

Université de Montréal

Effet d'un traitement intra-utérin de céphapirine sur les performances en reproduction des vaches laitières

par

José Denis-Robichaud

Département de sciences cliniques

Faculté de médecine vétérinaire

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

Septembre 2013

© José Denis-Robichaud, 2013

Résumé

La reproduction est un pilier majeur de la productivité des fermes laitières. Dans ce contexte, il est pertinent d'identifier à l'avance les animaux à risque d'avoir des performances en reproduction sous-optimales, surtout si un traitement efficace est disponible pour améliorer ces performances. Les endométrites clinique et subclinique sont des conditions définies selon leur impact sur les performances en reproduction subséquentes et donc, des outils très intéressants de surveillance de la santé utérine. Le premier objectif de cette étude était de déterminer simultanément des seuils diagnostiques pour les endométrites clinique (diagnostiquée par le Metricheck) et subclinique (diagnostiquée par la cytologie endométriale ou par l'estérase leucocytaire) selon leur impact sur les performances en reproduction à la première saillie. L'écoulement vaginal purulent a été identifié comme seuil pour l'endométrite clinique, alors que les seuils identifiés pour l'endométrite subclinique ont été un pourcentage de polymorphonucléaires de 6% à la cytologie et une « forte quantité de leucocytes » à l'estérase leucocytaire. Le second objectif de l'étude était d'évaluer l'effet d'un traitement intra-utérin de céphapirine sur les performances à la première saillie des animaux sains et atteints d'endométrite. Aucun effet du traitement n'a été observé chez les vaches saines ou atteintes d'endométrite clinique, alors qu'une tendance à l'amélioration des performances a été associée au traitement chez celles atteintes d'endométrite subclinique. L'anovulation post-partum prolongée pourrait altérer l'efficacité du traitement de céphapirine, surtout chez les vaches atteintes d'endométrite clinique.

Mots-clés : anovulation, céphapirine, endométrite, infusion intra-utérine, outil diagnostique, reproduction, surveillance, traitement, vache laitière

Abstract

Reproduction is a major concern in the dairy industry. In this context, it is relevant to have an early identification of cows at risk of altered subsequent reproductive performance, especially if a treatment is available and effective to improve this performance. Clinical and subclinical endometritis are defined based on their impact on reproductive performance and are interesting tools for reproductive tract health surveillance. The first objective of this research project was to determine simultaneously diagnostic criteria for clinical (diagnosed by Metricheck) and subclinical (diagnosed by endometrial cytology or leukocyte esterase testing) endometritis based on their impact on reproductive performance at first service. Clinical endometritis was defined as presence of purulent vaginal discharge whereas subclinical endometritis was defined as presence of $\geq 6\%$ of polymorphonuclear cells using endometrial cytology or the presence of “large amount of leukocytes” using leukocyte esterase testing. The second objective of this research project was to determine the effect of an intrauterine infusion of cephalosporin on the reproductive performance at first service in cows with clinical endometritis, subclinical endometritis, and in cows unaffected by endometritis. Cephalosporin treatment had no effect on first service pregnancy risk in unaffected cows or in cows affected by clinical endometritis. However, there was a tendency of a positive effect of the treatment in cows affected by subclinical endometritis. Presence of prolonged postpartum anovulation in cows may reduce the efficacy of the cephalosporin treatment, especially in cows affected by clinical endometritis.

Keywords : anovulation, cephalosporin, dairy cows, diagnostic tool, endometritis, intrauterine infusion, reproduction, surveillance, treatment

Table des matières

Liste des tableaux.....	iv
Liste des figures	vi
Liste des sigles et des abréviations.....	vii
Introduction	1
Revue de littérature	3
I. Contamination utérine post-partum	3
I.I Caractéristiques bactériennes	4
I.II Immunité péri-partum	8
II. Pathologies du système reproducteur.....	13
II.I Endométrite subclinique.....	14
II.II Endométrite clinique	22
Objectifs	29
Article 1. Definition and diagnosis of clinical and subclinical endometritis in dairy cows based on their impact on reproductive performance.....	30
Article 2. Impact of intrauterine cephalosporin infusion on first service reproductive performance in postpartum dairy cows	49
Discussion générale	68
I. Diagnostic et définitions de l'endométrite.....	68
I.I Seuils	69
I.II Outils diagnostiques.....	70
II. Prévalence.....	70
III. Efficacité du traitement intra-utérin de céphalosporine	71
IV. Retour sur le protocole	73
V. Pistes d'avenir	74
Conclusion.....	76
Bibliographie	77

Liste des tableaux

Article 1

Table 1. Akaike Information Criterion (AIC) values for models predicting pregnancy status at first service for various diagnostic criterion combinations of vaginal discharge and endometrial cytology test results stratified by their disease status at 35 (± 7) DIM in 800 Holstein dairy cows.....	45
Table 2. Akaike Information Criterion (AIC) values for models predicting pregnancy status at first service for various diagnostic criterion combinations of vaginal discharge and leukocyte esterase test results stratified by their disease status at 35 (± 7) DIM in 623 Holstein dairy cows.....	46
Table 3. Prevalence of endometritis status identified using vaginal discharge score (below and at or above 4) for clinical endometritis, and endometrial cytology (polymorphonuclear percentage below and at or above 6) or leukocyte esterase testing (below and at or above 3) for subclinical endometritis.	47
Table 4. Ability of vaginal discharge score, endometrial cytology, and leukocyte esterase (LE) testing used individually, in series or in parallel in Holstein cows at 35 (± 7) DIM to predict non-pregnancy status at first service using the area under the curve (AUC), the sensitivity (Se), the specificity (Sp), the positive and negative predictive values (PPV, NPV).	48

Article 2

- Table 1.** Crude associations of intrauterine cephalosporin treatment at 35 (± 7) DIM with prolonged anovulation period and first service pregnancy risk in dairy cows with clinical endometritis diagnosed by vaginal discharge score (purulent or worse) and subclinical endometritis diagnosed by endometrial cytology (polymorphonuclear percentage ≥ 6) or leukocyte esterase (LE \geq large amount of leukocytes), and in unaffected cows. 64
- Table 2.** Logistic regression models investigating the association between pregnancy risk at first service and intrauterine cephalosporin treatment in Holstein dairy cows diagnosed with endometritis at 35 (± 7) DIM using various testing strategies. 65
- Table 3.** Logistic regression models for first service pregnancy risk considering the effect of intrauterine cephalosporin treatment in dairy cows according to their endometritis status (diagnosed using vaginal discharge scoring for clinical endometritis and endometrial cytology for subclinical endometritis) and stratified by their prolonged anovulation status..... 66
- Table 4.** Logistic regression models for first service pregnancy risk considering the effect of intrauterine cephalosporin treatment in dairy cows according to their endometritis status (diagnosed using vaginal discharge scoring for clinical endometritis and leukocyte esterase testing for subclinical endometritis) and stratified by their prolonged anovulation status. 67

Liste des figures

- Figure 1** – Proportion de vaches ayant une bactériologie utérine positive selon les jours en lait, adapté des résultats ● d’Elliott et coll. (1968), ▲ Griffin et coll. (1974), ■ McDougall et coll. (2011) et ◆ Sheldon et coll. (2002b). 4
- Figure 2** – Pourcentage de vaches ayant une bactériologie utérine positive (tous) et le pourcentage de vaches ayant une bactériologie utérine positive à *Trueperella pyogenes* (*T. pyogenes*), à *Escherichia coli* (*E. coli*), aux streptocoques α -hémolytiques ou aux staphylocoques coagulase-négative à ■ 10 et ■ 24 jours en lait, adapté des résultats de Werner et coll. (2012). 5
- Figure 3** – Schéma adapté de Wathes et coll. (2007) représentant les divers impacts que la balance énergétique négative des vaches laitières peut avoir sur leur fertilité. 11
- Figure 4** – Schéma adapté de Dubuc (2012) représentant une approche contemporaine pour établir les définitions (critères diagnostiques) des maladies utérines dites chroniques. Les critères diagnostiques sont les seuils à partir desquels un impact négatif sur les performances en reproduction subséquentes est associé. 14
- Figure 5** – Schéma adapté de Dubuc et coll. (2010a) représentant la classification des pathologies utérine post-partum à 35 jours après la parturition. Trois statuts sont possibles : écoulement vaginal purulent (EVP) seulement (région gris foncé), endométrite cytologique (CYTO) seulement (région blanche), ou écoulement vaginal purulent et endométrite cytologique simultanés (région gris pâle). 22
- Figure 6** – Schéma inspiré d’Osawa et coll. (2011) représentant les pathologies inflammatoires reproductrices observées à cinq semaines après la parturition soit l’écoulement vaginal purulent (EVP; région blanche), l’endométrite cytologique (CYTO_U; région grise) et la cervicite (CYTO_C; région hachurée). Les trois conditions sont observées indépendamment et concomitantes chez les vaches laitières. 24

Liste des sigles et des abréviations

AGNE :	Acides gras non estérifiés
AIC :	Akaike Information Criterion (critère d'information d'Akaike)
AUC :	Area under the curve
CI :	Confidence interval
CLIN :	Clinical endometritis (endomérite clinique)
CYTO :	Endomérite cytologique
DIM :	Days in milk
EVP :	Écoulement vaginal purulent
IGF :	Insulin-like growth factor
JEL :	Jours en lait
JO :	Jours ouverts
LE :	Leucocyte esterase
n :	Nombre
NPV :	Negative predictive value
OR :	Odds ratio
P4 :	Progesterone
PCR :	Polymerase chain reaction (réaction en chaîne de la polymérase)
PGF2 α :	Prostaglandines F2 alpha
PMN :	Polymorphonuclear cells (polymorphonucléaires)
PPV :	Positive predictive value
RC :	Rapport des cotes
ROC :	Receiver operating characteristic
Se :	Sensitivity
Sp :	Specificity
SUBCLIN :	Subclinical endometritis (endomérite subclinique)
TNF :	Tumor necrosis factor (facteur de nécrose tumorale)
VD :	Vaginal discharge

*À Maude,
Merci de me rappeler chaque jour
que la vie c'est maintenant*

Remerciements

Évidemment, je me dois de remercier Dr Jocelyn Dubuc pour m'avoir offert cette opportunité de poursuivre mes études dans un domaine qui m'intéresse autant. Merci de m'avoir initié à la recherche et de m'avoir aussi bien dirigé dans ce projet de maîtrise. J'ai vraiment apprécié chaque nouveau défi que tu me proposais et je crois sincèrement que tu as réussi à me transmettre ta passion.

Je tiens également à remercier Dr Luc DesCôteaux de m'avoir initialement permis de contribuer à un projet de recherche. Ce fût sans doute l'étincelle nécessaire qui m'a amené à vouloir contribuer à mon tour à l'avancement des connaissances grâce à la recherche clinique.

Je veux aussi remercier Dr Réjean Lefebvre, Dre Christiane Girard, Dre Julie Arsenault et Dr Simon Dufour pour leur enseignement, leurs conseils et suggestions, leur vision des choses et tout ce qu'ils ont su m'apporter. J'ai beaucoup appris au cours de ces deux années et je vous en suis très reconnaissante.

Un merci tout spécial à Dr Guillaume Boulay qui a su m'encourager, me conseiller et certainement m'éviter une ou deux élucubrations (comme dans : apprendre des erreurs des autres). Tu as été un excellent modèle et je me considère privilégiée de t'avoir côtoyé.

Merci à Dr Nicolas Tison pour tous les précieux conseils qui ont facilité la mise en place et le bon déroulement de ce projet.

Ce projet n'aurait pas été le même sans l'aide inestimable de Jean-Philippe Pelletier. Merci d'avoir été le technicien de recherche le plus curieux, efficace et dévoué. Je remercie également Christine Ouellet et Catherine B. Loubier pour leur participation au projet.

Je tiens à remercier tous les producteurs laitiers qui ont participé à ce projet d'envergure qui aurait tout simplement été impossible sans eux. Leur intérêt à participer à l'avancement des connaissances est incroyable, mais surtout très apprécié. Bien sûr, je me

dois de remercier tous les vétérinaires (toi aussi Jean-Philippe Roy!) qui ont contribué à la mise en place de ce projet et au suivi subséquent.

Un merci spécial à mes parents, Diane Denis et Dominique Robichaud, pour m'avoir transmis les valeurs essentielles à la recherche : la curiosité, le désir d'accomplissement, la passion... Je veux également remercier tous mes proches, et particulièrement Pascal Fontaine pour sa présence et son soutien. Tu as été une source d'inspiration, vraiment.

Finalement, un tel projet nécessite un soutien financier considérable. Je tiens à remercier Merck Santé Animale pour sa généreuse participation, ainsi que le Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada ainsi que Novalait pour leur appui dans la poursuite de mes études graduées.

Introduction

Une bonne gestion de la reproduction des vaches laitières est souhaitable afin d'optimiser l'efficacité et la rentabilité de leur production. En effet, une cible majeure des entreprises laitières est de favoriser le retour rapide à la gestation des vaches suite à leur parturition afin de maximiser la portion de leur vie passée dans la partie la plus profitable de leur production (LeBlanc, 2007). Il est donc primordial que les vaches éliminent la contamination utérine bactérienne qui est présente pendant les deux semaines suivant leur parturition (Griffin et coll., 1974, Olson et coll., 1984, Sheldon et coll., 2002b), ainsi qu'elles éliminent l'inflammation associée à cette infection pour permettre leur retour à la reproduction (Sheldon et Dobson, 2004, LeBlanc, 2008). Heureusement, une vaste majorité des vaches élimineront d'elles-mêmes les bactéries présentes tôt dans la période post-partum (Elliott et coll., 1968, Griffin et coll., 1974). Une persistance de l'infection et de l'inflammation du système reproducteur chez certaines vaches semble s'expliquer d'une part par les caractéristiques des bactéries impliquées et, d'autre part, par les capacités du système immunitaire de la vache à éliminer ces pathogènes (Williams et coll., 2005, Sheldon et coll., 2009).

Plusieurs études ont mis en évidence une association entre la présence tardive (plus d'un mois post-partum) d'inflammation au niveau du tractus reproducteur des vaches et une altération de leurs performances en reproduction subséquentes (LeBlanc, 2008). En effet, les définitions d'endométrite clinique et subclinique ont été établies basées sur leur impact négatif sur les performances en reproduction subséquentes des vaches (LeBlanc et coll., 2002a, Kasimanickam et coll., 2004, Dubuc et coll., 2010a). La surveillance de ces deux conditions permet donc d'avoir une indication de la santé utérine post-partum dans une population en plus d'identifier les vaches plus à risque d'avoir des performances reproductrices altérées pour, éventuellement, les traiter.

Ainsi, divers traitements intra-utérins ont été proposés dans la littérature pour contrer l'impact négatif sur les performances en reproduction subséquentes (Thurmond et

coll., 1993, LeBlanc et coll., 2002b, Kasimanickam et coll., 2004). Bien que ces études aient identifié l'impact positif de certains traitements pour les vaches atteintes d'endométrite clinique ou subclinique, il est pertinent de cibler le plus précisément possible la population de vaches qui bénéficient d'un tel traitement. De plus, l'utilisation judicieuse des antibiotiques étant une priorité pour les vétérinaires, le choix d'un traitement devrait être appuyé par son efficacité théorique (spectre d'action, concentration minimale inhibitrice, etc.), par l'identification d'un bénéfice à son utilisation par rapport à aucun traitement et, idéalement, par l'homologation de son usage chez les vaches laitières..

Bien que la littérature sur la santé reproductrice des vaches laitières soit abondante, certains aspects doivent encore être approfondis afin d'en améliorer la compréhension globale. Concernant le traitement des conditions du système reproducteur, l'infusion intra-utérine de céphapirine est de plus en plus utilisée dû à son homologation et à son effet positif sur les performances en reproduction des vaches ayant eu un diagnostic d'endométrite clinique (LeBlanc et coll., 2002b, Runciman et coll., 2008). Un impact positif a également été identifié chez les vaches atteintes d'endométrite subclinique (excluant les animaux atteints d'endométrite clinique; Kasimanickam et coll., 2005b), mais l'effet du traitement n'a jamais été évalué en tenant compte simultanément des endométrites clinique et subclinique.

Revue de littérature

Les connaissances sur la reproduction des vaches laitières et leur santé utérine sont vastes. Bien que plusieurs réponses se trouvent dans la littérature, certaines questions demeurent en suspens. Cette revue de littérature ne se veut donc pas systématique, mais plutôt critique afin de mettre en lumière et en perspective les aspects que la recherche n'a pas encore su expliquer complètement.

I. Contamination utérine post-partum

Pendant la gestation, la lumière utérine est stérile (Foldi et coll., 2006). C'est au moment de la parturition que le tractus reproducteur des vaches laitières se transforme pour permettre l'expulsion du fœtus. Les changements anatomiques engendrés tels la relaxation vestibulo-vaginale et la dilatation du col utérin créent une brèche dans la barrière physique qui protège le milieu utérin contre les bactéries de l'environnement. Des bactéries au niveau utérin ont effectivement été identifiées chez plus de 90% des vaches dans les deux semaines suivant la parturition, ce qui suggère une contamination utérine chez la quasi-totalité des vaches (Griffin et coll., 1974, Olson et coll., 1984, Sheldon et coll., 2002b). Par la suite, la proportion de vaches ayant une culture bactérienne utérine positive diminue au fil du temps, ce qui occasionne une élimination tardive des pathogènes chez certaines vaches, comme l'illustre la Figure 1.

Un lien étroit existe entre la présence de bactéries utérines et l'inflammation des tissus utérins (Sheldon et coll., 2001, Williams et coll., 2005). Par contre, l'inflammation du tractus reproducteur ainsi que les pathologies utérines ont été identifiées sans présence concomitante de bactéries (McDougall et coll., 2011), ce qui laisse suspecter une persistance de l'inflammation suite à l'élimination des pathogènes. Comme la persistance des bactéries et de l'inflammation au niveau du tractus reproducteur des vaches est associée à une altération des performances en reproduction subséquentes de celles-ci (Sheldon et coll., 2006, LeBlanc et coll., 2011), il est intéressant de comprendre les facteurs qui l'influencent, soit

les caractéristiques des bactéries impliquées et la réponse immunitaire des vaches face à ces agents pathogènes.

