critique de >100 colonies pour une maximisation de la somme de sensibilité et spécificité de 129. Pour le milieu Tri-plate, l'optimum fut atteint à un seuil de >90 colonies pour une maximisation de la somme de sensibilité et spécificité de 167,6. Si la performance du milieu Tri-plate semble numériquement meilleure, des recherches supplémentaires sont nécessaires afin d'obtenir un protocole d'utilisation plus pratique. Un second objectif de ce projet était d'évaluer la concordance entre l'analyse cytologique et bactériologique de l'endométrite. En se basant sur nos résultats, 64 % des vaches positives d'un point de vue cytologique s'avèrent négative au niveau bactérien. C'est donc dire que plus de la moitié des vaches considérées positives avec la méthode diagnostique présentement utilisée ne présentent pas de contamination bactérienne importante. D'autres recherches sont nécessaires afin de bien comprendre cet écart de concordance et les répercussions possibles sur l'utilisation de traitements antibiotiques dans les cas d'endométrite chez la vache. Nos résultats supportent que l'utilisation de la culture bactérienne à la ferme puisse être une méthode alternative au diagnostic de l'endométrite avec un potentiel intéressant afin de préconiser une utilisation plus judicieuse des antibiotiques dans le traitement de cette maladie.

## Références bibliographiques

- Alarcon, P., C. Manosalva, M. D. Carretta, et al. (2018). "Fatty and hydroxycarboxylic acid receptors: The missing link of immune response and metabolism in cattle." Vet Immunol Immunopathol **201**: 77-87.
- Amos, M. R., G. D. Healey, R. J. Goldstone, et al. (2014). "Differential endometrial cell sensitivity to a cholesterol-dependent cytolysin links *Trueperella pyogenes* to uterine disease in cattle." Biol Reprod **90**(3): 54.
- Arango-Sabogal, J. C., J. Dubuc, C. Krug, et al. (2019). "Accuracy of leukocyte esterase test, endometrial cytology and vaginal discharge score for diagnosing postpartum reproductive tract health status in dairy cows at the moment of sampling, using a latent class model fit within a Bayesian framework." Preventive Veterinary Medicine **162**: 1-10.
- Ballas, P., U. Reinlander, R. Schlegl, et al. (2021). "Characterization of intrauterine cultivable aerobic microbiota at the time of insemination in dairy cows with and without mild endometritis." Theriogenology **159**: 28-34.
- Baranski, W., M. Podhalicz-Dziegielewska, S. Zdunczyk, et al. (2012). "The diagnosis and prevalence of subclinical endometritis in cows evaluated by different cytologic thresholds." Theriogenology **78**(9): 1939-1947.
- Barlund, C. S., T. D. Carruthers, C. L. Waldner, et al. (2008). "A comparison of diagnostic techniques for postpartum endometritis in dairy cattle." Theriogenology **69**(6): 714-723.
- Bertics, S. J., R. R. Grummer, C. Cadorniga-Valino, et al. (1992). "Effect of Prepartum Dry Matter Intake on Liver Triglyceride Concentration and Early Lactation." Journal of Dairy Science **75**(7): 1914-1922.
- Blowey, R. W. and P. Edmondson (2010). Mastitis control in dairy herds. Wallingford, CABI.
- Bonnett, B. N., R. B. Miller, W. G. Etherington, et al. (1991). "Endometrial biopsy in Holstein-Friesian dairy cows. I. Technique, histological criteria and results." Canadian journal of veterinary research **55**(2): 155-161.