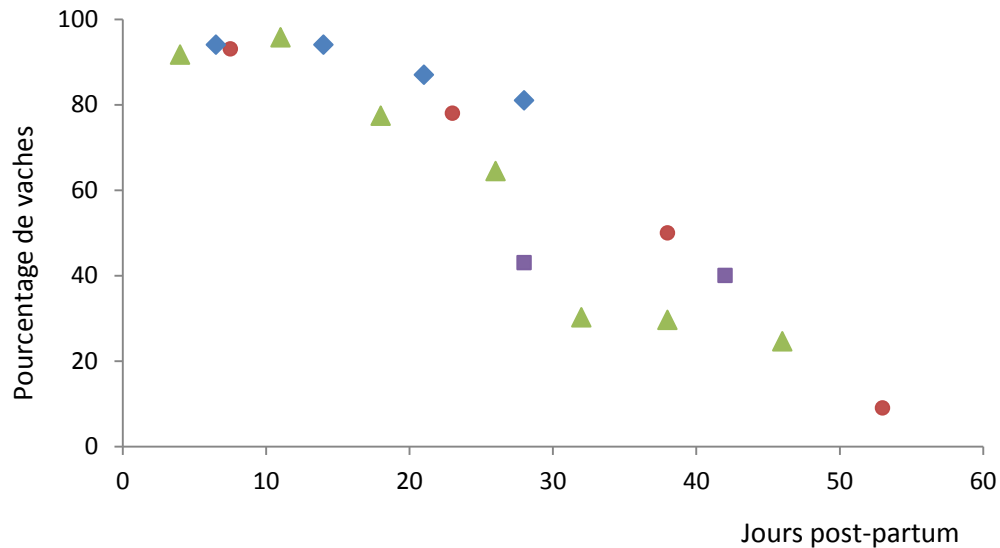


Figure 1 – Proportion de vaches ayant une bactériologie utérine positive selon les jours en lait, adapté des résultats ● d'Elliott et coll. (1968), ▲ Griffin et coll. (1974), ■ McDougall et coll. (2011) et ◆ Sheldon et coll. (2002b).

I.1 Caractéristiques bactériennes

Les bactéries impliquées dans la contamination utérine post-partum n'ont pas toutes un impact équivalent sur le futur reproducteur des vaches. En effet, le type de bactéries, la période à laquelle elles sont présentes, leur concentration et leurs facteurs de virulence sont des caractéristiques influentes.

I.1.1 Type de bactéries

Les études bactériologiques de la flore utérine des vaches laitières ont identifié la présence de plus de 30 espèces bactériennes grâce à la culture (Sheldon et coll., 2002b, Williams et coll., 2005). D'autres souches bactériennes ont récemment été identifiées dans la flore utérine bovine grâce à une technique ne requérant pas de culture (PCR; Santos et coll.,

2011). Cette nouvelle technique souligne une limite des études bactériologiques puisque l'utilisation des techniques usuelles requérant la culture peut entraîner un biais de mesure en n'identifiant pas tous les pathogènes. Il faut par contre mentionner que le PCR peut identifier des bactéries mortes ou des contaminants, ce qui en fait une technique moins spécifique que la culture (Santos et coll., 2011). Les principales bactéries isolées de l'utérus des vaches pendant la période post-partum sont *Escherichia coli*, *Trueperella pyogenes* (anciennement *Arcanobacterium pyogenes*), *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Fusobacterium necrophorum*, *Prevotella melaninogenica* et *Proteus* spp. (Griffin et coll., 1974, Miller et coll., 1980, Hussain et coll., 1990, Sheldon et coll., 2002b, Williams et coll., 2005). La population bactérienne utérine ne semble pas constante pendant la période post-partum et la proportion de vaches ayant une bactériologie positive varie selon les jours en lait (JEL), mais aussi selon les agents bactériens (Figure 2).

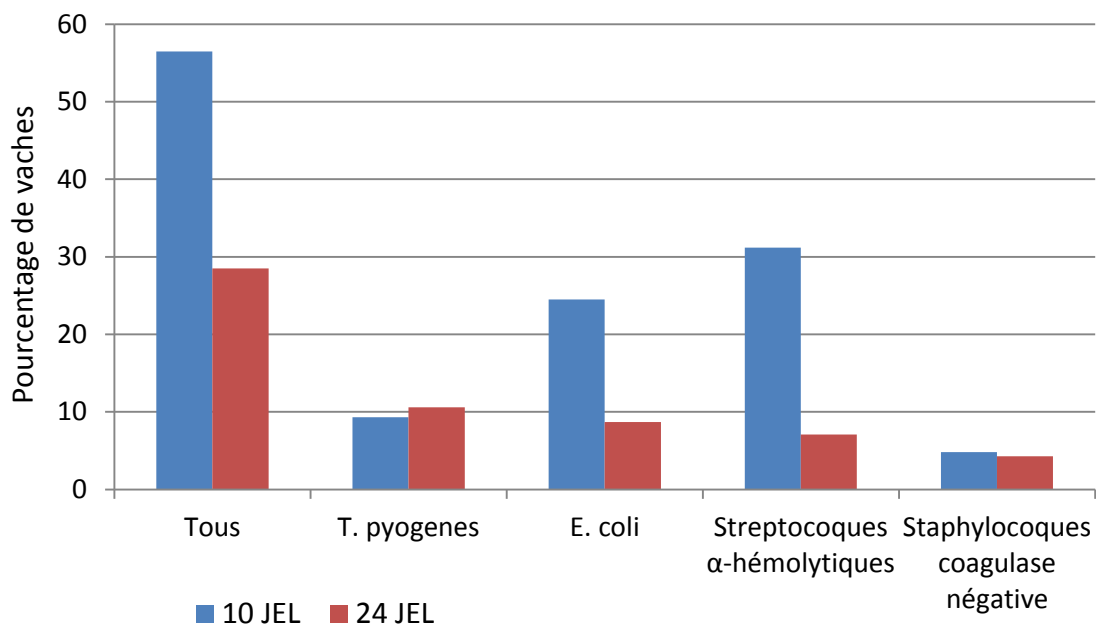


Figure 2 – Pourcentage de vaches ayant une bactériologie utérine positive (tous) et le pourcentage de vaches ayant une bactériologie utérine positive à *Trueperella pyogenes* (*T. pyogenes*), à *Escherichia coli* (*E. coli*), aux streptocoques α-hémolytiques ou aux staphylocoques coagulase-négative à ■ 10 et ■ 24 jours en lait, adapté des résultats de Werner et coll. (2012).

Les microorganismes identifiés au niveau utérin ne sont conséquemment pas tous considérés comme pathogènes et une classification catégorisant les bactéries comme pathogènes, potentiellement pathogènes et contaminants opportunistes est couramment utilisée (Sheldon et coll., 2002b, Williams et coll., 2005). Les bactéries classiquement reconnues comme pathogènes sont *Trueperella pyogenes*, *Escherichia coli*, *Prevotella melaninogenica*, *Fusobacterium necrophorum* et *Proteus* spp. (Huszenicza et coll., 1999, Williams et coll., 2005). Ces agents ont été identifiés comme pathogène en raison de leur présence au niveau utérin corrélée à la présence de lésions endométriales (Bonnett et coll., 1993) et associée à certaines pathologies utérines (Olson et coll., 1984, Noakes et coll., 1991). Il est important de noter que la présence d'autres bactéries, dites potentiellement pathogènes, ont été associées à la présence de conditions utérines, mais pas aux lésions utérines (Williams et coll., 2005). Une limite de la classification des bactéries pathogènes, potentiellement pathogènes et opportunistes est qu'elle a été effectuée à partir d'études où la taille d'échantillon était petite, le design d'étude était inadéquat (étude transversale, animaux malades ou sains seulement), les analyses étaient mal adaptées (effet d'agrégation, facteurs confondants, mesures répétées) ou non décrites (Olson et coll., 1984, Noakes et coll., 1991, Bonnett et coll., 1993, Huszenicza et coll., 1999). Souvent, la présence de ces agents a été associée à des conditions utérines (pyomètre, métrite, endométrite), mais peu de résultats sont disponibles sur leur association avec les performances en reproduction (Bonnett et coll., 1993). Il serait intéressant de proposer une classification des bactéries isolées au niveau utérin pendant la période post-partum qui tienne compte de leur impact sur la reproduction subséquente des vaches en plus de leur association avec le risque de pathologies utérines.

I.I.II Charge bactérienne

En plus du type de bactéries impliquées, leur concentration et la période à laquelle elles sont présentes jouent un rôle dans leur pathogénicité. Une forte concentration bactérienne des espèces pathogènes tôt dans la première semaine post-partum a été associée à une altération de la croissance et de la fonction ovarienne (Sheldon et coll., 2002b,

Williams et coll., 2005), alors qu'une forte concentration bactérienne de ces espèces dans les troisièmes et quatrièmes semaines post-partum a été associée à une augmentation du risque d'endométrite clinique dans cette même période (Williams et coll., 2005). En analysant l'impact de différentes bactéries pathogènes individuellement, la présence d'*Escherichia coli* à 10 JEL et de *Trueperella pyogenes* à 35 JEL sont toutes deux associées à la métrite puerpérale, alors que la présence d'*Escherichia coli* à 2 JEL et de *Trueperella pyogenes* à 35 JEL sont associées à la présence de matériel purulent au niveau utérin à 35 JEL (Machado et coll., 2012). Bien que les bactéries pathogènes semblent être associées à différents problèmes reproducteurs, leur lien avec les performances en reproduction subséquentes est rarement mis en évidence. Une forte concentration de *Trueperella pyogenes* à 21 et 28 JEL a été associée à une augmentation de l'intervalle entre la parturition et la saillie fécondante (Williams et coll., 2005), alors que l'absence d'*Escherichia coli* à 2 JEL a été associée à une augmentation du risque de gestation (Machado et coll., 2012). D'autres études n'ont pas pu associer la présence des différentes bactéries pathogènes aux performances en reproduction des vaches laitières, mais leur période d'échantillonnage était plus tardive (28-42 JEL) et la concentration bactérienne n'était pas considérée dans ces analyses (Huszenicza et coll., 1999, McDougall et coll., 2011).

I.I.III Facteurs de virulence

Non seulement le type de bactéries a un impact sur la santé utérine, mais les différentes souches d'une même bactérie peuvent faire varier cet impact. En effet, les souches d'*Escherichia coli* qui sont présentes dans l'utérus des vaches ayant de l'inflammation endométriale sont différentes des souches connues affectant les autres systèmes (*i.e.* digestif; Sheldon et coll., 2010). *In vitro*, les bactéries isolées d'utérus enflammés ont une meilleure capacité d'adhésion et d'invasion des cellules endométriales et mésenchymateuses que celles isolées d'utérus sains (Sheldon et coll., 2010). *In vivo*, la présence du gène de virulence d'*Escherichia coli fimH*, codant pour un composant du pilus de type 1, lorsque présent à 1-7 JEL est associé à l'augmentation du risque de métrite et d'endométrite clinique (Bicalho et coll., 2010, Bicalho et coll., 2012). D'autres gènes de

virulence d'*Escherichia coli* tels que *hlyA*, *cdt*, *kpsMIII*, *ibeA*, et *astA*, les deux premiers codant pour la production de toxine et les derniers codant pour l'expression de protéines, ont également été associés à ces deux conditions, mais semblent moins prévalents (Bicalho et coll., 2010). Il est intéressant de constater que ces gènes sont également associés à une diminution du risque de gestation (Bicalho et coll., 2010, Bicalho et coll., 2012) chez les vaches colonisées.

Dans le cas de *Trueperella pyogenes*, certaines souches ont été associées à l'augmentation du risque de métrite (Silva et coll., 2008). De plus, la présence du gène *fimA* codant pour l'expression du fimbriae à 1-7 JEL a été associé à une augmentation du risque de métrite (Santos et coll., 2010, Bicalho et coll., 2012), alors que les gènes *fimA* et *plo* (codant pour la pyolysine) présents à 8-10 JEL et 34-36 JEL ont été associés à une augmentation du risque d'endométrite (Bicalho et coll., 2012). Pour *Fusobacterium necrophorum*, seul le gène *lktA* (codant pour une leucotoxine) a été associé à une augmentation du risque de métrite si présent à 1-3 et 8-10 JEL et une augmentation du risque d'endométrite si présent à 34-36 JEL (Bicalho et coll., 2012). Aucun des facteurs de virulence de *Trueperella pyogenes* ni *Fusobacterium necrophorum* n'a été associé avec une altération des performances en reproduction.

En résumé, la présence de bactéries au niveau utérin dans la période post-partum est pratiquement généralisée. Bien que les caractéristiques de la contamination utérine (type de bactéries, charge bactérienne et gènes de virulence) soient associées à une augmentation du risque de pathologies utérines, leur association avec les performances en reproduction n'est pas aussi marquée. Un autre facteur fait donc partie de l'équation du risque d'une mauvaise élimination des bactéries et de l'inflammation associée, soit l'immunité de la vache.

I.II Immunité péri-partum

Une relation a été observée entre la contamination bactérienne de la lumière utérine et la présence de marqueurs d'inflammation sériques (céruloplasmine) et plasmatiques (protéines de la phase aiguë et haptoglobine) chez les vaches laitières (Sheldon et coll.,

2001). En effet, lors de l'invasion de l'utérus par des pathogènes, l'immunité locale de l'endomètre devient la première ligne de défense grâce aux récepteurs *toll-like* endométriaux qui sont activés par la présence de lipopolysaccharides et peptidoglycans bactériens (Herath et coll., 2006, Davies et coll., 2008). De façon simplifiée, cette activation résulterait en une réaction inflammatoire caractérisée par une augmentation de la production locale de prostaglandines-E₂, de cytokines et chemokines pro-inflammatoires, de peptides antimicrobiens, de protéines de la phase aiguë et de mucine-1 (Davies et coll., 2008, Chapwanya et coll., 2009). Ce sont les cytokines telles le facteur de nécrose tumorale (**TNF**) et les interleukines 1 et 8 qui créent alors un gradient vers lequel seront attirés par chimiotactisme les neutrophiles circulants essentiels pour l'élimination des pathogènes utérins (Zerbe et coll., 2003, Beutler, 2004). Une altération de la réaction inflammatoire ou des fonctions des neutrophiles pourrait conséquemment nuire à l'élimination de la contamination utérine et même contribuer au maintien d'une inflammation persistante, et ainsi prédisposer aux pathologies utérines.

I.II.I Réaction inflammatoire

La présence d'inflammation en réponse à une contamination bactérienne de l'utérus semble généralisée chez toutes les vaches (Sheldon et coll., 2001). Pourtant, le profil d'inflammation semble varier entre les individus atteints d'endométrite et les individus sains (Kim et coll., 2005, Galvao et coll., 2011). En effet, une faible expression de cytokines pro-inflammatoires locales (TNF et interleukine-1 β) ainsi qu'une augmentation de l'expression de l'interleukine-6 locale au vêlage et 1 semaine post-partum sont associées à une augmentation du risque d'endométrite subclinique (Galvao et coll., 2011). De plus, la présence de marqueurs d'inflammation (haptoglobine, $\geq 0.8\text{g/L}$) dans la première semaine post-partum a été identifiée comme facteur de risque pour la métrite, les endométrites clinique et subclinique (Dubuc et coll., 2010b). Une persistance de l'inflammation (TNF et interleukine-8) a également été associée au risque de pathologies utérines (Kim et coll., 2005, Galvao et coll., 2011). Bien que la variation des profils inflammatoires entre les

individus sains et ceux qui développent des pathologies utérines soient différents, peu d'information est disponible pour expliquer ces différences.

I.II.II Neutrophiles

Les neutrophiles et leurs fonctions ont fréquemment été associés aux problèmes utérins. En effet, les capacités d'attachement, de diapédèse, de phagocytose et d'oxydation des neutrophiles sont primordiales pour l'élimination des agents pathogènes (Beutler, 2004). Chez les vaches laitières, la fonction neutrophilique la mieux étudiée est la capacité d'oxydation, donc de destruction des agents pathogènes (Cai et coll., 1994, Hammon et coll., 2006). L'altération de cette fonction, évaluée par l'activité du cytochrome c et de la myéloperoxidase des neutrophiles circulants, a effectivement été associée aux diverses pathologies utérines (Kimura et coll., 2002, Hammon et coll., 2006). La fonction d'oxydation des neutrophiles semble donc jouer un rôle primordial dans le développement de pathologies utérines. Ainsi, l'altération de cette fonction est expliquée par différentes hypothèses, dont la balance énergétique négative post-partum, la déficience en antioxydants et l'impact des changements hormonaux péri-partum.

Balance énergétique négative excessive

Pendant la période péri-partum, les vaches laitières subissent une diminution de la consommation volontaire de matière sèche et une augmentation des besoins énergétiques liés à la gestation puis à la production laitière. Ces changements causent une balance énergétique négative qui se reflètent par une augmentation de la lipomobilisation qui implique une augmentation des acides gras non-estérifiés sanguins ou leur forme oxydée, les béta-hydroxybutyrates (Herdt et coll., 1981, Grummer et coll., 2004). *In vitro*, la présence de concentrations élevées d'acides gras non-estérifiés (Scalia et coll., 2006) ou d'acide béta-hydroxybutyrique (Hoeben et coll., 1997) affecte négativement la fonction d'oxydation des neutrophiles. Chez les vaches laitières, des concentrations élevées d'acides gras non-estérifiés en période pré-partum et de béta-hydroxybutyrates en période post-partum ont d'ailleurs été identifiées comme des facteurs de risques pour la métrite, les endométrites

clinique et subclinique (Hammon et coll., 2006, Dubuc et coll., 2010b). Il est à noter que la balance énergétique négative peut affecter la fertilité des vaches laitières de plusieurs autres façons (Figure 3).