- Brodzki, P., K. Kostro, A. Brodzki, et al. (2015). "Inflammatory cytokines and acute-phase proteins concentrations in the peripheral blood and uterus of cows that developed endometritis during early postpartum." Theriogenology **84**(1): 11-18.
- Call, D. R., M. A. Davis and A. A. Sawant (2008). "Antimicrobial resistance in beef and dairy cattle production." Animal health research reviews **9**(2): 159-167.
- Carneiro, L. C., J. G. Cronin and I. M. Sheldon (2016). "Mechanisms linking bacterial infections of the bovine endometrium to disease and infertility." Reprod Biol **16**(1): 1-7.
- Chen, G. Y. and G. Nuñez (2010). "Sterile inflammation: sensing and reacting to damage." NATURE REVIEWS IMMUNOLOGY **10**(12): 826-837.
- Cheong, S. H., D. V. Nydam, K. N. Galvao, et al. (2011). "Cow-level and herd-level risk factors for subclinical endometritis in lactating Holstein cows." Journal of Dairy Science **94**(2): 762-770.
- Cheong, S. H., D. V. Nydam, K. N. Galvao, et al. (2012). "Use of reagent test strips for diagnosis of endometritis in dairy cows." Theriogenology **77**(5): 858-864.
- Couto, G. B., D. H. Vaillancourt and R. C. Lefebvre (2013). "Comparison of a leukocyte esterase test with endometrial cytology for diagnosis of subclinical endometritis in postpartum dairy cows." Theriogenology **79**(1): 103-107.
- Dadarwal, D., P. Gonzalez-Cano, R. Dickinson, et al. (2019). "Characterization of cytokine gene expression in uterine cytobrush samples of non-endometritic versus endometritic postpartum dairy cows." Theriogenology **126**: 128-139.
- De Boer, M. W., S. J. LeBlanc, J. Dubuc, et al. (2014). "Invited review: Systematic review of diagnostic tests for reproductive-tract infection and inflammation in dairy cows." Journal of Dairy Science **97**(7): 3983-3999.
- Denis-Robichaud, J. and J. Dubuc (2015). "Determination of optimal diagnostic criteria for purulent vaginal discharge and cytological endometritis in dairy cows." Journal of Dairy Science **98**(10): 6848-6855.
- Denis-Robichaud, J. and J. Dubuc (2015). "Randomized clinical trial of intrauterine cephalosporin infusion in dairy cows for the treatment of purulent vaginal discharge and cytological endometritis." Journal of Dairy Science **98**(10): 6856-6864.

Dubuc, J. (2017). "Short communication: Diagnostic performance of on-farm bacteriological culture systems for identification of uterine Escherichia coli in postpartum dairy cows." Journal of Dairy Science **100**(4): 3079-3082.

Dubuc, J. and J. Denis-Robichaud (2017). "A dairy herd-level study of postpartum diseases and their association with reproductive performance and culling." Journal of Dairy Science **100**(4): 3068-3078.

Dubuc, J., T. F. Duffield, K. E. Leslie, et al. (2010). "Definitions and diagnosis of postpartum endometritis in dairy cows." Journal of Dairy Science **93**(11): 5225-5233.

Dubuc, J., T. F. Duffield, K. E. Leslie, et al. (2011). "Randomized clinical trial of antibiotic and prostaglandin treatments for uterine health and reproductive performance in dairy cows." Journal of Dairy Science **94**(3): 1325-1338.

European Food Safety, A., P. European Centre for Disease and Control (2018). "The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2016." EFSAJ **16**(2): e05182.

Flahault, A., M. Cadilhac and G. Thomas (2005). "Sample size calculation should be performed for design accuracy in diagnostic test studies." J Clin Epidemiol **58**(8): 859-862.

Foldi, J., M. Kulcsar, A. Pecs, et al. (2006). "Bacterial complications of postpartum uterine involution in cattle." Anim Reprod Sci **96**(3-4): 265-281.

Formigoni, A. and E. Trevisi (2003). "Transition cow: interaction with fertility." Veterinary research communications **27**(Suppl 1): 143-152.

Galvão, K. N., M. Frajblat, S. B. Brittin, et al. (2009). "Effect of prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  on subclinical endometritis and fertility in dairy cows." Journal of Dairy Science **92**(10): 4906-4913.

Ghasemi, F., P. Gonzalez-Cano, P. J. Griebel, et al. (2012). "Proinflammatory cytokine gene expression in endometrial cytobrush samples harvested from cows with and without subclinical endometritis." Theriogenology **78**(7): 1538-1547.