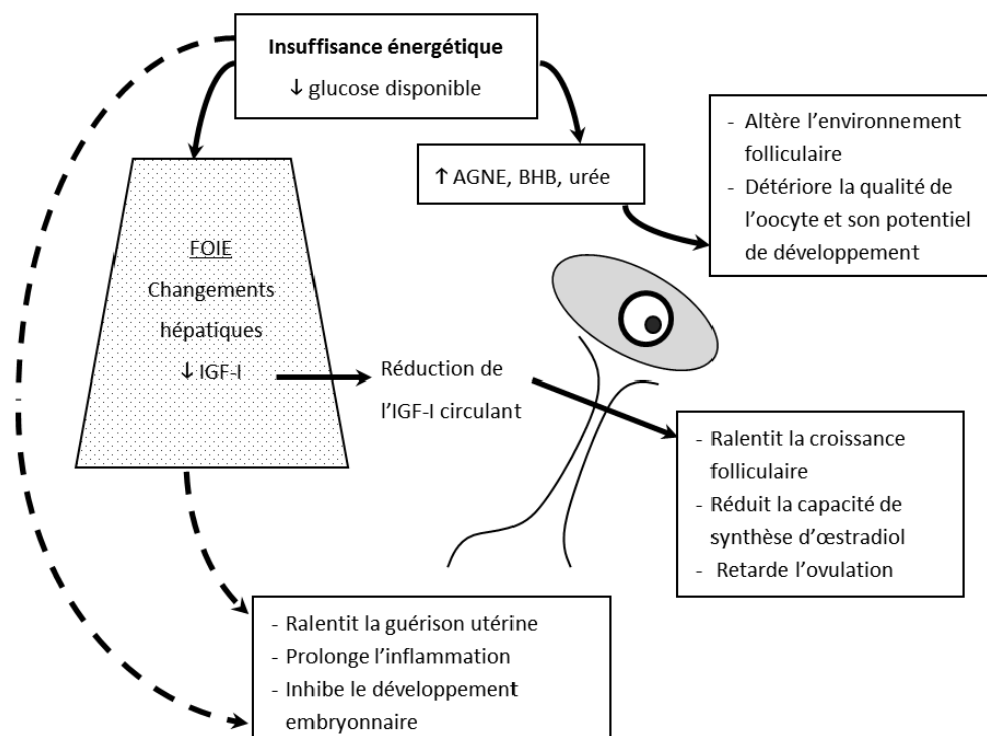


Figure 3 – Schéma adapté de Wathes et coll. (2007) représentant les divers impacts que la balance énergétique négative des vaches laitières peut avoir sur leur fertilité.

Déficiences en antioxydants

Outre la balance énergétique négative, la diminution de consommation volontaire en matière sèche entraîne également une baisse d'apport en vitamines et minéraux, dont le sélénium et la vitamine E qui agissent comme antioxydants. Bien que le changement d'apport en antioxydants ait un impact mitigé sur les performances en reproduction subséquentes des vaches (Arechiga et coll., 1998, LeBlanc et coll., 2002c, Moeini et coll., 2009), la protection que ces molécules apportent aux neutrophiles lors de l'oxydation intracellulaire des bactéries est reconnue (Herdt et Stowe, 1991, Spears et Weiss, 2008).

Impact hormonal

En raison de son lien étroit avec le tractus reproducteur, le système endocrinien est régulièrement incriminé lors de problème utérin. Pourtant, les hormones sexuelles stéroïdiennes, soit l'œstrogène et la progestérone, ne semblent pas avoir d'effet *in vitro* sur les différentes fonctions des neutrophiles (Subandrio et coll., 2000, Lamote et coll., 2004). Pour leur part, les corticostéroïdes sécrétés en période péri-partum ont fréquemment été suggérés comme cause d'altération immunitaire (Goff et Horst, 1997), mais seule la métrite puerpérale semble associée à des changements du profil de cortisol sanguin (Galvao et coll., 2010a). Finalement, la présence de structure ovarienne sécrétant de la progestérone (corps jaune) a souvent été imputée aux conditions se développant plus tardivement, soit les endométrites clinique et subclinique (LeBlanc et coll., 2002a, Sheldon et coll., 2009). Pourtant, la susceptibilité des vaches laitières aux infections utérines en fonction de leur progestéronémie n'a pas largement été étudiée. Les principaux arguments soutenant cet effet proviennent d'études effectuées chez d'autres espèces (Ramadan et coll., 1997, Wulster-Radcliffe et coll., 2003) ou chez des vaches laitières lors d'infections induites, sans suivi à moyen ou long terme (Rowson et coll., 1953). De plus, un état anovulatoire prolongé chez la vache laitière (absence de corps jaune) a récemment été associée aux pathologies utérines, ce qui va à l'encontre des affirmations précédentes (Dubuc et coll., 2012).

Bien que les mécanismes contrôlant les différents éléments du système immunitaire local et systémique ne soient pas tous connus, l'immunité péri-partum semble jouer un rôle primordial dans le maintien de la santé utérine des vaches laitières. Actuellement, la gestion de la balance énergétique péri-partum semble un élément clé dans la gestion du risque des maladies utérines alors que l'impact de l'immunité individuelle et des changements hormonaux devraient être plus amplement étudiés.

Les caractéristiques bactériennes et la capacité immunitaire des vaches sont étroitement liées à l'inflammation du système reproducteur, mais ne sont pas de bons outils pour identifier les animaux dont les performances en reproduction subséquentes seront altérées. Le développement des connaissances des pathologies du système reproducteur a

permis d'identifier que certaines observations cliniques sont associées à une diminution des performances en reproduction et sont beaucoup plus utiles pour cibler les animaux à risque. La surveillance de la santé reproductrice et l'instauration de protocoles de traitement est conséquemment mieux ciblée par ces pathologies.

II. Pathologies du système reproducteur

Dans la littérature, les pathologies utérines ont une panoplie de définitions différentes et ne sont parfois pas décrites, ce qui rend difficile les analyses et les comparaisons entre les études (LeBlanc, 2008). En effet, le terme métrite a longtemps été utilisé pour désigner toutes les conditions affectant le système reproducteur des bovins (Kelton et coll., 1998). Au cours des dernières années, plusieurs pathologies distinctes ont découlées de ce vaste concept puisque la pathogénie, les facteurs de risque ou les impacts de ces conditions se sont révélés différents pour chacune d'elles (Sheldon et coll., 2006, Dubuc et coll., 2010b).

La rétention placentaire et la métrite puerpérale sont les premières pathologies utérines rencontrées suite à la parturition chez les vaches laitières (LeBlanc, 2008). Ces deux conditions ont largement été étudiées (Lewis, 1997, Foldi et coll., 2006, Sheldon et coll., 2006, LeBlanc, 2008), mais sortent du cadre de cette revue. L'endométrite a été définie comme une inflammation chronique de l'endomètre sans atteinte systémique (Lewis, 1997, Foldi et coll., 2006).

La présence d'inflammation du système reproducteur post-partum est généralement considérée comme normale (Gier et Marion, 1968), voire souhaitée pour éliminer la contamination bactérienne présente à ce moment (Sheldon et coll., 2002b). Depuis longtemps, les animaux sont considérés comme normaux ou malades, mais la définition de normalité a beaucoup évolué au cours des dernières années. En effet, les limites définissant la population normale ont souvent été basées selon les observations dans la population dite « saine » ou « non-malade » au moment où ces observations sont effectuées (Gier et Marion, 1968). Plus récemment, les limites normales ont été définies selon l'impact d'une

observation sur la santé, la production et la reproduction subséquentes (LeBlanc, 2008). Ainsi, les endométrites clinique et subclinique sont utilisées comme outils permettant d'identifier les animaux à risque d'avoir des performances en reproduction altérées et leurs définitions contemporaines sont conséquentes (Figure 4).

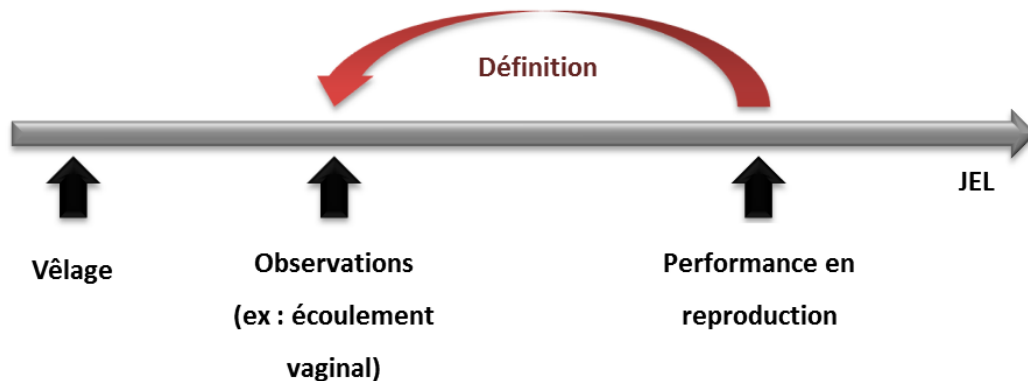


Figure 4 – Schéma adapté de Dubuc (2012) représentant une approche contemporaine pour établir les définitions (critères diagnostiques) des maladies utérines dites chroniques. Les critères diagnostiques sont les seuils à partir desquels un impact négatif sur les performances en reproduction subséquentes est associé.

Deux conditions chroniques du système reproducteur sont présentes après quatre semaines post-partum, soit les endométrites clinique et subclinique, et seront détaillées dans cette section.

II.1 Endométrite subclinique

II.1.1 Diagnostic et définition

L'endométrite subclinique est définie comme la présence d'inflammation endométriale qui est associée à un effet négatif sur la reproduction subséquente des vaches laitières, sans la présence de signes cliniques. Plusieurs outils diagnostiques ont été utilisés afin d'identifier les animaux atteints de cette condition. La biopsie endométriale est présentée comme le test de référence. Pourtant, au cours des dernières années, la biopsie a été peu utilisée suite à deux études ayant suggéré que cette technique invasive pouvait être

associée à une altération de la fertilité des vaches examinées (Miller et coll., 1980, Bonnett et coll., 1991). Récemment, Chapwanya et coll. (2010) a mis en évidence que la biopsie endométriale ne causait pas d'effet délétère sur l'état général ou la reproduction subséquente des vaches de boucherie en plus de procurer une grande quantité d'information histologique et moléculaire de l'endomètre. Évidemment, un examen extensif des échantillons de biopsie est nécessaire pour identifier les animaux atteints d'inflammation endométriale, ce qui peut rendre cet outil diagnostique peu pratique. Des alternatives à la biopsie ont été proposées dont l'examen du tractus reproducteur par échographie (Kasimanickam et coll., 2004) et l'examen cytologique par la technique du lavage utérin à petit volume (Gilbert et coll., 1998) ou de la cytobrosse (Kasimanickam et coll., 2004).

Lors de l'évaluation échographique du tractus reproducteur entre 20 et 47 JEL, la présence de liquide intra-utérin est associée à une diminution du risque de gestation à la première saillie, du risque de gestation à 150 JEL et du risque proportionnel de gestation (Kasimanickam et coll., 2004, Barlund et coll., 2008, Ghasemi, 2011). Par contre, l'accord entre les résultats échographiques et la cytologie endométriale est faible (Kasimanickam et coll., 2004, Barlund et coll., 2008, Ghasemi, 2011, Meira et coll., 2012). Cette faible concordance semble être expliquée par la capacité réduite de l'échographie à identifier les animaux ayant une cytologie utérine positive (sensibilité inférieure à 50%; Barlund et coll., 2008, Meira et coll., 2012) bien que l'outil semble bien discerner les animaux négatifs (bonne spécificité).

L'examen cytologique permet de dénombrer le pourcentage de polymorphonucléaires (**PMN**) par rapport aux cellules endométriales. Les seuils proposés varient entre 4 et 18% (Kasimanickam et coll., 2004, Gilbert et coll., 2005, Barlund et coll., 2008, Dubuc et coll., 2010a, Ghasemi, 2011, McDougall et coll., 2011, Deguillaume et coll., 2012) selon la période du cycle de production à laquelle les échantillons ont été effectués et les critères utilisés pour identifier le seuil. Les seuils les plus élevés ont été identifiés chez des vaches en début de la lactation (20-33 JEL; Kasimanickam et coll., 2004), et les plus bas chez des animaux plus avancés dans leur lactation (53-59 JEL; Dubuc et coll., 2010a). Il est difficile

de comparer les différents seuils entre eux puisque les définitions utilisées pour identifier les seuils ne sont pas les mêmes. Bien que plusieurs études aient sélectionné le seuil à partir du risque de gestation à 120 JEL, du risque proportionnel de gestation ou des deux (Barlund et coll., 2008, Dubuc et coll., 2010a, Deguillaume et coll., 2012), certaines études ont choisi un seuil à partir des jours ouverts (**JO**) médians (Kasimanickam et coll., 2004), de l'effet positif d'un traitement (Ghasemi, 2011), d'évaluation subjective (Gilbert et coll., 2005) ou des quartiles supérieurs (McDougall et coll., 2011)..

Puisque le diagnostic de l'endométrite subclinique nécessite un examen microscopique des échantillons, il n'est pas facilement réalisable à la ferme et les résultats ne sont disponibles qu'après un certain délai. Afin d'améliorer l'accessibilité du diagnostic, Cheong et coll. (2012) ont proposé l'évaluation du lavage utérin à petit volume avec différents tests colorimétriques, soit l'estérase leucocytaire, les protéines et le pH, tous présents sur une bandelette commerciale (Multistix 10 SG; Bayer Corporation, Elkart, IN, USA). Bien que les résultats démontrent une faible concordance avec l'examen cytologique, le pH (≥ 7.0) et l'estérase leucocytaire ($\geq +++$) étaient associés à des performances en reproduction altérées. Un seuil d'estérase leucocytaire de $\geq ++$ a également été rapporté comme corrélé à la cytologie endométriale, mais sans association avec une diminution des performances en reproduction (Couto et coll., 2013). Le lavage à petit volume a également été utilisé pour évaluer visuellement la présence de matériel purulent au niveau utérin (Bicalho et coll., 2012), mais cette technique n'a pas encore été comparée aux performances subséquentes en reproduction des animaux échantillonnés.

En résumé, plusieurs définitions d'endométrite subclinique sont présentes dans la littérature et différents outils dont la biopsie, l'échographie, la cytologie et l'estérase leucocytaire sont disponibles pour évaluer la présence d'inflammation endométriale.

II.1.11 Prévalence et facteurs de risque

Individus

La prévalence d'endométrite subclinique chez les vaches laitières varie entre 11 et 53% selon les études (Kasimanickam et coll., 2004, Gilbert et coll., 2005, Barlund et coll., 2008, Galvao et coll., 2009b, Dubuc et coll., 2010b, Ghasemi, 2011). Cette variation peut s'expliquer en grande partie par des facteurs inhérents aux études comme la définition d'endométrite, l'outil diagnostique, ainsi que les facteurs d'inclusion et d'exclusion utilisés.

Pour l'endométrite subclinique, différents facteurs de risque spécifiques à la vache ont été identifiés. Comme pour la prévalence, la définition utilisée et la population étudiée sont des facteurs pouvant faire varier les facteurs de risque identifiés. Une augmentation du risque d'endométrite subclinique a été identifiée suite aux problèmes péri-partum tels les jumeaux, l'assistance au vêlage, la rétention placentaire (Kasimanickam et coll., 2004) et la métrite aiguë (Cheong et coll., 2011). Ces associations ne sont pourtant pas toujours présentes (Dubuc et coll., 2010b) et ces différences peuvent être expliquées par les variations entre les études. Les différents indicateurs de balance énergétique ont été identifiés plus constamment comme facteur de risque. En effet, l'hypercétonémie ($BHB \geq 1\ 100\ \mu\text{mol/L}$) post-partum, l'augmentation d'acide gras non estérifié en période pré-partum, une faible consommation volontaire de matière sèche péri-partum et une condition corporelle inférieure à 2.75 au vêlage ont été associés au risque d'endométrite subclinique (Hammon et coll., 2006, Dubuc et coll., 2010b, Cheong et coll., 2011). Une seule étude réalisée en Nouvelle-Zélande (animaux élevés au pâturage) n'a pas mis en évidence d'association avec le bilan énergétique (Burke et coll., 2010).

Troupeaux

Certaines études ont également rapporté des prévalences d'endométrite subclinique au sein des troupeaux qui varient entre 0 et 74% (Gilbert et coll., 2005, Barlund et coll., 2008, Dubuc et coll., 2010b, Cheong et coll., 2011, Ghasemi, 2011). Les variations de prévalence entre les troupeaux d'une même étude supportent l'existence de facteurs de risque au

niveau troupeau pour l'endométrite. Une étude récente a identifié certains facteurs de risque associés à l'augmentation de la prévalence d'endométrite subclinique dont le logement et la litière utilisés tôt dans la période post-partum (Cheong et coll., 2011). Cette étude, bien qu'innovatrice, a basé ses résultats sur un faible nombre de troupeaux et a testé un nombre restreint de facteurs de risque, ce qui peut influencer les résultats obtenus. Il serait également intéressant de déterminer un seuil de prévalence au niveau du troupeau associé à un impact négatif sur les performances en reproduction.

II.1.III Impact

Le principal impact de l'endométrite subclinique étant rapporté dans les diverses revues est une détérioration de la fertilité des vaches atteinte de cette condition (Fourichon et coll., 2000, LeBlanc, 2008, Sheldon et coll., 2009). Cette observation est peu surprenante puisque, comme décrit précédemment, les définitions modernes d'endométrite ont été faites dans le but d'identifier des seuils à partir desquels était associé un impact négatif sur les différents indices reproducteurs. Certaines études ont identifié une diminution du risque de gestation à la première saillie entre 12 à 25% chez les vaches atteintes d'endométrite subclinique (Kasimanickam et coll., 2004, Gilbert et coll., 2005, Barlund et coll., 2008). Évidemment, comme l'endométrite subclinique est observée entre 26 et 60 JEL selon les études, un impact négatif sur la première saillie est attendu. Pourtant, plusieurs indices reproducteurs plus éloignés du moment où le diagnostic d'endométrite subclinique est effectué sont également affectés comme le risque proportionnel de gestation ce qui se traduit par une augmentation de l'intervalle médian entre le vêlage et la saillie fécondante de 24 à 88 jours (Kasimanickam et coll., 2004, Gilbert et coll., 2005, Barlund et coll., 2008, Dubuc et coll., 2010a, Cheong et coll., 2011, Ghasemi, 2011, Deguillaume et coll., 2012). Numériquement, la proportion de vaches gestantes à 100 et 120 JEL est de 27 et 15% plus basse dans la population de vaches atteintes d'endométrite subclinique que dans la population de vaches saines (Gilbert et coll., 2005, Dubuc et coll., 2010a) avec des rapports de cote de la probabilité de gestation à 120 JEL diminués (RC = 0.63 et 0.72) lors de présence d'endométrite à 35 ± 3 et 56 ± 3 JEL, respectivement (Dubuc et coll., 2010a).