Gilbert, R. O. and N. R. Santos (2016). "Dynamics of postpartum endometrial cytology and bacteriology and their relationship to fertility in dairy cows." Theriogenology **85**(8): 1367-1374.

- Gilbert, R. O., S. T. Shin, C. L. Guard, et al. (2005). "Prevalence of endometritis and its effects on reproductive performance of dairy cows." Theriogenology **64**(9): 1879-1888.
- Grummer, R. R. (1995). "Impact of changes in organic nutrient metabolism on feeding the transition dairy cow." Journal of animal science **73**(9): 2820-2833.
- Grummer, R. R., D. G. Mashek and A. Hayirli (2004). "Dry matter intake and energy balance in the transition period." The Veterinary clinics of North America. Food animal practice **20**(3): 447-470.
- Hammon, D. S., I. M. Evjen, T. R. Dhiman, et al. (2006). "Neutrophil function and energy status in Holstein cows with uterine health disorders." Vet Immunol Immunopathol **113**(1-2): 21-29.
- Hogeveen, H., K. Huijps and T. J. Lam (2011). "Economic aspects of mastitis: new developments." New Zealand veterinary journal **59**(1): 16-23.
- Jabbour, H. N., K. J. Sales, R. D. Catalano, et al. (2009). "Inflammatory pathways in female reproductive health and disease." Reproduction (Cambridge, England) **138**(6): 903-919.
- Kabera, F. I., S. Dufour, G. Keefe, et al. (2020). "Evaluation of quarter-based selective dry cow therapy using Petrifilm on-farm milk culture: A randomized controlled trial." Journal of Dairy Science **103**(8): 7276-7287.
- Kasimanickam, R., T. F. Duffield, R. A. Foster, et al. (2004). "Endometrial cytology and ultrasonography for the detection of subclinical endometritis in postpartum dairy cows." Theriogenology **62**(1-2): 9-23.
- Kasimanickam, R., T. F. Duffield, R. A. Foster, et al. (2005). "A comparison of the cytobrush and uterine lavage techniques to evaluate endometrial cytology in clinically normal postpartum dairy cows." The Canadian veterinary journal **46**(3): 255-259.
- Kasimanickam, R., T. F. Duffield, R. A. Foster, et al. (2005). "The effect of a single administration of cephalosporin or cloprostenol on the reproductive performance of dairy cows with subclinical endometritis." Theriogenology **63**(3): 818-830.
- Kim, I. H., H. G. Kang, J. K. Jeong, et al. (2014). "Inflammatory cytokine concentrations in uterine flush and serum samples from dairy cows with clinical or subclinical endometritis." Theriogenology **82**(3): 427-432.

Knudsen, L. R., C. C. Karstrup, H. G. Pedersen, et al. (2016). "An investigation of the microbiota in uterine flush samples and endometrial biopsies from dairy cows during the first 7 weeks postpartum." Theriogenology **86**(2): 642-650.

Koch, B. J., B. A. Hungate and L. B. Price (2017). "Food-animal production and the spread of antibiotic resistance: the role of ecology." FRONTIERS IN ECOLOGY AND THE ENVIRONMENT **15**(6): 309-318.

LeBlanc, S. J. (2008). "Postpartum uterine disease and dairy herd reproductive performance: A review." The Veterinary Journal **176**(1): 102-114.

LeBlanc, S. J. (2012). "Interactions of metabolism, inflammation, and reproductive tract health in the postpartum period in dairy cattle." Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene **47**(Suppl 5): 18-30.

LeBlanc, S. J., T. F. Duffield, K. E. Leslie, et al. (2002). "Defining and Diagnosing Postpartum Clinical Endometritis and its Impact on Reproductive Performance in Dairy Cows." Journal of Dairy Science **85**(9): 2223-2236.

LeBlanc, S. J., T. F. Duffield, K. E. Leslie, et al. (2002). "The effect of treatment of clinical endometritis on reproductive performance in dairy cows." Journal of Dairy Science **85**(9): 2237-2249.

Loyi, T., H. Kumar, S. Nandi, et al. (2013). "Differential expression of pro-inflammatory cytokines in endometrial tissue of buffaloes with clinical and sub-clinical endometritis." Res Vet Sci **94**(2): 336-340.

Madoz, L. V., M. J. Giuliadori, A. L. Migliorisi, et al. (2014). "Endometrial cytology, biopsy, and bacteriology for the diagnosis of subclinical endometritis in grazing dairy cows." Journal of Dairy Science **97**(1): 195-201.

Madoz, L. V., I. Prunner, M. Jaureguiberry, et al. (2017). "Application of a bacteriological on-farm test to reduce antimicrobial usage in dairy cows with purulent vaginal discharge." Journal of Dairy Science **100**(5): 3875-3882.

Mansion-de Vries, E. M., N. Knorr, J. H. Paduch, et al. (2014). "A field study evaluation of Petrifilm™ plates as a 24-h rapid diagnostic test for clinical mastitis on a dairy farm." Preventive Veterinary Medicine **113**(4): 620-624.

- Mateus, L., L. L. da Costa, F. Bernardo, et al. (2002). "Influence of puerperal uterine infection on uterine involution and postpartum ovarian activity in dairy cows." Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene **37**(1): 31-35.
- McCarron, J. L., G. P. Keefe, S. L. McKenna, et al. (2009). "Laboratory evaluation of 3M Petrifilms and University of Minnesota Bi-plates as potential on-farm tests for clinical mastitis." Journal of Dairy Science **92**(5): 2297-2305.
- McDougall, S. (2001). "Effect of intrauterine antibiotic treatment on reproductive performance of dairy cows following periparturient disease." N Z Vet J **49**(4): 150-158.
- McDougall, S., H. Hussein, D. Aberdein, et al. (2011). "Relationships between cytology, bacteriology and vaginal discharge scores and reproductive performance in dairy cattle." Theriogenology **76**(2): 229-240.
- McDougall, S., R. Macaulay and C. Compton (2007). "Association between endometritis diagnosis using a novel intravaginal device and reproductive performance in dairy cattle." Animal Reproduction Science **99**(1-2): 9-23.
- Melendez, P., J. McHale, J. Bartolome, et al. (2004). "Uterine Involution and Fertility of Holstein Cows Subsequent to Early Postpartum PGF<sub>2</sub> $\alpha$  Treatment for Acute Puerperal Metritis\*." Journal of Dairy Science **87**(10): 3238-3246.
- Murphy, D., A. Ricci, Z. Auce, et al. (2017). "EMA and EFSA Joint Scientific Opinion on measures to reduce the need to use antimicrobial agents in animal husbandry in the European Union, and the resulting impacts on food safety (RONAFA)." EFSA Journal **15**(1): n/a-n/a.
- Potter, T. J., J. Guitian, J. Fishwick, et al. (2010). "Risk factors for clinical endometritis in postpartum dairy cattle." Theriogenology **74**(1): 127-134.
- Prunner, I., H. Pothmann, K. Wagener, et al. (2014). "Dynamics of bacteriologic and cytologic changes in the uterus of postpartum dairy cows." Theriogenology **82**(9): 1316-1322.
- Rensis, F. D. and R. J. Scaramuzzi (2003). "Heat stress and seasonal effects on reproduction in the dairy cow—a review." Theriogenology **60**(6): 1139-1151.