Quelques études ont également tenté d'identifier l'impact de l'endométrite subclinique sur certains aspects plus spécifiques de la reproduction, dont l'anovulation. Le retour à la cyclicité est essentiel suite à la parturition afin de permettre la gestation subséquente. La reprise des fonctions ovariennes est généralement déterminée par la mesure à intervalle régulier de la concentration de progestérone du lait ou du sérum (Abeyawardene et coll., 1984). Une vache est habituellement considérée anovulatoire jusqu'au moment où la progestéronémie devient supérieure à 1 ng/ml, bien que cette valeur semble choisie arbitrairement. Plusieurs auteurs ont mis en évidence une diminution des performances en reproduction chez les vaches ayant un retour tardif des fonctions ovariennes (Fonseca et coll., 1983, Walsh et coll., 2007, Gautam et coll., 2010, Dubuc et coll., 2012). Parallèlement, l'endométrite subclinique a été associée à un retard du retour à la cyclicité (Burke et coll., 2010, Galvao et coll., 2010b, Dubuc et coll., 2012) ce qui peut expliquer en partie l'impact de cette condition sur les performances en reproduction.

II.I.IV Traitements

Évidemment, comme l'endométrite subclinique chez les vaches est associée à une diminution des performances en reproduction, l'instauration d'un traitement permettant de contrer cet effet est potentiellement désirable selon les coûts, les bénéfices et les risques associés. Bien que certains traitements aient comme objectif la guérison de l'endométrite en éliminant l'inflammation endométriale, l'amélioration des performances en reproduction afin de minimiser les pertes économiques associées à cette condition demeure l'objectif ultime (LeBlanc, 2007). Deux stratégies de traitement sont principalement utilisées et étudiées, soit l'antibiothérapie, locale ou systémique, et l'utilisation de prostaglandines (**PGF₂α**) systémiques (Sheldon et coll., 2006, LeBlanc, 2008, Lefebvre et Stock, 2012).

Antibiotiques

L'antibiothérapie a pour objectif de diminuer la charge bactérienne utérine et ainsi réduire l'inflammation associée (Bretzlaff, 1987). Le traitement à partir d'antibiotiques intra-utérins a la capacité d'atteindre des concentrations élevées au niveau de l'endomètre

(Masera et coll., 1980). Pourtant, seule la céphapirine (Kasimanickam et coll., 2005b, Ghasemi, 2011) a été étudiée comme traitement de l'endométrite subclinique. Ces études comparaient un groupe traité à un groupe contrôle négatif (non traité) et utilisaient les performances en reproduction subséquentes comme critère d'efficacité du traitement. Selon les définitions d'endométrite subclinique utilisées dans ces deux études, une vache était positive à partir d'une proportion de PMN de 15 et 18%, ou si la présence de fluide à l'échographie était observée entre 20 et 33 JEL sans écoulement vaginal purulent. Le traitement intra-utérin de céphapirine était associé à une amélioration des performances en reproduction chez les vaches positives, soit une augmentation du risque proportionnel de gestation et donc à une diminution des JO médians (entre 31 et 88 jours). Le traitement de céphapirine n'avait par contre aucun effet sur la reproduction des vaches saines.

Lors de traitement antibiotique chez les animaux de consommation, la présence de résidus demeure une préoccupation pour plusieurs intervenants de la santé, mais peu d'étude ont évalué l'impact des infusions utérines sur les résidus d'antibiotiques dans le lait ou la viande (Dinsmore et coll., 1996, Tan et coll., 2007). Actuellement, seule la céphapirine est homologuée au Canada pour cette voie d'administration, et ce sans retrait pour le lait et avec un retrait de deux jours pour la viande (Metricure, Merck Animal Health).

Une autre inquiétude majeure face à l'utilisation d'antibiotiques chez les animaux de consommation est l'apparition d'antibiorésistance, principalement chez les humains. La céphapirine est une céphalosporine de première génération qui n'est pas utilisée en médecine humaine, mais qui est de la même famille que la céphalexine qui elle l'est. Les céphalosporines de première génération font partie de la catégorie II en médecine humaine et sont donc considérées de haute importance. Malheureusement, aucune donnée n'est actuellement disponible concernant la présence d'antibiorésistance chez les bactéries utérines bovines. Par contre, la céphapirine est également utilisée pour le traitement des infections mammaires et la caractérisation des bactéries mammaires ne semble pas identifier de résistance importante à cet agent thérapeutique (Rajala-Schultz et coll., 2009). Évidemment, il serait extrêmement important de caractériser l'antibiorésistance des

bactéries utérines des bovins laitiers afin de mieux gérer les risques associés à l'apparition de résistances.

Hormonaux

L'utilisation de PGF2 α a pour objectif de vidanger le contenu utérin en provoquant l'œstrus grâce à la lyse du corps jaune et d'augmenter les défenses utérines grâce à la suppression de la progestérone et l'augmentation d'estrogène (Larson et Ball, 1992, Lewis, 2004). Cette affirmation demeure controversée, d'abord parce qu'il est incertain que l'œstrus arrive à vidanger complètement le contenu utérin, surtout bactérien (Hirsbrunner et coll., 1998, Nikolakopoulos et Watson, 1999, Hirsbrunner et coll., 2010), et parce que l'influence hormonale sur les défenses utérines des vaches laitières n'est pas démontrée clairement (Rowson et coll., 1953, Subandrio et coll., 2000, Lamote et coll., 2004). De plus, l'efficacité des PGF2 α a fréquemment été soutenue par des études où le groupe traité n'était pas comparé à un groupe contrôle négatif (Wenkoff, 1978, Murray et coll., 1990, Sheldon et Noakes, 1998, Drillich et coll., 2005, Kaufmann et coll., 2010). Lorsque comparées à un tel groupe, les vaches atteintes d'endométrite subclinique et qui avaient été traitées avec deux injections de PGF2 α à 35 et 49 JEL ou avec trois injections à 21, 35 et 49 JEL n'ont pas démontré d'amélioration de leurs performances en reproduction (Galvao et coll., 2009a, Dubuc et coll., 2011), sauf chez les animaux ayant une faible condition corporelle (≤ 2.5 ; Galvao et coll., 2009a). Dans une autre étude, une seule injection de PGF2 α entre 20 et 33 JEL a permis d'améliorer certains paramètres reproducteurs, soit une augmentation du risque proportionnel de gestation chez les vaches atteintes d'endométrite subclinique (Kasimanickam et coll., 2005b). Il est important de mentionner que certaines études ont démontré une amélioration des paramètres reproducteurs lors de traitements de PGF2 α dans l'ensemble de la population incluant les vaches atteinte ou non d'endométrite (Kasimanickam et coll., 2005b, Galvao et coll., 2009a). Il semble donc difficile de distinguer l'impact réel des traitements de PGF2 α sur l'endométrite, en raison de leur capacité à synchroniser l'œstrus (Macmillan et Day, 1982).

II.II Endométrite clinique

II.II.I Diagnostic et définition

L'endométrite clinique se définit par la présence d'écoulement vaginal purulent (**EVP**) et est associé, comme l'endométrite subclinique, à une altération des performances en reproduction subséquentes chez les vaches laitières. Comme son nom l'indique, l'endométrite clinique suppose que de l'inflammation endométriale est présente lorsque de l'EVP est identifié. Cette affirmation a été remise en question récemment puisque l'inflammation endométriale n'est pas toujours concomitante à l'EVP et que les facteurs de risque des deux conditions diffèrent (Dubuc et coll., 2010a). Une classification différente a donc été suggérée (Figure 5) et nécessite plus de recherche afin de comprendre la dynamique de l'inflammation du système reproducteur.

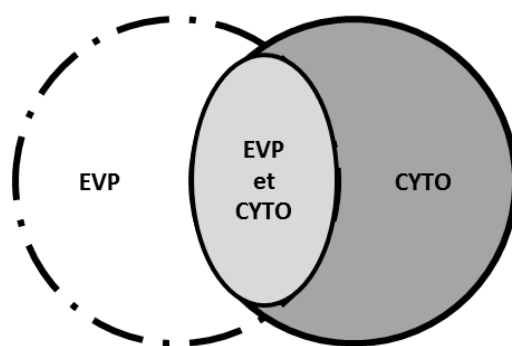


Figure 5 – Schéma adapté de Dubuc et coll. (2010a) représentant la classification des pathologies utérines post-partum à 35 jours après la parturition. Trois statuts sont possibles : écoulement vaginal purulent (EVP) seulement (région gris foncé), endométrite cytologique (CYTO) seulement (région blanche), ou écoulement vaginal purulent et endométrite cytologique simultanés (région gris pâle).

L'endométrite clinique est diagnostiquée de diverses façons dont l'examen visuel d'écoulement à la vulve ou sur la queue de la vache (Miller et coll., 1980), l'examen vaginal manuel (Sheldon et coll., 2002a), la vaginoscopie (Miller et coll., 1980, LeBlanc et coll., 2002a, Barlund et coll., 2008) et le Metricheck (McDougall et coll., 2007). Évidemment, l'observation

d'écoulement purulent externe est très peu sensible puisque la présence d'EVP en quantité faible à modérée au niveau du vagin crânial ne sera que rarement identifiée (Miller et coll., 1980). Le Metricheck pour sa part s'est avéré plus sensible et moins spécifique que la vaginoscopie pour diagnostiquer l'endométrite clinique (McDougall et coll., 2007), mais les deux outils permettent d'identifier les animaux à risque d'avoir des performances reproductrices subséquentes altérées (LeBlanc et coll., 2002a, Williams et coll., 2005, McDougall et coll., 2007, Dubuc et coll., 2010a). En utilisant la vaginoscopie ou le Metricheck, la plupart des études ont déterminé que la présence de matériel mucopurulent et purulent entre 20 et 38 JEL, et même entre 53 et 59 JEL, était associée à des performances subséquentes en reproduction altérées (LeBlanc et coll., 2002a, Williams et coll., 2005, Dubuc et coll., 2010a). Une seule étude a utilisé comme seuil la catégorie mucus avec flocons de pus entre 28 et 42 JEL, mais sans détailler comment ce choix avait été effectué (McDougall et coll., 2007).

D'autres outils diagnostiques ont été proposés pour identifier les vaches à risque d'avoir des performances en reproduction diminuées tel l'examen manuel (transrectal) de l'utérus et du col utérin. En effet, l'identification d'un utérus de grosseur anormale par palpation transrectale (cornes utérines > 30 mm ou ayant une différence entre elles supérieur à 5 mm; Miller et coll., 1980) et la taille du col (>7.5 cm; LeBlanc et coll., 2002a) ont été utilisées comme critères diagnostiques pour prédire les performances en reproduction chez la vache laitière. Le lien expliquant la taille du col ou de l'utérus comme complément d'information à l'EVP résiderait dans l'origine possible de l'écoulement purulent observé. Comme mentionné précédemment, la conviction que l'EVP provient de l'utérus est remis en question (Dubuc et coll., 2010a, Osawa et coll., 2011, Deguillaume et coll., 2012) et des origines multiples (vaginale, cervicale et utérine; Figure 6) ont été suggérées (Osawa et coll., 2011, Deguillaume et coll., 2012).

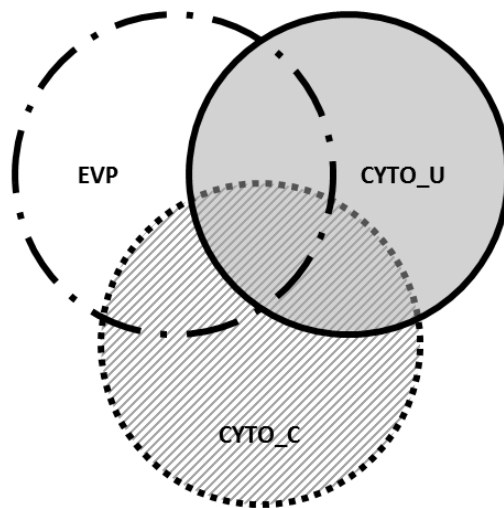


Figure 6 – Schéma inspiré d’Osawa et coll. (2011) représentant les pathologies inflammatoires reproductrices observées à cinq semaines après la parturition soit l’écoulement vaginal purulent (EVP; région blanche), l’endométrite cytologique (CYTO_U; région grise) et la cervicite (CYTO_C; région hachurée). Les trois conditions sont observées indépendamment et concomitantes chez les vaches laitières.

L’identification d’un utérus de grosseur anormale à l’examen transrectal, bien que fréquemment utilisé en pratique, s’est avérée une technique peu sensible pour prédire la fertilité subséquente des vaches laitières ou la présence d’endométrite clinique (Miller et coll., 1980, LeBlanc et coll., 2002a). La taille du col utérin, quant à elle, a été associée à une altération des performances en reproduction dans certaines études (Oltenacu et coll., 1983, LeBlanc et coll., 2002a). Il est intéressant de constater que la présence d’EVP et la taille du col utérin sont parfois utilisés en combinaison comme critères diagnostiques de l’endométrite clinique (LeBlanc et coll., 2002a). L’utilisation de ces deux critères augmente probablement la sensibilité d’identifier les animaux à risque d’avoir des performances en reproduction altérées, bien qu’ils n’identifient peut-être pas la même condition (Figure 6).

II.II.II Prévalence et facteurs de risque

Individus

La prévalence d'individus atteints d'endométrite clinique varie entre 10 et 17% selon les études (LeBlanc et coll., 2002a, Barlund et coll., 2008, Dubuc et coll., 2010b, McDougall et coll., 2011). Une étude a même rapporté une prévalence de 60%, mais la population à l'étude se composait de vaches ayant eu des problèmes post-partum (McDougall et coll., 2007). Ceci concorde bien avec la présence de facteurs de risque individuels pour l'endométrite clinique, soit les problèmes péri-partum tels les dystocies, gémellités, rétentions placentaires et métrites (LeBlanc et coll., 2002a, Dubuc et coll., 2010b).

Troupeaux

La prévalence d'endométrite clinique entre 20 et 33 JEL au sein des différents troupeaux a été rapportée comme variant entre 5 et 26% (LeBlanc et coll., 2002a). Dubuc et coll. (2010b) a également rapporté une prévalence d'endométrite dans les troupeaux, mais la définition d'endométrite incluait les endométrites clinique et subclinique. Outre ces deux études, peu d'information est disponible sur la prévalence d'endométrite clinique dans les différents troupeaux et encore moins sur les facteurs de risque associés à la prévalence. Comme pour l'endométrite subclinique, la détermination d'un seuil de prévalence au niveau du troupeau associé à un impact négatif sur les performances en reproduction du troupeau serait pertinente, d'autant plus que le diagnostic de cette condition est facile et accessible aux producteurs laitiers.

II.II.III Impact

Bien que le diagnostic de l'endométrite clinique soit effectué avant la première saillie, l'impact de cette condition sur la proportion de vaches gestantes à la première saillie est faible, variant entre 0 (Dubuc et coll., 2010b) et 8% (LeBlanc et coll., 2002a, McDougall et coll., 2007). Dans l'étude de Dubuc et coll. (2010b), le dessin d'étude imposait une première saillie dans une période fixe pour tous les animaux, atteints ou non d'endométrite, ce qui

pourrait avoir influencé ces résultats. L'endométrite clinique est par contre associée aux autres indices reproducteurs tel le risque proportionnel de gestation et donc l'intervalle médian entre le vêlage et la saillie fécondante (augmentation de 8 à 28 jours; LeBlanc et coll., 2002a, McDougall et coll., 2007, Dubuc et coll., 2010a). La proportion de vaches gestantes à 120 JEL est diminuée de 14% (LeBlanc et coll., 2002a, Dubuc et coll., 2010a) chez les vaches atteintes d'endométrite clinique par rapport aux vaches saines, tout comme les rapports de cote de probabilité de gestation à 120 JEL (RC = 0.77 et 0.46) à 35 ±3 et 56 ±3 JEL (Dubuc et coll., 2010a). Une augmentation du risque de réforme pour problèmes reproducteurs par un facteur de 1.7 (LeBlanc et coll., 2002a) a également été associée à la présence d'endométrite clinique. L'effet précis expliquant l'impact de l'endométrite clinique sur la reproduction subséquente des vaches atteintes n'a pas été étudié, mais la présence d'inflammation dans le tractus reproducteur n'est certes pas propice au développement d'un embryon.

II.II.IV Traitements

Comme pour l'endométrite subclinique, l'établissement d'un traitement contrant l'impact négatif de l'endométrite clinique sur la reproduction des vaches est souhaitable. Plusieurs traitements ont été étudiés comme les antibiotiques pour leur effet curatif, mais également préventif, les traitements hormonaux et même antiseptiques et homéopathiques.

Antibiotiques

Bien que la possibilité que l'endométrite clinique ne soit pas toujours concomitante à l'inflammation utérine (Dubuc et coll., 2010a), les traitements évalués dans la littérature sont principalement des infusions intra-utérines d'antibiotiques tels l'oxytétracycline (Thurmond et coll., 1993), la pénicilline procaïne G (Thurmond et coll., 1993), le ceftiofur (Galvao et coll., 2009b) et la céphapirine (LeBlanc et coll., 2002b, Runciman et coll., 2008, Runciman et coll., 2009). Seule la céphapirine a démontré un effet positif sur la reproduction des animaux atteints (LeBlanc et coll., 2002b, Runciman et coll., 2008, Runciman et coll., 2009), aussi bien dans des conditions d'élevage nord-américaines qu'en Nouvelle-Zélande. La comparaison entre les études de ces deux régions du monde est difficile en raison de la période de

reproduction, annuelle en Amérique du Nord et saisonnière en Australie et en Nouvelle-Zélande, et au type d'élevage, en stabulation en Amérique et au pâturage en Océanie. L'obstacle principal rendant difficile la comparaison des études est la différence entre les indices reproducteurs, qui sont habituellement en relation avec le début de la saison de reproduction pour les vaches en Nouvelle-Zélande alors qu'ils sont en relation avec la parturition en Amérique du Nord. Ainsi, un traitement de céphapirine augmente de 10 et 15% la proportion de vaches gestantes à 6 et 21 semaines après le début de la période de reproduction, respectivement (Runciman et coll., 2008, Runciman et coll., 2009). Le traitement est également associé à une amélioration du risque proportionnel de gestation et à une diminution des JO médians de 28 à 72 jours (LeBlanc et coll., 2002b, Runciman et coll., 2008, Runciman et coll., 2009). Afin de faire une utilisation judicieuse des antibiotiques, il est intéressant de cibler plus précisément les vaches qui bénéficient du traitement. Ainsi, l'association avec une amélioration des performances en reproduction est présente lorsque le traitement est effectué sur des vaches ayant un corps jaune (LeBlanc et coll., 2002b) et tôt en début de lactation (7-28 JEL; Runciman et coll., 2009, 27-33 JEL; LeBlanc et coll., 2002b). D'ailleurs, aucune association entre le traitement de céphapirine et les performances en reproduction n'a été observée, outre une diminution de la période entre le début de la période de reproduction et la première saillie, chez des vaches traitées entre 14 et 107 JEL (McDougall, 2001).

L'antibiothérapie systémique préventive a également été étudiée afin de prévenir le développement des pathologies utérines chez les vaches à haut risque (Dubuc et coll., 2011). Une injection de ceftiofur 24 heures après le vêlage était associée à une diminution du risque d'endométrite clinique, sans avoir d'impact sur les performances en reproduction des animaux traités. Le traitement systémique préventif serait également intéressant s'il arrivait à prévenir les facteurs de risque de l'endométrite clinique comme la métrite, ce qui a pu être démontré lors de l'utilisation de ceftiofur 24 heures post-partum, mais seulement chez les animaux sans rétention placentaire (Dubuc et coll., 2011).

Hormonaux

Le traitement de l'endométrite clinique par une seule injection de PGF2 α entre 20 et 33 JEL (LeBlanc et coll., 2002b) ou deux injections à 35 et 49 JEL ou 14 et 28 JEL (Glanvill et Dobson, 1991, Dubuc et coll., 2011) n'était pas associé à un effet positif sur les performances en reproduction subséquentes des vaches. Récemment, une combinaison de traitement de l'endométrite clinique adapté au statut ovarien des vaches a été évaluée en Nouvelle Zélande (McDougall et coll., 2013). Dans cette étude, les vaches atteintes d'endométrite clinique étaient traitées soit par une infusion intra-utérine de céphapirine (groupe contrôle), soit par une injection unique de PGF2 α si elles avaient un corps jaune ou une infusion intra-utérine de céphapirine si elles n'en avaient pas (groupe traité). Cette étude n'a pas mis en évidence de différence entre les deux groupes, mais n'utilisait pas de groupe contrôle négatif. Il semblerait donc, comme l'avait souligné LeBlanc et coll. (2002b), que le traitement de PGF2 α est associé à un impact comparable au traitement de céphapirine chez les vaches ayant un corps jaune au moment du traitement.

Autres

Dans l'optique de diminuer l'usage d'antibiotiques et d'hormones, plusieurs traitements alternatifs ont été étudiés, mais peu ont été comparés à un groupe contrôle non traité. Parmi ces traitements, plusieurs infusions utérines ont été testées, dont des traitements homéopathiques (Arlt et coll., 2009) et antiseptiques (Nakao et coll., 1988) avec des résultats peu probants.

Objectifs

Les endométrites clinique et subclinique ont séparément été utilisées pour identifier les vaches à risque d'avoir des performances en reproduction altérées ainsi que pour identifier les animaux qui bénéficient d'une infusion intra-utérine de céphapirine. Cependant, les tests utilisés pour diagnostiquer ces conditions n'ont pas été combinés pour améliorer l'identification des animaux à risque ou de ceux qui bénéficient d'un traitement. Le premier objectif de ce projet était donc de définir les seuils pour l'écoulement vaginal (endométrite clinique) et la cytologie endométritale ou l'estérase leucocytaire (endométrite subclinique) et de considérer l'utilisation de ces tests en série et en parallèle pour améliorer la capacité à prédire les performances en reproduction à la première saillie. Le second objectif était d'identifier l'impact d'une infusion intra-utérine de céphapirine sur la reproduction de vaches laitières, selon leur statut utérin.

Article 1.

**Definition and diagnosis of clinical and subclinical
endometritis in dairy cows based on their impact on
reproductive performance**

Article à soumettre au *Journal of Dairy Science*

DIAGNOSIS OF CLINICAL AND SUBCLINICAL ENDOMETRITIS

Definition and diagnosis of clinical and subclinical endometritis in dairy cows based on their impact on reproductive performance

J. Denis-Robichaud, J. Dubuc¹

* Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, C.P. 5000, St-Hyacinthe, Québec, J2S 7C6, Canada

¹Corresponding author: Jocelyn Dubuc

Interpretive summary

Definition and diagnosis of clinical and subclinical endometritis in dairy cows based on their impact on reproductive performance. *Denis-Robichaud et al.* Vaginal discharge scoring was used to diagnose clinical endometritis whereas endometrial cytology and leukocyte esterase testing were used to diagnose subclinical endometritis. Optimal diagnostic criteria for clinical and subclinical endometritis were determined based on their impact on reproductive performance at first service. Ability to predict non-pregnancy at first service was assessed for individual, serial, and parallel testing. Subclinical endometritis diagnosed by cytology or leukocyte testing used individually was the best to predict non-pregnancy at first service.

ABSTRACT

The objectives of this study were to determine criteria for clinical and subclinical endometritis using vaginal discharge (VD) score and endometrial cytology or VD score and leukocyte esterase (LE) testing that maximize their ability to predict non-pregnancy at first service and to evaluate if the use of VD and endometrial cytology, or the use of VD and LE testing, in series or in parallel would improve the ability to predict non-pregnancy at first service. Eight hundred cows from 26 herds were examined at 35 ± 7 d in milk for VD using a Metrichick device, and for endometrial inflammation using a cytobrush technique and LE testing. Multiple combinations of diagnostic criteria for VD and cytology, and for VD and LE testing were tested in models predicting pregnancy status at first service. The optimal combinations of diagnostic criteria when VD was combined to cytology was purulent VD (or worse) and more than 6% of polymorphonuclear cells in endometrial cytology. The optimal combinations of diagnostic criteria when VD was combined to LE testing was purulent VD (or worse) and LE category at or above "large amount of leukocytes". Using these diagnostic criteria, area under the curve were obtained from receiver operating characteristic curves using individual diagnostic tests alone (VD, cytology, and LE), or using a combination of diagnostic tests (serial and parallel testing). Sensitivity, specificity, and positive and negative predictive values were also obtained. The highest areas under the curve were obtained for subclinical endometritis diagnosed with cytology followed by LE which suggest a greater ability to predict non-pregnancy at first service. Serial and parallel testing did not improved the predictive ability.

Key Words: endometritis, diagnosis, dairy cow

INTRODUCTION

Reproductive performance is a major concern in the dairy industry because of its important economic impact (LeBlanc, 2007). Postpartum clinical and subclinical endometritis are associated with detrimental impacts on subsequent reproductive performance (Gilbert et al., 1998, Kasimanickam et al., 2005, McDougall et al., 2007). In order to implement an on-

farm disease surveillance program and an immediate treatment strategy for endometritis, practical diagnostic tools are needed. Multiple diagnostic tools have been validated for clinical and subclinical endometritis. For example, a vaginoscope or a Metricheck device (Simcro, Hamilton, New Zealand) can be used to diagnose clinical endometritis and both tools provide relatively similar results (McDougall et al., 2007). Diagnosis of subclinical endometritis using endometrial biopsy or cytology techniques has been validated (Gilbert et al., 1998, Kasimanickam et al., 2004, Chapwanya et al., 2010) but do not provide on-farm results. Leukocyte esterase (**LE**) colorimetric testing from uterine lavage or cytobrush sample provides interesting results and it was developed to eventually provide immediate on-farm results (Cheong et al., 2012, Couto et al., 2013).

Diagnosis of clinical and subclinical endometritis requires the use of diagnostic criteria to classify the animals as diseased or healthy because the techniques used provide quantitative or semi-quantitative results (LeBlanc et al., 2002, Kasimanickam et al., 2004, Dubuc et al., 2010). Although many studies have reported different diagnostic criteria, most of them were in a relatively similar range (Barlund et al., 2008, Runciman et al., 2009, Dubuc et al., 2010). However, clinical and subclinical endometritis are usually evaluated in different studies and their potentially synergistic effect on subsequent reproductive performance was never assessed. The objective of this study was, first, to determine criteria for clinical and subclinical endometritis using vaginal discharge (**VD**) score and endometrial cytology or VD score and LE testing to predict non-pregnancy at first service. The secondary objective of this study was to evaluate if the use of VD and endometrial cytology, or the use of VD and LE testing, in series or in parallel would improve the ability to predict non-pregnancy at first service.

MATERIALS AND METHODS

A prospective cohort study was conducted from October 2011 until November 2012. A convenience sample of 26 herds was recruited in a 150 km radius around St-Hyacinthe, Québec. Participating herds were required to use a computerized record system and to use

an ovulation synchronization protocol to synchronize first breeding of all cows around 70 DIM. All herds used exclusively artificial insemination for breeding.

A total of 1200 enrolled cows were targeted in the study. Sample size was calculated to identify a difference of 10% in pregnancy risk at first service between diseased and non-diseased cows in 20 herds (clusters), with 95% confidence and 80% power (Dohoo et al., 2009) expecting a disease prevalence of 25%. The present study was part of a larger research project involving a randomized clinical trial of intrauterine cephalosporin treatment for clinical and subclinical endometritis in postpartum dairy cows. All cows enrolled in the present study were control animals and did not receive any treatment that could influence their reproductive performance. Cows that were not bred before 100 DIM were excluded from the project.

Farms were visited biweekly by a technician and a veterinarian. All participating cows were examined for clinical and subclinical endometritis at 35 (\pm 7) DIM. First, VD was evaluated with the Metricheck device technique (McDougall et al., 2007) and scoring (0: no discharge, 1: clear mucus, 2: mucus with flecks of pus, 3: mucopurulent discharge, 4: purulent discharge or 5: foul smelling discharge). A cytological sample was then collected on the dorsal aspect of the uterine body using a cytobrush (VWR CanLab, Mississauga, Canada) adapted for use in cattle (Kasimanickam et al., 2005, Dubuc et al., 2010). After collection, the cytobrush was rolled on a clean glass microscope slide and plunged in an individual vial (3 ml) containing 1 ml of saline 0.9% (NaCl 0.9% Irrigation, Baxter Corporation, Mississauga, Canada). Within 12 hours of collection, endometrial cytology slides were stained with modified Wright-Giemsa stain (Protocole-Hema3; Biochemical Sciences, Swedesboro, NJ) and coverslips were applied when dry (Barlund et al., 2008). Microscopic evaluation of cytology slides was done separately at 400x magnification by two observers (technician and veterinarian; Kasimanickam et al., 2005). Percentage of polymorphonuclear cells (**PMN**) was determined in two different regions of each slide based on a differential count of 200 cells (polymorphonuclear and endometrial cells). Slide readers were blinded to on-farm disease clinical findings.

Within 12 hours of collection, LE testing was performed by shaking the individual vial for 10 seconds and putting a drop of the solution on a LE commercial test strip (Multistix 10 SG; Bayer Corporation, Elkart, IN, USA) with a pipette. Test results for every cow were read according to the manufacturer colorimetric chart after two minutes, and the score was recorded as 0: negative, 0.5: trace of leukocytes, 1: small amount of leukocytes, 2: moderate amount of leukocytes, and 3: large amount of leukocytes (Couto et al., 2013).

Statistical Analyses

All statistical analyses were performed using SAS 9.3 (SAS Institute, Cary, NC, United States). The cow was considered as the unit of interest in this study. Individual data such as parity (first, second or greater), season of calving (winter: January to March; spring: April to June; summer: July to September; fall: October to December), and reproductive and culling events were exported from the computerized record system (DSAHR Inc., Saint-Hyacinthe, QC, Canada) into Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Richmond, WA, United States).

Diagnostic Criteria. To determine diagnostic criteria for clinical (**CLIN**) and subclinical endometritis (**SUBCLIN**), a disease variable with three categories was created: CLIN, SUBCLIN, and “unaffected”. When the score of vaginal discharge was at or above the VD diagnostic criterion, the category CLIN was attributed regardless of the cytology result. If the value of vaginal discharge was below the diagnostic criterion and the percentage of PMN was at or above the PMN diagnostic criterion, the category SUBCLIN was attributed. Finally, if both vaginal discharge score and percentage of PMN were below their respective diagnostic criteria, the category “unaffected” was attributed. This disease variable was used in a logistic regression models predicting the probability of non-pregnancy at first service and adjusted for herd clustering (random effect; PROC GLIMMIX) as following

$$Y_{ij} \sim \text{bin}(P(Y_{ij}))$$

$$\text{Logit}(P(Y_{ij})) = \beta_{0ij} + \beta_1 \text{CLIN}_{ij} + \beta_2 \text{SUBCLIN}_{ij} + u_j$$

where $P(Y_{ij})$ is the probability of non-pregnancy at first service of cow i in herd j and is function of the diagnosed uterine status through the logit function; β_{0ij} is the intercept; β_1 is the regression coefficient for the clinical endometritis status (determined using a given VD

threshold); β_2 is the regression coefficient for the subclinical endometritis status (determined using a given PMN or LE threshold); and u_j is the random herd effect.

Models with different combinations of VD diagnostic criteria (2 to 4) and PMN diagnostic criteria (1 to 20) were run and the one with the lowest Akaike Information Criterion (**AIC**) was selected as described by Burnham and Anderson (2002) to identify the diagnostic criteria that had the best ability to predict non-pregnancy at first service. The same procedure was performed for LE results (diagnostic criteria: 0.5 to 4) to define subclinical endometritis (instead of cytology) with combinations of VD diagnostic criteria (2 to 4). These optimal diagnostic thresholds were retained and use in all subsequent analyses.

Endometritis Prevalence. The percentage of cows below, and at or above the previously determined diagnostic criteria of vaginal discharge, PMN percentage, and LE testing was calculated. Herd prevalence of clinical and subclinical endometritis was also calculated.

Predicting Ability. The test characteristics for the identified thresholds when predicting non-pregnancy at first service were then computed for VD, PMN percentage, and LE testing, and for serial and parallel interpretation of VD and PMN percentage or VD and LE. Test characteristics evaluated were the area under the curve (**AUC**; obtained using logistic regression models; PROC LOGISTIC), the sensitivity (**Se**), specificity (**Sp**), and positive and negative predictive values (**PPV**, **NPV**; obtained using 2x2 tables and asymptotic confidence intervals; PROC FREQ). The agreement between the diagnostic tools (VD, PMN percentage, and LE) was also assessed using the kappa test (PROC FREQ).

RESULTS

Herd size ranged from 40 to 310 cows and most herds (n=22) were housed in tie-stall facilities (4 herds in free stall housing). A total of 804 Holstein cows from 26 herds were enrolled in the present study but LE testing was only performed on 627 of them because of delay to obtain material at the start of the study. Four cows were bred after 100 DIM and were not considered in the analyses.

Diagnostic Criteria. The combinations of diagnostic criteria that had the best ability to predict non-pregnancy at first service (lowest AIC) were $VD \geq 4$ and PMN percentage ≥ 6 (Table 1), and $VD \geq 4$ and $LE \geq 3$ (Table 2).

Endometritis Prevalence. Table 3 presents the proportion of cows at or above the diagnostic criterion for VD (clinical endometritis) and the proportion of them that are below and at or above the diagnostic criterion for PMN percentage or for LE. This table also presents the proportion of cows below the diagnostic criterion for VD and at or above the diagnostic criterion for PMN percentage or for LE (subclinical endometritis), and the proportion of cows below the diagnostic criterion for VD and below the diagnostic criterion for PMN percentage or for LE (“unaffected”). Using the previously identified diagnostic criteria of VD and PMN percentage, the overall prevalence of clinical and subclinical endometritis was 16.2% (n=129) and 25.6% (n=203), respectively. Using the diagnostic criteria of VD and LE, the overall prevalence of clinical and subclinical endometritis was 17.2% (n=107) and 10.8% (n=67), respectively. Herd prevalence ranged from 0 to 35.9% for clinical endometritis, from 9.1 to 44.4% for subclinical endometritis when diagnosed by cytology and from 0 and 21.0% for subclinical endometritis when diagnosed by LE testing.

Predicting Ability. The AUC of the tests using the diagnostic criteria previously identified are 0.521, 0.595, and 0.558 for VD, PMN percentage, and LE testing, respectively (Table 4). There was a statistical difference between AUC of VD and PMN percentage and between AUC of VD and LE ($p < 0.01$). When VD was used in series with PMN percentage or LE testing, AUC were 0.522 and 0.518, respectively. When VD was used in parallel with PMN percentage or LE testing, AUC were 0.594 and 0.549, respectively. Table 4 also presents Se, Sp, PPV, and NPV for individual test, and for serial and parallel testing.

The agreement beyond chance (kappa) between VD and PMN percentage, between VD and LE, and between PMN percentage and LE were 0.20 (0.11-0.29), 0.17 (0.10-0.23), and 0.40 (0.32-0.47), respectively.

DISCUSSION

Diagnostic Criteria. Clinical and subclinical endometritis have usually been considered separately to determine the optimal diagnostic criteria associated with an altered subsequent reproductive performance (LeBlanc et al., 2002, Gilbert et al., 2005, Barlund et al., 2008). The present study is one of the first to identify the diagnostic criteria that optimize the ability to predict non-pregnancy at first service considering both conditions and, therefore, their potential synergistic effect on reproductive performances. The use of information theoretic criteria such as the AIC allows the comparison of non-nested models and the selection of the optimal fitted model by selecting the minimal value of AIC (Burnham and Anderson, 2002). Using this approach for establishing reproductive tract disease diagnostic criteria, the present study found a diagnostic criterion for clinical endometritis that had a greater proportion of pus in the vagina than previous studies that reported a diagnostic criterion of mucopurulent (VD ≥ 3) vaginal discharge (LeBlanc et al., 2002, Williams et al., 2005, Dubuc et al., 2010). For subclinical endometritis, diagnostic criteria reported by previous studies for endometrial cytology (Barlund et al., 2008, Dubuc et al., 2010, Deguillaume et al., 2012) and LE testing (Cheong et al., 2012, Couto et al., 2013) were ranging from 5 to 8% and from moderate (LE ≥ 2) to large (LE ≥ 3) amount of leukocytes, respectively. These diagnostic criteria are similar to what was found in the present study. It is unclear at this point if the diagnostic criteria proposed in previous studies would have been the same considering both clinical and subclinical endometritis to maximize the ability to predict subsequent reproductive performance.