- Royster, E., S. Godden, D. Goulart, et al. (2014). "Evaluation of the Minnesota Easy Culture System II Bi-Plate and Tri-Plate for identification of common mastitis pathogens in milk." Journal of Dairy Science **97**(6): 3648-3659.
- Ruder, C. A., R. G. Sasser, R. J. Williams, et al. (1981). "Uterine infections in the postpartum cow:II. Possible synergistic effect of *Fusobacterium necrophorum* and *Corynebacterium pyogenes*." Theriogenology **15**(6): 573-580.
- Santos, T. M. A., R. O. Gilbert and R. C. Bicalho (2011). "Metagenomic analysis of the uterine bacterial microbiota in healthy and metritic postpartum dairy cows." Journal of Dairy Science **94**(1): 291-302.
- Sheldon, I. M. (2004). "The postpartum uterus." The Veterinary clinics of North America. Food animal practice **20**(3): 569-591.
- Sheldon, I. M., J. Cronin, L. Goetze, et al. (2009). "Defining postpartum uterine disease and the mechanisms of infection and immunity in the female reproductive tract in cattle." Biol Reprod **81**(6): 1025-1032.
- Sheldon, I. M., J. G. Cronin, G. D. Healey, et al. (2014). "Innate immunity and inflammation of the bovine female reproductive tract in health and disease." Reproduction (Cambridge, England) **148**(3): 41-51.
- Sheldon, I. M., G. S. Lewis, S. LeBlanc, et al. (2006). "Defining postpartum uterine disease in cattle." Theriogenology **65**(8): 1516-1530.
- Sheldon, I. M., E. J. Williams, A. N. Miller, et al. (2008). "Uterine diseases in cattle after parturition." Vet J **176**(1): 115-121.
- Singh, J., R. D. Murray, G. Mshelia, et al. (2008). "The immune status of the bovine uterus during the peripartum period." The Veterinary Journal **175**(3): 301-309.
- Tison, N., E. Bouchard, L. DesCoteaux, et al. (2017). "Effectiveness of intrauterine treatment with cephalosporin in dairy cows with purulent vaginal discharge." Theriogenology **89**: 305-317.
- Wagener, K., C. Gabler and M. Drillich (2017). "A review of the ongoing discussion about definition, diagnosis and pathomechanism of subclinical endometritis in dairy cows." Theriogenology **94**: 21-30.

Wehrend, A., K. Failing and H. Bostedt (2003). "Cervimetry and ultrasonographic observations of the cervix regression in dairy cows during the first 10 days post partum." Journal of veterinary medicine. A, Physiology, pathology, clinical medicine **50**(9): 470-473.

Westermann, S., M. Drillich, T. B. Kaufmann, et al. (2010). "A clinical approach to determine false positive findings of clinical endometritis by vaginoscopy by the use of uterine bacteriology and cytology in dairy cows." Theriogenology **74**(7): 1248-1255.

Whitman, W. B., D. C. Coleman and W. J. Wiebe (1998). "Prokaryotes: The Unseen Majority." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **95**(12): 6578-6583.

Williams, E. J., D. P. Fischer, D. E. Noakes, et al. (2007). "The relationship between uterine pathogen growth density and ovarian function in the postpartum dairy cow." Theriogenology **68**(4): 549-559.

Williams, E. J., D. P. Fischer, D. U. Pfeiffer, et al. (2005). "Clinical evaluation of postpartum vaginal mucus reflects uterine bacterial infection and the immune response in cattle." Theriogenology **63**(1): 102-117.

Williams, E. J., S. Herath, G. C. W. England, et al. (2008). "Effect of Escherichia coli infection of the bovine uterus from the whole animal to the cell\*." animal **2**(8): 1153-1157.

Wira, C. R., K. S. Grant-Tschudy and M. A. Crane-Godreau (2005). "Epithelial Cells in the Female Reproductive Tract: a Central Role as Sentinels of Immune Protection." American Journal of Reproductive Immunology **53**(2): 65-76.

Zebeli, Q., K. Ghareeb, E. Humer, et al. (2015). "Nutrition, rumen health and inflammation in the transition period and their role on overall health and fertility in dairy cows." Research in Veterinary Science **103**: 126-136.