Endometritis Prevalence. Even though the diagnostic criteria are not exactly the same in the present study, the prevalence of clinical and subclinical endometritis are in the range of what was reported in previous studies which found prevalence from 11 to 53% (Gilbert et al., 2005, Barlund et al., 2008, Dubuc et al., 2010) and from 10 to 17% (LeBlanc et al., 2002, Barlund et al., 2008, Dubuc et al., 2010), respectively. Herd prevalence greatly varied between herds in the present study going as high as 35.9 and 44.4% for clinical and subclinical endometritis, respectively. This is similar to other studies reporting a large

variation between herds (LeBlanc et al., 2002, Gilbert et al., 2005, Barlund et al., 2008) and could suggest the influence of herd level risk factors (Cheong et al., 2011) that needs to be further investigated in the future.

Even though it was previously assumed that endometrial inflammation was present in clinical endometritis, only 55% and 33% of cows with clinical endometritis were at or above the diagnostic criteria identified for subclinical endometritis using cytology and LE testing, respectively. This observation was also reported by Dubuc et al. (2010) who reported that only one third of the cows with clinical endometritis were at or above the diagnostic criteria for subclinical endometritis.

Predicting Ability. In this study, the ability of clinical and subclinical endometritis to predict non-pregnancy at first service was assessed comparing the AUC. It is noticeable that the AUC for predicting non-pregnancy at first service using endometritis diagnostic at 35 DIM are between 0.5 and 0.6 which is only slightly better than chance. These results may be explained by the delay between the moment of the test and the event (median of 45 d) and by the various factors other than uterine health that can affect pregnancy risk at first service (LeBlanc et al., 2005, Martin et al., 2007). However, the test that predicted the most accurately non-pregnancy at first service is the PMN percentage (highest AUC; Farragi and Reiser, 2002), followed by LE testing, and finally by VD score. This suggests that subclinical endometritis is predicting more accurately non-pregnancy at first service than clinical endometritis. Even though LE testing had a generally lower predicting ability, its low cost and the possibility to use it on-farm still make it an interesting diagnostic tool for subclinical endometritis. In the current study, Se of LE to detect non-pregnancy was only half of that of PMN percentage. Within the prevalence of uterine and pregnancy statuses observed in the current study, however, LE was yielding significantly higher PPV compared to PMN percentage. Thus, it seems that this test would be more appropriate to correctly identified cows that would likely benefit from an intervention before the breeding period. This was due, mainly, to the slightly higher Sp observed when using the identified thresholds. When considering a costly economic intervention or reducing the use of antimicrobials, for

instance, LE testing could then be a very interesting option to reduce the probability of treating cows that do not need an intervention. On the other hand, a greater proportion of cows that could potentially benefit from an intervention would be left unidentified. Note that equivalent or even better PPV could be obtained for PMN percentage as well if one would use a more conservative threshold to diagnose subclinical endometritis (e.g. $\geq 8\%$, $\geq 10\%$).

As previously mentioned, not all cows with clinical endometritis were at or above the diagnostic criteria for subclinical endometritis. Also, it was observed that cows positive to two tests (clinical and subclinical endometritis) were more at risk to have altered reproductive performance than if they were positive to one test (Dubuc et al., 2010). Therefore, the ability to predict non-pregnancy at first service in cows at or above the diagnostic criteria of two tests (VD and PMN percentage or VD and LE; serial testing), and in cows at or above at least one test (VD and PMN percentage or VD and LE; parallel testing) was assessed with the AUC (Farragi and Reiser, 2002). Interestingly, the AUC were similar to the one for VD only when serial testing was used, and were higher than the one for VD but lower than the one for PMN percentage and for LE when parallel testing was used. This suggests that using serial and parallel testing would not improve the ability to predict non-pregnancy at first service compared to using subclinical endometritis test only. Serial and parallel testing would be useful mainly to increase Sp and Se, respectively, but would not result in any improvements of the PPV or NPV (Table 4). A synergistic effect between VD and PMN percentage does not, therefore, seem to be operating.

As the three tests are not predicting non-pregnancy at first service with the same accuracy, it is not surprising to find only a slight agreement between VD and PMN percentage ($\kappa = 0.20$) and between VD and LE ($\kappa = 0.17$), and a fair agreement between PMN percentage and LE ($\kappa = 0.40$; Dohoo et al., 2009). The discrepancy between VD and PMN percentage and between VD and LE is probably due to the location where the inflammation is identified but the difference between PMN percentage and LE would necessitate more investigation.

CONCLUSION

Clinical endometritis diagnosed using VD score and subclinical endometritis diagnosed using PMN percentage or LE testing could be used to predict non-pregnancy at first service but with different accuracy. The test that best predicted non-pregnancy was the PMN percentage followed by LE testing. Serial and parallel testing using those diagnostic tools did not improve the ability to predict non-pregnancy at first service.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors acknowledge Merck Animal Health for the financing of this research project. The authors also want to thank the participating farmers for their willingness to contribute to this study. Technical support provided by Jean-Philippe Pelletier, Christine Ouellet, and Catherine B. Loubier was greatly appreciated.

REFERENCES

- Barlund, C. S., T. D. Carruthers, C. L. Waldner, and C. W. Palmer. 2008. A comparison of diagnostic techniques for postpartum endometritis in dairy cattle. *Theriogenology* 69(6):714-723.
- Burnham, K. P. and D. R. Anderson. 2002. *Model Selection and Multimodel Inference*. 2nd ed ed. Springer New York.
- Chapwanya, A., K. G. Meade, F. Narciandi, P. Stanley, J. F. Mee, M. L. Doherty, J. J. Callanan, and C. O'Farrelly. 2010. Endometrial biopsy: a valuable clinical and research tool in bovine reproduction. *Theriogenology* 73(7):988-994.
- Cheong, S. H., D. V. Nydam, K. N. Galvao, B. M. Crosier, and R. O. Gilbert. 2011. Cow-level and herd-level risk factors for subclinical endometritis in lactating Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 94(2):762-770.
- Cheong, S. H., D. V. Nydam, K. N. Galvao, B. M. Crosier, A. Ricci, L. S. Caixeta, R. B. Sper, M. Fraga, and R. O. Gilbert. 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.
- Deguillaume, L., A. Geffré, L. Desquilbet, A. Dizien, S. Thoumire, C. Vornière, F. Constant, R. Fournier, and S. Chastant-Maillard. 2012. Effect of endocervical inflammation on days to conception in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 95(4):1776-1783.
- Dohoo, I. R., S. W. Martin, and H. Stryhn. 2009. *Veterinary epidemiologic research*. 2nd ed. VER, Inc., Charlottetown, P.E.I.
- Dubuc, J., T. F. Duffield, K. E. Leslie, J. S. Walton, and S. J. LeBlanc. 2010. Definitions and diagnosis of postpartum endometritis in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 93(11):5225-5233.
- Faraggi, D. and B. Reiser. 2002. Estimation of the area under the ROC curve. *Statistics in medicine* 21(20):3093-3106.
- Gilbert, R. O., S. T. Shin, C. L. Guard, and H. N. Erb. 1998. Incidence of endometritis and effects on reproductive performance of dairy cows. *Theriogenology* 49(1):251.
- Gilbert, R. O., S. T. Shin, C. L. Guard, H. N. Erb, and M. Frajblat. 2005. Prevalence of endometritis and its effects on reproductive performance of dairy cows. *Theriogenology* 64(9):1879-1888.

- Kasimanickam, R., T. F. Duffield, R. A. Foster, C. J. Gartley, K. E. Leslie, J. S. Walton, and W. H. Johnson. 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, C. J. Gartley, K. E. Leslie, J. S. Walton, and W. H. Johnson. 2005. A comparison of the cytobrush and uterine lavage techniques to evaluate endometrial cytology in clinically normal postpartum dairy cows. *Can. Vet. J.* 46(3):255-259.
- LeBlanc, S. 2005. Overall reproductive performance of Canadian dairy cows: Challenges we are facing. *Adv. Dairy Technol.* 17:137-157.
- LeBlanc, S. 2007. Economics of Improving Reproductive Performance in Dairy Herds. Pages 201-214 in *Proc. West. Can. Dairy Sem. Adv. Dairy Technol.*, Edmonton, Canada.
- LeBlanc, S. J., T. F. Duffield, K. E. Leslie, K. G. Bateman, G. P. Keefe, J. S. Walton, and W. H. Johnson. 2002. Defining and diagnosing postpartum clinical endometritis and its impact on reproductive performance in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 85(9):2223-2236.
- Martin, J. L., K. A. Vonnahme, D. C. Adams, G. P. Lardy, and R. N. Funston. 2007. Effects of dam nutrition on growth and reproductive performance of heifer calves. *J. Anim. Sci.* 85(3):841-847.
- McDougall, S., R. Macaulay, and C. Compton. 2007. Association between endometritis diagnosis using a novel intravaginal device and reproductive performance in dairy cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 99(1-2):9-23.
- Runciman, D. J., G. A. Anderson, and J. Malmo. 2009. Comparison of two methods of detecting purulent vaginal discharge in postpartum dairy cows and effect of intrauterine cephalosporin on reproductive performance. *Aust. Vet. J.* 87(9):369-378.
- Williams, E. J., D. P. Fischer, D. U. Pfeiffer, G. C. England, D. E. Noakes, H. Dobson, and I. M. Sheldon. 2005. Clinical evaluation of postpartum vaginal mucus reflects uterine bacterial infection and the immune response in cattle. *Theriogenology* 63(1):102-117.

Table 1. Akaike Information Criterion (AIC) values for models predicting pregnancy status at first service for various diagnostic criterion combinations of vaginal discharge and endometrial cytology test results stratified by their disease status at 35 (± 7) DIM in 800 Holstein dairy cows.

Diagnostic criteria		AIC	Cows pregnant ³ (%)		
Vaginal discharge ¹	Cytology (%PMN ²)		CLIN	SUBCLIN	Unaffected
≥ 2	≥ 1	953.5	26.6	29.9	30.7
	≥ 2	953.2	26.6	28.9	31.6
	≥ 4	952.8	26.6	27.2	31.4
	≥ 6	948.6	26.6	20.9	32.8
	≥ 8	951.3	26.6	22.9	31.6
	≥ 10	952.4	26.6	24.6	31.1
	≥ 14	950.0	26.6	18.2	31.6
	≥ 18	946.0	26.6	11.4	31.9
≥ 3	≥ 1	953.0	28.7	26.6	32.9
	≥ 2	950.4	28.7	24.7	33.2
	≥ 4	948.5	28.7	21.4	31.9
	≥ 6	940.5	28.7	16.3	32.6
	≥ 8	943.8	28.7	16.4	31.6
	≥ 10	946.4	28.7	17.1	31.0
	≥ 14	942.3	28.7	13.1	31.1
	≥ 18	938.5	28.7	9.1	31.0
≥ 4	≥ 1	948.1	23.3	28.0	33.3
	≥ 2	945.6	23.3	26.4	33.9
	≥ 4	936.8	23.3	21.7	34.0
	≥ 6	924.7	23.3	16.8	34.9
	≥ 8	931.7	23.3	16.9	33.7
	≥ 10	934.7	23.3	17.2	33.1
	≥ 14	927.5	23.3	13.9	33.1
	≥ 18	926.4	23.3	10.7	32.7

¹ Metrichick vaginal scoring (0: no discharge, 1: clear mucus, 2: mucus with flecks of pus, 3: mucopurulent discharge, 4: purulent discharge and 5: foul smelling discharge)

² Percentage of polymorphonuclear cells (%PMN)

³ Percentage of cows pregnant at first service. All models were adjusted for herd clustering (random effect). Percentage of cows pregnant at first service in each category (CLIN, SUBCLIN, and unaffected) was derived from each model.

Table 2. Akaike Information Criterion (AIC) values for models predicting pregnancy status at first service for various diagnostic criterion combinations of vaginal discharge and leukocyte esterase test results stratified by their disease status at 35 (± 7) DIM in 623 Holstein dairy cows.

Diagnostic criteria		AIC	Cows pregnant ³ (%)		
Vaginal discharge ¹	Leukocyte esterase ²		CLIN	SUBCLIN	Unaffected
≥ 2	≥ 0.5	819.8	26.6	25.4	34.0
	≥ 1	819.7	26.6	22.9	31.2
	≥ 2	816.6	26.6	17.1	31.2
	≥ 3	816.8	26.6	10.7	29.8
≥ 3	≥ 0.5	796.6	28.7	24.2	33.3
	≥ 1	793.9	28.7	21.6	30.5
	≥ 2	791.0	28.7	17.0	30.0
	≥ 3	793.4	28.7	11.6	28.6
≥ 4	≥ 0.5	760.3	23.3	26.7	34.3
	≥ 1	760.7	23.3	25.3	31.5
	≥ 2	755.1	23.3	19.9	32.2
	≥ 3	755.0	23.3	14.9	30.9

¹ Metricheck vaginal scoring (0: no discharge, 1: clear mucus, 2: mucus with flecks of pus, 3: mucopurulent discharge, 4: purulent discharge and 5: foul smelling discharge)

² Leukocyte esterase scoring (0: negative, 0.5: trace of leukocytes, 1: small amount of leukocytes, 2: moderate amount of leukocytes, and 3: large amount of leukocytes)

³ Percentage of cows pregnant at first service. All models were adjusted for herd clustering (random effect). Percentage of cows pregnant at first service in each category (CLIN, SUBCLIN, and unaffected) was derived from each model.

Table 3. Prevalence of endometritis status identified using vaginal discharge score (below and at or above 4) for clinical endometritis, and endometrial cytology (polymorphonuclear percentage below and at or above 6) or leukocyte esterase testing (below and at or above 3) for subclinical endometritis.

	Vaginal discharge	
	≥ 4 (+)	< 4 (-)
PMN percentage		
≥ 6 (+)	71 (8.9%)	203 (25.6%)
< 6 (-)	58 (7.3%)	462 (58.2%)
Leukocyte esterase		
≥ 3 (+)	35 (5.6%)	67 (10.8%)
< 3 (-)	72 (11.6%)	447 (72.0%)

Table 4. Test characteristics [area under the curve (AUC), sensitivity (Se), specificity (Sp), positive and negative predictive values (PPV, NPV)] of vaginal discharge score, endometrial cytology, and leukocyte esterase (LE) used individually, in series or in parallel in Holstein cows at 35 (\pm 7) DIM to predict non-pregnancy status at first service.

Diagnostic tools	Optimal diagnostic criteria	AUC	Se (95% CI)	Sp (95% CI)	PPV (95% CI)	NPV (95% CI)
Vaginal discharge	≥ 4	0.521	17.3 (14.2-20.4)	82.7 (79.6-85.8)	76.7 (69.5-84.0)	29.5 (26.0-32.9)
Cytology	≥ 6	0.595	39.8 (35.8-43.8)	60.2 (56.2-64.2)	82.9 (78.4-87.3)	34.3 (30.2-38.4)
Leukocyte esterase	≥ 3	0.558	19.6 (16.0-23.3)	80.4 (76.7-84.0)	86.3 (79.6-93.0)	30.9 (26.9-34.9)
Serial testing ¹						
VD ² and cytology		0.522	10.1 (7.7-12.6)	89.9 (87.4-92.3)	81.7 (72.7-90.7)	29.5 (26.2-32.8)
VD and LE ³		0.518	5.4 (3.6-7.3)	94.6 (92.7-96.4)	88.6 (78.0-99.1)	29.3 (26.1-32.5)
Parallel testing ⁴						
VD or cytology		0.594	46.9 (42.8-50.9)	53.2 (49.1-57.2)	80.7 (76.5-86.0)	35.0 (30.7-39.4)
VD or LE		0.549	27.3 (23.6-30.9)	72.7 (69.1-76.4)	79.6 (74.0-85.2)	31.1 (27.4-34.8)

¹ A cow is classified positive if both tests are positive; anything else is negative

² Vaginal discharge

³ Leukocyte esterase testing

⁴ A cow is classified positive if at least one test is positive; anything else is negative

Article 2.

Impact of intrauterine cephalosporin infusion on first service reproductive performance in postpartum dairy cows

Article à soumettre au *Journal of Dairy Science*

INTRAUTERINE CEPHAPIRIN INFUSION IN DAIRY COWS

Impact of intrauterine cephalosporin infusion on first service reproductive performance in postpartum dairy cows

J. Denis-Robichaud*, J. Dubuc*¹

* Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, C.P. 5000, St-Hyacinthe, Québec, J2S 7C6, Canada

¹Corresponding author: Jocelyn Dubuc

Interpretive summary

Impact of intrauterine cephalosporin infusion on first service reproductive performance in postpartum dairy cows. *Denis-Robichaud et al.* The objective of this study was to assess the impact of an intrauterine infusion of cephalosporin on first service reproductive performance. Cephalosporin treatment tended to have a positive impact in dairy cows with subclinical endometritis when diagnosed with endometrial cytology but not in cows with clinical endometritis or cows unaffected by endometritis. The use of diagnostic test results in series or in parallel did not increase the capacity to identify cows that could benefit from the treatment.

ABSTRACT

The objective of this study was to quantify the impact of an intrauterine infusion of cephalosporin on first service reproduction performance in dairy cows affected by clinical or subclinical endometritis, and in dairy cows unaffected by any forms of endometritis. The impact of prolonged postpartum anovulation period on the efficacy of treatment was also assessed in this project. A total of 1,627 cows from 26 herds were examined at 35 ± 7 d in milk for clinical and subclinical endometritis. Regardless of their reproductive health status, cows were randomly assigned to either receive no treatment or an intrauterine infusion of cephalosporin benzathin (Metricure, Merck Animal Health, Kirkland, Qc, Canada). For every enrolled cow, serum progesterone was measured at 35 and 49 (± 7) d in milk and cows were later classified as ovular or anovular cows. Endometritis status was determined by vaginal discharge scoring (clinical endometritis; prevalence = 17.9%), by endometrial inflammation using endometrial cytology (subclinical endometritis – cytology; prevalence = 24.6%), by leukocyte esterase testing (subclinical endometritis – leukocyte esterase; prevalence = 10.1%), and by combining tests results using serial and parallel testing strategies. No effect of the treatment on first service pregnancy risk was observed in cows with clinical endometritis (control: 23.3%; cephalosporin: 26.5%) or in cows unaffected by any forms of endometritis (control: 34.9%; cephalosporin: 32.6%). A trend of association was noted in cows diagnosed with subclinical endometritis by cytology (control: 16.8%; cephalosporin: 24.4%) but not when diagnosed by leukocyte esterase testing (control: 14.9%; cephalosporin: 20.6%). The combined parallel use of vaginal discharge and endometrial cytology results did not improve the identification of cows for treatment compared to the use of endometrial cytology results only. Comparing anovular and ovular cows, no significant result was found but a numerical difference was observed in cows affected by clinical endometritis (anovular: OR = 0.31; ovular: OR = 1.33). Results from this study suggest that, although a trend for higher first service pregnancy risk in treated cows diagnosed with subclinical endometritis was observed, a cephalosporin treatment at 35 d in milk was not improving reproductive performance. These results also suggest that prolonged anovulation period in cows may influence the impact of treatment on first service reproductive performance.