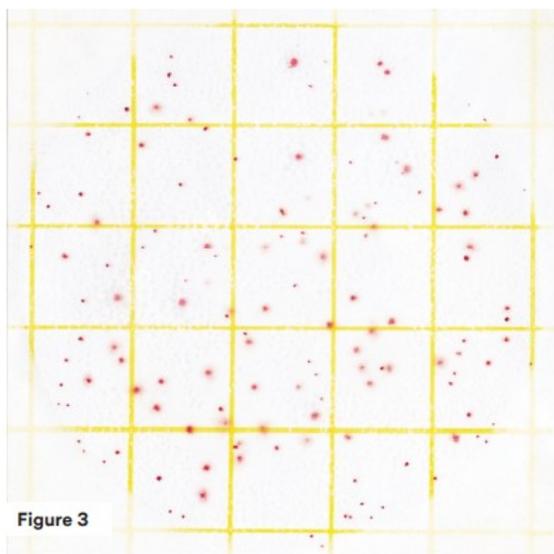
Zerbe, H., N. Schneider, W. Leibold, et al. (2000). "Altered functional and immunophenotypical properties of neutrophilic granulocytes in postpartum cows associated with fatty liver." Theriogenology **54**(5): 771-786.

Zhou, Z., D. P. Bu, M. Vailati Riboni, et al. (2015). "Prepartal dietary energy level affects peripartal bovine blood neutrophil metabolic, antioxidant, and inflammatory gene expression." Journal of Dairy Science **98**(8): 5492-5505.

## Annexes

### Annexe 1. Méthode de décompte de colonie sur Petrifilm

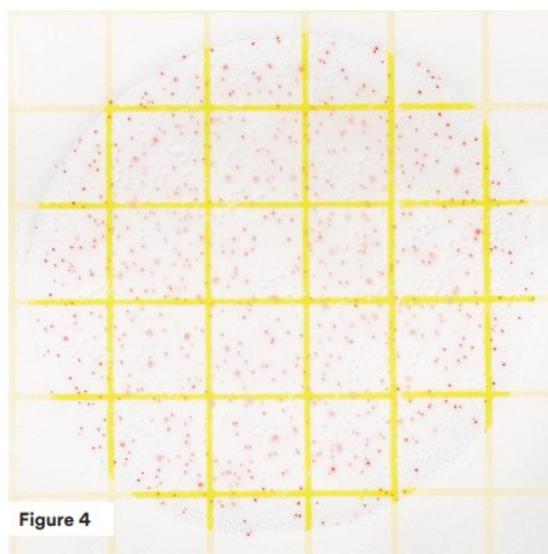
([petrifilm-aerobic-interpretation-guide.pdf \(3m.com\)](#), 3M, London, Canada; consulté le 20 octobre 2019)



**Figure 3**

**Nombre de colonies de bactéries aérobies = 143**

La plage de numération recommandée sur la Plaque de numération rapide des bactéries aérobies Petrifilm™ 3M™ est inférieure ou égale à 300 colonies.



**Figure 4**

**Nombre de colonies de bactéries aérobies  
estimé = 560**

Lorsque le nombre de colonies est supérieur à 300, estimer le nombre. Déterminer le nombre moyen de colonies dans un carré (1 cm<sup>2</sup>) et le multiplier par 20 pour obtenir le nombre total de colonies par plaque. La surface inoculée sur une Plaque de numération des bactéries aérobies Petrifilm™ 3M™ est d'environ 20 cm<sup>2</sup>.

*Pour une numération plus précise, une dilution supplémentaire de l'échantillon peut s'avérer nécessaire.*

## Annexe 2. Séquence des amorces utilisées pour la QPCR d'ARNm

Gène	Séquence de l'amorce (5'-3')	Direction de l'amorce
<i>RPL19<sup>a</sup></i>	AGCCTGTGACTGTCCATTCC	S
	ACGTTACCTTCTCGGGCATT	AS
<i>TNF</i>	GTCAACATCCTGTCTGCCATC	S
	AAAGTAGACCTGCCCAGACTC	AS
<i>IL-8</i>	CGATGCCAATGCATAAAAAC	S
	CTTTCCTTGGGGTTTAGGC	AS

a. Gène de référence ; S=sens ; AS=anti sens.