Key Words: anovulation, cephalosporin, endometritis, treatment

INTRODUCTION

Endometritis has been associated with impaired subsequent reproductive performance in postpartum dairy cows (LeBlanc et al., 2002a, Gilbert et al., 2005, Dubuc et al., 2010). Postpartum endometritis can be classified in clinical and subclinical forms (LeBlanc, 2008) which were shown to have additive detrimental impacts on reproduction (Dubuc et al., 2010). The use of intrauterine infusion of cephalosporin is homologated in Canada (Merck Animal Health, Montréal, Canada) and other countries for the treatment of postpartum endometritis. Intrauterine cephalosporin infusion has been shown by multiple studies to improve reproductive performance of dairy cows with clinical endometritis (LeBlanc et al., 2002b, Runciman et al., 2008) but little data are available for cows with subclinical endometritis (Kasimanickam et al., 2005) and for cows unaffected by endometritis (Kasimanickam et al., 2005). Interestingly, no studies have considered simultaneously clinical and subclinical forms of endometritis when investigating the efficacy of an intrauterine cephalosporin infusion. Such approach could provide more insight on the benefit of doing postpartum endometritis surveillance in dairy herds and on the benefit of treating these cows. It could also optimize the use of antibiotic to animals that really benefit from it.

Endometritis diagnostic tools such as Metricheck (Simcro, Hamilton, New Zealand), vaginoscopy (LeBlanc et al., 2002a, Runciman et al., 2009), cytobrush (Kasimanickam et al., 2004), and leukocyte esterase (Cheong et al., 2012, Couto et al., 2013) have been shown to be useful for identifying cows with poorer subsequent reproductive performance. The combined use (serial or parallel testing) of some of these diagnostic tools were not improving the ability to predict non-pregnancy at first service (Denis-Robichaud and Dubuc, 2013) but it remains unclear if such combined use of diagnostic tests would improve the identification of cows that would benefit from an intrauterine cephalosporin therapy.

Although the use of intrauterine cephalosporin therapy has been shown to generally be beneficial for cows with clinical endometritis (LeBlanc et al., 2002b, Runciman et al., 2008),

only one study investigated the impact of having or not a corpus luteum at the time of infusion (as a proxy for identifying anovular cows; LeBlanc et al., 2002b). Prolonged postpartum anovulation has been associated with poorer reproductive performance (Walsh et al., 2007, Galvao et al., 2010, Dubuc et al., 2012) and the positive impact of intrauterine cephalosporins in these cows could be influenced by it. Based on current literature, it remains unclear if the presence of prolonged anovulation would reduce the benefit from intrauterine infusion in cows with clinical and subclinical endometritis.

Therefore, the first objective of this study was to quantify the impact of an intrauterine infusion of cephalosporins on reproductive performance in postpartum dairy cows with clinical endometritis, subclinical endometritis, or unaffected by any forms of endometritis. The second objective was to determine if parallel and serial testing strategies would improve identification of cows that would benefit from cephalosporin treatment. The third objective was to determine if the presence of a prolonged anovulation period would influence the impact of cephalosporin treatment.

MATERIALS AND METHODS

Cows from 26 commercial dairy herds were enrolled in a randomized clinical trial conducted between October 2011 and November 2012. Herds in a 150 km radius around St-Hyacinthe, Québec were required to use a computerized record system and an ovulation synchronization protocol to synchronize first breeding of all cows around 70 DIM. All cows that calved in these herds during the study period and that were bred at least once before 100 DIM were enrolled in the trial and reproductive performance at first service was recorded. The estimated sample size needed for this study was 2400 cows. This sample size was planned to identify a difference of 10% in pregnancy risk at first service between treated and untreated cows from 20 herds (clusters), with 95% confidence and 80% power (Dohoo et al., 2009) when expecting a disease prevalence of 25%.

Biweekly, cows were examined for clinical and subclinical endometritis at 35 (\pm 7) DIM by a technician and a veterinarian. Clinical endometritis was diagnosed using vaginal

discharge (**VD**) score assessed with the Metricheck device (0: no discharge, 1: clear mucus, 2: mucus with flecks of pus, 3: mucopurulent discharge, 4: purulent discharge or 5: foul smelling discharge; McDougall et al., 2007). Subclinical endometritis was diagnosed using endometrial cytology and leukocyte esterase (**LE**) colorimetric testing with a cytobrush adapted for use in cattle (VWR CanLab, Mississauga, Canada; Kasimanickam et al., 2004). For that, the cytobrush was rolled on a clean glass microscope slide then plunged in an individual vial (3 ml) containing 1 ml of saline 0.9% (NaCl 0.9% Irrigation, Baxter Corporation, Mississauga, Canada). The microscope slides were stained within 12 hours with modified Wright-Giemsa stain (Protocole-Hema3; Biochemical Sciences, Swedesboro, NJ) and coverslips were applied when dry (Barlund et al., 2008). Percentage of polymorphonuclear cells (**PMN**) was determined at 400x magnification by two observers (technician and veterinarian; Kasimanickam et al., 2004) evaluating two different regions of each slide on a total of 200 cells (polymorphonuclear and endometrial cells). Slide readers were blinded to on-farm disease clinical findings using separate data loggers.

Within 12 hours of collection, the individual vial containing the cytobrush was shook for 10 seconds and a drop of the solution was put on a LE commercial test strip (Multistix 10 SG; Bayer Corporation, Elkart, IN, USA) with a pipette. Because of material availability, LE testing began in December 2011. The result for every cow was read according to the manufacturer colorimetric chart after two minutes, and the score was recorded as 0: negative, 0.5: trace of leukocytes, 1: small amount of leukocytes, 2: moderate amount of leukocytes, and 3: large amount of leukocytes (Couto et al., 2013).

Diagnostic criteria for definitions of clinical and subclinical endometritis were determined in previous work based on their effect on subsequent reproductive performance (Denis-Robichaud and Dubuc, 2013). Thus, the diagnostic criterion used for clinical endometritis was a score of $VD \geq 4$ (purulent discharge or worse). Subclinical endometritis was defined as absence of clinical endometritis and a percentage of PMN $\geq 6\%$ when diagnosed by cytology, or a LE score ≥ 3 (large amount of leukocytes) when diagnosed by LE testing. Cows that had absence of clinical and subclinical endometritis were considered as

“unaffected”. Regardless of their reproductive health status, cows were randomly assigned to one of the two treatment groups: treated with an intrauterine infusion of 500 mg of cephalixin benzathin (Metricure, Merck Animal Health, Kirkland, Qc, Canada; treatment group) or not treated (negative control group). Because the control group did not receive any treatment, producers were not blinded of treatment.

At 35 (± 7) and 49 (± 7) DIM, a blood sample (10 ml) was drawn from coccygeal vessels of every enrolled cow with an evacuated tube without additive (Vacutainer; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). Samples were kept on ice and allowed to clot. Within 12 hours, samples were centrifuged and serum was harvested and frozen at $- 20^{\circ}\text{C}$. These samples were submitted for progesterone (P4) measurement at the clinical diagnostic laboratory of the Faculté de médecine vétérinaire of the Université de Montréal using a sequential competitive immunoassay (Immulite; Siemens, Mississauga, ON, Canada). The inter- and intra-assay CV for P4 were 8.2 and 7.1%, respectively. A cow was considered to have a prolonged anovulation period if both progesterone samples, taken 14 days apart, had values under 1 ng/ml.

Statistical analyses

All statistical analyses were performed using SAS 9.3 (SAS Institute, Cary, NC, United States) considering the cow as the unit of interest. Individual data such as parity (first, second or greater), season of calving (winter: January to March; spring: April to June, summer: July to September, fall: October to December), and reproductive and culling events were exported from the computerized record system (DSAHR Inc., Saint-Hyacinthe, QC, Canada) to Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Richmond, WA, United States).

Crude associations between intrauterine cephalixin treatment at 35 ± 7 DIM and prolonged anovulation period, and between cephalixin treatment and reproductive performance at first service were assessed (adjust for clustering with random intercepts; PROC GLIMMIX). These associations were evaluated for all cows (overall) and for each endometritis category (clinical endometritis, subclinical endometritis, and unaffected cows). The impact of treatment on pregnancy status at first service was computed in logistic

regression models (PROC GLIMMIX) for cows in each endometritis category (clinical endometritis, subclinical endometritis, unaffected, and endometritis diagnosed by serial and parallel interpretation of VD and PMN percentage or of VD and LE testing). All models were adjusted for herd effect (random intercepts). Parity, season of calving, and prolonged anovulation period were offered to all models as confounders and were kept whenever the change in rate ratio estimates was superior to 10 percent (Maldonado and Greenland, 1993). Interaction between remaining confounders and treatment were also tested in models and kept if the likelihood ratio test was statistically significant ($P < 0.05$).

$$Y_{ij} \sim \text{bin}(P(Y_{ij}))$$

$$\text{Logit}(P(Y_{ij})) = \beta_{0ij} + \beta_1 \text{TX}_{ij} + \beta_2 \text{PARITY}_{ij} + \beta_3 \text{SEASON}_{ij} + \beta_4 \text{ANOVU}_{ij} + u_j$$

where $P(Y_{ij})$ is the probability of non-pregnancy at first service of cow i from herd j and is a function of the following explanatory variables through the logit transformation; β_0 is the intercept; β_1 is the regression coefficient for treatment [0 (control) or 1 (treated)]; β_2 is the regression coefficient for parity [1 (primiparous) or 2 (multiparous)]; β_3 is the regression coefficient for season of calving (1 to 4); β_4 is the regression coefficient for prolonged anovulation status [0 (ovular) or 1 (anovular)]; and u_j is the random herd effect for the j^{th} herd.

The impact of intrauterine cephalosporin treatment on first service pregnancy risk was determined separately for ovular and anovular cows using logistic regression models (GLIMMIX procedure). To assess the influence of prolonged anovulation period on the treatment's effect, logistic regression models considering prolonged anovulation as independent variable and pregnancy status at first service as dependent variable were built for every endometritis category (clinical endometritis, subclinical endometritis, unaffected, and endometritis diagnosed by serial and parallel testing). These models were also adjusted for herd effect and confounders. In all models, statistical significance was defined as a P -value ≤ 0.05 and statistical trend was defined as P -value above 0.05 but below 0.10 (Fisher, 1925).

RESULTS

Data from 1,627 Holstein cows were collected during the study period, but LE testing was only conducted on 1,281 of them because it could only be started in December 2011. Of all the cows enrolled in the study, 31.8% were primiparous cows and 68.2% were multiparous cows. The overall prevalence of clinical endometritis was 17.9%, and ranged from 0 to 35.9% in participating herds. The overall prevalence of subclinical endometritis was 24.6% (from 9.1 to 44.4% in herds) when diagnosed by cytology, and 10.1% (from 0 to 25.0% in herds) when diagnosed by LE testing. Prevalence of endometritis was similar in treated and control groups (Table 1). Prevalence of prolonged anovulation period was higher in the control group than in the treated group when all cows were considered, and when only unaffected cows were considered (Table 1). The overall prevalence of prolonged anovulation was 28.6%, and ranged from 3.7 to 56.3% in herds. No association was found between intrauterine cephalosporin treatment and pregnancy risk at first service when tests were used individually, nor when VD and cytology or VD and LE testing were used in series or in parallel (Table 2). Overall, a slight numerical increase of first service pregnancy risk was observed for the treatment group in ovular cows (control: 39.5%; cephalosporin: 44.1%; *P*-value: 0.40) but a numerical decrease was found in anovular cows (control: 31.5%; cephalosporin: 26.5%; *P*-value: 0.45). Associations between treatment and pregnancy risk at first service were investigated when stratifying for each endometritis status and for their prolonged anovulation status (Table 3 and 4).

DISCUSSION

This study is one of the first to quantify the impact of intrauterine cephalosporin therapy in postpartum dairy cows when considering both clinical and subclinical endometritis simultaneously. Previous studies only provided data on cephalosporin efficacy in dairy cows affected by clinical (LeBlanc et al., 2002b) or subclinical (Kasimanickam et al., 2005) endometritis.

There was no effect of intrauterine cephalosporin therapy on reproductive performance at first service in cows with clinical endometritis. Other studies also reported no impact at first service but generally reported that cephalosporin treatment was associated with an improved pregnancy hazard later in lactation (LeBlanc et al., 2002b, Runciman et al., 2008). Such a late effect is hard to really associate with the effect of a treatment early in the lactation and was not explored in this project. The explanation of the difference in treatment impact between studies could be in the diagnostic criterion used for defining clinical endometritis (Denis-Robichaud and Dubuc, 2013) used in the present study which was slightly different from previous ones (LeBlanc et al., 2002b, Runciman et al., 2008). Indeed, cows diagnosed with clinical endometritis in the present study had a more severe condition (purulent discharge or worse) than in others studies (generally mucopurulent discharge or worse), and cephalosporin treatment used may not be sufficient to create a positive impact on subsequent reproductive performance in a population of cows affected by a more severe condition. Interestingly, the population of cows enrolled in the current project had similar prevalences of clinical endometritis (Metricheck; 17.9%) than studies using different diagnostic criterion (LeBlanc et al., 2002a, Runciman et al., 2008). McDougall (2001) reported that only cows with retained fetal membranes, a stillborn calf, and cows showing vaginal discharge (diagnosed by Metricheck between 14 and 107 DIM) benefited from cephalosporin treatment. Unfortunately, these data were not collected in the present study.

A tendency of greater first service pregnancy risk was observed in cows diagnosed with subclinical endometritis (using endometrial cytology) and treated with intrauterine cephalosporin treatment compared to cows not treated. The magnitude of this difference was 7.6% (P -value = 0.06). The use of LE testing instead of cytology resulted in smaller and not statistically significant measures of associations between treatment and first service pregnancy risk (cytology: OR = 1.60, P -value = 0.06; LE testing: OR = 1.23, P -value = 0.51). Such results may be explained by the poorer sensitivity of LE testing for identifying cows with poor subsequent reproductive performance (Cheong et al., 2012, Couto et al., 2013, Denis-Robichaud and Dubuc, 2013).

The impact of intrauterine cephalosporin treatment in “unaffected” cows has rarely been assessed in the past (Kasimanickam et al., 2005) and no statistically significant benefit was reported. In the present study, definition of clinical and subclinical endometritis were slightly different from previous studies (LeBlanc et al., 2002b, Kasimanickam et al., 2005) which may induce the population of “unaffected” cows to be slightly different but there was no association between treatment and first service pregnancy risk in these cows.

Serial and parallel testing strategies did not improve the ability to predict non-pregnancy at first service (Denis-Robichaud and Dubuc, 2013) but may be possible that they could identify more accurately cows that would benefit from a treatment. In field conditions, VD testing is readily available and is currently used alone for treatment decision making. Because subclinical endometritis requires more manipulation for sampling and provide a delayed result, it has never been assessed if testing for subclinical endometritis and clinical endometritis simultaneously would improve the decision made for treatment compared to the use of VD only. In the present study, serial and parallel testing results were analyzed in different models for that purpose. Considering the combined use of VD and cytology results, parallel testing showed a statistical trend of association between treatment and first service pregnancy risk (OR = 1.38, *P*-value = 0.08) which was greater than VD results used alone (OR = 1.16, *P*-value = 0.59) but not than cytology used alone (OR = 1.60, *P*-value = 0.06). Regarding the combined use of VD and LE testing results, neither parallel (OR = 1.13, *P*-value = 0.57) nor serial (OR = 0.93, *P*-value = 0.88) testing identified cows that would benefit from an intrauterine infusion of cephalosporin.

A prolonged postpartum anovulation period has been shown to be associated with subsequent reproductive impairment (Walsh et al., 2007, Galvao et al., 2010, Dubuc et al., 2012). In the present study, prevalence of prolonged anovulation at 49 (\pm 7) DIM in control group (31.6%), was slightly higher than previously reported data (Galvao et al., 2010, Dubuc et al., 2012). Variation in herd prevalence from 3.7 to 56.3% was substantial but not surprising, as previously reported (Walsh et al., 2007). Interestingly, when no corpus luteum was palpable in cows with clinical endometritis, LeBlanc et al. (2002b) showed that

intrauterine cephalosporin treatment had a smaller effect on reproductive performance than when cows had a palpable corpus luteum. Even though the interaction between cephalosporin treatment benefit and prolonged anovulation was not significant in the current study, the pregnancy risk at first service in cows affected by prolonged anovulation greatly decreased when cows were treated (compared to untreated). On the other hand, pregnancy risk at first service increased in treated cows unaffected by prolonged anovulation period. When data were stratified by prolonged anovulation status, measures of associations suggested that intrauterine cephalosporin treatment could be less effective (subclinical endometritis) or even harmful (clinical endometritis) when administered to cows with prolonged anovulation period. Further investigation should focus at better understanding this situation. Until this finding is confirmed by an appropriately designed study, it is reasonable to suspect that systematic intrauterine cephalosporin treatment of cows affected by clinical endometritis in herds with a high prevalence of prolonged anovulation could potentially be harmful.

CONCLUSION

The use of intrauterine cephalosporin treatment tended to improve first service pregnancy risk in cows with subclinical endometritis, but not in cows with clinical endometritis or unaffected by any forms of endometritis. Interestingly, the use of cephalosporin treatment in cows affected by clinical endometritis and prolonged postpartum anovulation was, even though not significant, numerically detrimental. Further research should clarify this finding.

ACKNOWLEDGEMENTS

Financial support for this research project was provided by Merck Animal Health. The authors are grateful to the farmers that participated to this study. Greetings are extended to Jean-Philippe Pelletier, Christine Ouellet, and Catherine B. Loubier for their technical support.

REFERENCES

- Barlund, C. S., T. D. Carruthers, C. L. Waldner, and C. W. Palmer. 2008. A comparison of diagnostic techniques for postpartum endometritis in dairy cattle. *Theriogenology* 69(6):714-723.
- Cheong, S. H., D. V. Nydam, K. N. Galvao, B. M. Crosier, A. Ricci, L. S. Caixeta, R. B. Sper, M. Fraga, and R. O. Gilbert. 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.
- Denis-Robichaud, J. and J. Dubuc. Unpublished data, 2013. Definition and diagnosis of clinical and subclinical endometritis in dairy cows and their impact on reproductive performance. Université de Montréal.
- Dohoo, I. R., S. W. Martin, and H. Stryhn. 2009. *Veterinary epidemiologic research*. 2nd ed. VER, Inc., Charlottetown, P.E.I.
- Dubuc, J., T. F. Duffield, K. E. Leslie, J. S. Walton, and S. J. LeBlanc. 2010. Definitions and diagnosis of postpartum endometritis in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 93(11):5225-5233.
- Dubuc, J., T. F. Duffield, K. E. Leslie, J. S. Walton, and S. J. LeBlanc. 2012. Risk factors and effects of postpartum anovulation in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 95(4):1845-1854.
- Fisher, R. A. 1925. *Statistical Methods For Research Workers*. Cosmo Publications.
- Galvao, K. N., M. Frajblat, W. R. Butler, S. B. Brittin, C. L. Guard, and R. O. Gilbert. 2010. Effect of early postpartum ovulation on fertility in dairy cows. *Reprod. Domest. Anim.* 45(5):e207-211.
- Gilbert, R. O., S. T. Shin, C. L. Guard, H. N. Erb, and M. Frajblat. 2005. Prevalence of endometritis and its effects on reproductive performance of dairy cows. *Theriogenology* 64(9):1879-1888.
- Kasimanickam, R., T. F. Duffield, R. A. Foster, C. J. Gartley, K. E. Leslie, J. S. Walton, and W. H. Johnson. 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, C. J. Gartley, K. E. Leslie, J. S. Walton, and W. H. Johnson. 2005. The effect of a single administration of cephapirin or cloprostenol on the reproductive performance of dairy cows with subclinical endometritis. *Theriogenology* 63(3):818-830.

- LeBlanc, S. J., T. F. Duffield, K. E. Leslie, K. G. Bateman, G. P. Keefe, J. S. Walton, and W. H. Johnson. 2002a. Defining and diagnosing postpartum clinical endometritis and its impact on reproductive performance in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 85(9):2223-2236.
- LeBlanc, S. J., T. F. Duffield, K. E. Leslie, K. G. Bateman, G. P. Keefe, J. S. Walton, and W. H. Johnson. 2002b. The effect of treatment of clinical endometritis on reproductive performance in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 85(9):2237-2249.
- LeBlanc, S. J. 2008. Postpartum uterine disease and dairy herd reproductive performance: a review. *Vet. J.* 176(1):102-114.
- Maldonado, G. and S. Greenland. 1993. Simulation study of confounder-selection strategies. *Am. J. Epidemiol.* 138(11):923-936.
- McDougall, S. 2001. Effect of intrauterine antibiotic treatment on reproductive performance of dairy cows following periparturient disease. *New Zel. Vet. J.* 49(4):150-158.
- McDougall, S., R. Macaulay, and C. Compton. 2007. Association between endometritis diagnosis using a novel intravaginal device and reproductive performance in dairy cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 99(1-2):9-23.
- Runciman, D. J., G. A. Anderson, J. Malmo, and G. M. Davis. 2008. Effect of intrauterine treatment with cephalosporin on the reproductive performance of seasonally calving dairy cows at risk of endometritis following periparturient disease. *Aust. Vet. J.* 86(7):250-258.
- Runciman, D. J., G. A. Anderson et J. Malmo. 2009. Comparison of two methods of detecting purulent vaginal discharge in postpartum dairy cows and effect of intrauterine cephalosporin on reproductive performance. *Aust. Vet. J.* 87(9):369-378.
- Walsh, R. B., D. F. Kelton, T. F. Duffield, K. E. Leslie, J. S. Walton, and S. J. LeBlanc. 2007. Prevalence and risk factors for postpartum anovulatory condition in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90(1):315-324.

Table 1. Crude associations of intrauterine cephalosporin treatment at 35 (± 7) DIM with prolonged anovulation period and first service pregnancy risk in dairy cows with clinical endometritis diagnosed by vaginal discharge score (purulent or worse) and subclinical endometritis diagnosed by endometrial cytology (polymorphonuclear percentage ≥ 6) or leukocyte esterase (LE \geq large amount of leukocytes), and in unaffected cows.

Variable	Treatment at 35 \pm 7 DIM		
	Control	Cephapirin	P-value ¹
n total (n for LE testing)	794 (620)	833 (661)	
Prevalence of endometritis (%)			
Clinical endometritis	16.1	19.3	0.14
Subclinical endometritis (cytology)	25.4	23.5	0.61
Subclinical endometritis (LE)	10.8	9.5	0.61
Prevalence of prolonged anovulation period (%)			
Overall	31.6	25.6	0.01
Clinical endometritis	32.6	24.1	0.10
Subclinical endometritis (cytology)	36.0	35.0	0.85
Subclinical endometritis (LE)	29.9	33.3	0.80
Unaffected	29.2	22.1	0.01
Pregnant at first service (%)			
Overall	28.5	29.7	0.58
Clinical endometritis	23.3	26.5	0.53
Subclinical endometritis (cytology)	16.8	24.4	0.06
Subclinical endometritis (LE)	14.9	20.6	0.48
Unaffected	34.9	32.6	0.50

¹ Adjusted for herd clustering (random intercept)

Table 2. Logistic regression models investigating the association between pregnancy risk at first service and intrauterine cephalosporin treatment in Holstein dairy cows diagnosed with endometritis at 35 (\pm 7) DIM using various testing strategies.

Endometritis and treatment status	Vaginal discharge and cytology				Vaginal discharge and leukocyte esterase			
	n	Odds ratio ¹	95% CI	P-value	n	Odds ratio ¹	95% CI	P-value
Clinical endometritis	291				242			
Cephapirin		1.16 ^a	0.67-2.02	0.59		1.05 ^a	0.57-1.93	0.88
Control		Ref.				Ref.		
Subclinical endometritis	400				275			
Cephapirin		1.60	0.98-2.62	0.06		1.37 ^{ac}	0.54-3.47	0.51
Control		Ref.				Ref.		
Unaffected	936				764			
Cephapirin		0.89 ^c	0.68-1.17	0.42		0.95 ^c	0.72-1.27	0.74
Control		Ref.				Ref.		
Serial testing ²	184				140			
Cephapirin		1.21 ^a	0.54-2.70	0.65		1.58 ^a	0.45-5.52	0.48
Control		Ref.				Ref.		
Parallel testing ³	691				517			
Cephapirin		1.38 ^a	0.96-1.99	0.08		1.14 ^a	0.69-1.88	0.60
Control		Ref.				Ref.		

¹ Odds of pregnancy at first service. Models are adjusted for herd clustering (random effect) and for significant confounders: ^a parity, ^b calving season, and ^c prolonged anovulation period.

² A cow is classified positive if both tests (vaginal discharge and cytology, or vaginal discharge and leukocyte esterase) are positive; anything else is negative

³ A cow is classified positive if at least one test (vaginal discharge or cytology, or vaginal discharge or leukocyte esterase) is positive; anything else is negative

Table 3. Logistic regression models for first service pregnancy risk considering the effect of intrauterine cephalosporin treatment in dairy cows according to their endometritis status (diagnosed using vaginal discharge scoring for clinical endometritis and **endometrial cytology** for subclinical endometritis) and stratified by their prolonged anovulation status.

Endometritis and treatment status	Ovular cows ¹				Anovular cows ²			
	n	Odds ratio ³	95% CI	P-value	n	Odds ratio ³	95% CI	P-value
Clinical endometritis	210				81			
Cephapirin		1.33 ^b	0.69-2.57	0.40		0.31 ^b	0.06-1.56	0.16
Control		Ref.				Ref.		
Subclinical endometritis	258				142			
Cephapirin		1.69 ^a	0.93-3.06	0.08		1.23 ^{ab}	0.45-3.33	0.69
Control		Ref.				Ref.		
Unaffected	696				240			
Cephapirin		0.90	0.66-1.23	0.50		0.89 ^b	0.50-1.59	0.69
Control		Ref.				Ref.		
Serial testing ⁴	136				48			
Cephapirin		1.20 ^a	0.48-2.98	0.70		0.37 ^b	0.02-8.35	0.54
Control		Ref.				Ref.		
Parallel testing ⁵	468				223			
Cephapirin		1.56 ^a	1.00-2.42	0.05		0.90	0.44-1.87	0.78
Control		Ref.				Ref.		

¹ Cows were considered to be ovular when serum progesterone > 1 ng/ml at 35 ± 7 or 49 ± 7 DIM

² Cows were considered to be anovular when serum progesterone ≤ 1 ng/ml at 35 ± 7 and 49

³ Odds of pregnancy at first service. Models are adjusted for herd clustering (random effect) and for significant confounders: ^a parity and ^b calving season

⁴ A cow is classified positive if both tests (vaginal discharge and cytology) are positive; anything else is negative

⁵ A cow is classified positive if at least one test (vaginal discharge or cytology) is positive; anything else is negative

Table 4. Logistic regression models for first service pregnancy risk considering the effect of intrauterine cephalosporin treatment in dairy cows according to their endometritis status (diagnosed using vaginal discharge scoring for clinical endometritis and **leukocyte esterase testing** for subclinical endometritis) and stratified by their prolonged anovulation status.

Endometritis and treatment status	Ovular cows ¹				Anovular cows ²			
	n	Odds ratio ³	95% CI	P-value	n	Odds ratio ³	95% CI	P-value
Clinical endometritis	178				64			
Cephapirin		1.03 ^b	0.50-2.13	0.93		0.09 ^b	0.01-1.81	0.12
Control		Ref.				Ref.		
Subclinical endometritis	189				86			
Cephapirin		1.54 ^a	0.51-4.66	0.44		0.94	0.17-5.34	0.95
Control		Ref.				Ref.		
Unaffected	554				210			
Cephapirin		0.99 ^a	0.71-1.37	0.94		0.82 ^b	0.45-1.50	0.52
Control		Ref.				Ref.		
Serial testing ⁴	109				31			
Cephapirin		1.34	0.38-4.74	0.65		2.42 ^a	0.01-958	0.87
Control		Ref.				Ref.		
Parallel testing ⁵	368				151			
Cephapirin		1.23 ^{ab}	0.68-2.22	0.50		0.51	0.14-1.87	0.31
Control		Ref.				Ref.		

¹ Cows were considered to be ovular when serum progesterone > 1 ng/ml at 35 ± 7 or 49 ± 7 DIM

² Cows were considered to be anovular when serum progesterone ≤ 1 ng/ml at 35 ± 7 and 49

³ Odds of pregnancy at first service. Models are adjusted for herd clustering (random effect) and for significant confounders: ^a parity and ^b calving season

⁴ A cow is classified positive if both tests (vaginal discharge and cytology) are positive; anything else is negative

⁵ A cow is classified positive if at least one test (vaginal discharge or cytology) is positive; anything else is negative

± 7 DIM

Discussion générale

Le diagnostic de l'endométrite clinique et de l'endométrite subclinique est généralement effectué pour identifier les animaux qui pourraient bénéficier d'un traitement, mais aussi pour obtenir des informations de prévalence de maladies utérines des troupeaux. Les objectifs de ce projet de recherche étaient de définir les endométrites clinique et subclinique à partir de différents tests fréquemment utilisés en se basant sur les performances en reproduction subséquentes des vaches laitières et d'évaluer l'impact d'un traitement intra-utérin de céphapirine sur ces performances.

I. Diagnostic et définitions de l'endométrite

Les endométrites clinique et subclinique ont été définies mainte fois dans la littérature (LeBlanc et coll., 2002a, Kasimanickam et coll., 2004, Gilbert et coll., 2005, McDougall et coll., 2007, Barlund et coll., 2008, Runciman et coll., 2009). Récemment, il a été observé que la présence d'écoulement n'était pas toujours concomitante à l'inflammation endométriale (endométrite cytologique; Dubuc et coll., 2010a, Osawa et coll., 2011). Bien que cette information soit pertinente pour la compréhension de la dynamique de l'inflammation du tractus reproducteur des vaches laitières, l'approche définissant l'endométrite comme étant de forme clinique et subclinique a été utilisée dans ce projet. Ainsi, l'endométrite clinique a été définie comme la présence d'écoulement vaginal de catégorie égale ou supérieure au seuil identifié, peu importe son statut d'inflammation endométriale (LeBlanc et coll., 2002a). L'endométrite subclinique a pour sa part été définie comme la présence d'inflammation endométriale (déterminée par cytologie ou estérase leucocytaire) égale ou supérieure au seuil déterminé, en absence d'endométrite clinique (Kasimanickam et coll., 2004).

Les seuils utilisés dans la littérature pour définir les endométrites clinique et subclinique ont été établis en utilisant les tests diagnostiques séparément (LeBlanc et coll., 2002a, Kasimanickam et coll., 2004, Gilbert et coll., 2005, Dubuc et coll., 2010a). Afin de tenir compte du lien probable entre les tests pour diagnostiquer les endométrites clinique et

subclinique, il semblait pertinent de déterminer simultanément les critères diagnostiques pour ces conditions. Ainsi, l'utilisation d'un critère d'information théorique tel le critère d'information d'Akaike (**AIC**) permettait de sélectionner le modèle le mieux adapté parmi des modèles non-nichés (Burnham and Anderson, 2002) ce qui peut être avantageux en raison de la coexistence des conditions et de leur effet néfaste additif (Dubuc et coll., 2010a).

I.I Seuils

Les seuils d'endométrite subclinique identifiés précédemment dans la littérature sont entre 5 et 8% de PMN à la cytologie entre 21 et 60 JEL (Barlund et coll., 2008, Dubuc et coll., 2010a, Deguillaume et coll., 2012) et une quantité de leucocytes modérée (entre 40 et 60 JEL) et forte (entre 21 et 47 JEL) au test d'estérase leucocytaire (Cheong et coll., 2012, Couto et coll., 2013). Les seuils identifiés dans cette étude sont similaires, soit une proportion de PMN égale ou supérieure à 6% et une forte quantité de leucocytes à la cytologie et au test d'estérase leucocytaire, respectivement. Pour ce qui est de l'endométrite clinique, le seuil régulièrement obtenu dans la littérature est l'écoulement vaginal mucopurulent (ou purulent) entre 21 et 38 JEL (LeBlanc et coll., 2002a, Williams et coll., 2005, Dubuc et coll., 2010a), alors que l'écoulement vaginal purulent (> 50% de matériel purulent) a été déterminé comme seuil dans notre projet. Ces variations entre les études supportent une différence entre les populations étudiées, mais semblent aussi être influencées par une différence dans les méthodes utilisées pour identifier les valeurs seuils. En effet, comme la présence d'inflammation endométriale est généralisée suite au vêlage (Sheldon et coll., 2002b), il est probable que plus l'échantillonnage est effectué tôt dans la période post-partum, plus le seuil d'inflammation associé à une altération des performances en reproduction subséquentes soit élevé. Il est également possible que les outils diagnostiques utilisés n'identifient pas les mêmes seuils, comme le suggère la légère différence de sensibilité et de spécificité observée entre la vaginoscopie et le Metricheck (McDougall et coll., 2007) ou entre le lavage utérin et la cytologie (Kasimanickam et coll., 2005a). Ces différences techniques entre les études posent un problème pour les comparaisons, mais

apportent des réponses différentes qui peuvent toutes être valables dans des contextes différents.

I.II Outils diagnostiques

Comme mentionné précédemment, plusieurs outils ont été présentés dans la littérature pour diagnostiquer les endométrites clinique et subclinique dont, respectivement, la vaginoscopie et le Metricheck; et la biopsie endométriale, le lavage utérin à petit volume, la cytologie endométriale et l'estérase leucocytaire (Gilbert et coll., 1998, LeBlanc et coll., 2002a, Kasimanickam et coll., 2004, McDougall et coll., 2007, Barlund et coll., 2008, Cheong et coll., 2012). Dans ce projet, deux outils ont été utilisés pour diagnostiquer l'endométrite subclinique : la cytologie endométriale et l'estérase leucocytaire. La cytologie endométriale a déjà été utilisée à maintes reprises (Kasimanickam et coll., 2004, Barlund et coll., 2008, Dubuc et coll., 2010a), mais demeure un outil peu pratique sur les fermes puisqu'un délai considérable est nécessaire pour obtenir un résultat. L'estérase leucocytaire est donc une option intéressante puisque le résultat colorimétrique est disponible presque immédiatement (Cheong et coll., 2012, Couto et coll., 2013). La correspondance entre les deux tests n'est par contre que modérée et l'estérase leucocytaire semble identifier moins d'animaux que la cytologie. Il semblerait donc pertinent de raffiner ce test afin d'en augmenter la sensibilité sans affecter outre mesure sa spécificité. Pour le diagnostic de l'endométrite clinique, seul le Metricheck a été utilisé. Cet outil s'est avéré plus sensible, mais moins spécifique que la vaginoscopie (McDougall et coll., 2007) et a été choisi dans le cadre de ce projet pour sa facilité d'utilisation dans un contexte pratique.

II. Prévalence

Bien que les seuils utilisés ne soient pas exactement les mêmes que ceux identifiés précédemment, les prévalences d'endométrite clinique et subclinique sont semblable à celles retrouvées dans la littérature pour la même période à risque (Barlund et coll., 2008, Dubuc et coll., 2010a). Il est également intéressant de constater que la prévalence d'endométrite est très variable d'un troupeau à l'autre. Cette observation a été rapportée auparavant (LeBlanc

et coll., 2002a, Gilbert et coll., 2005, Barlund et coll., 2008) et supporte la présence de facteurs de risque à l'échelle du troupeau. Bien que quelques pistes aient été suggérées (Cheong et coll., 2011), d'autres recherches seront nécessaires pour approfondir ces connaissances.

III. Efficacité du traitement intra-utérin de céphapirine

Le diagnostic d'endométrite permet l'identification des vaches à risque d'avoir des performances en reproduction altérées, ce qui rend le développement d'un traitement pouvant contrer cet impact négatif très intéressant. Il est d'autant plus pertinent de pouvoir cibler le plus précisément possible les animaux qui bénéficieront de ce traitement. L'infusion intra-utérine de céphapirine s'est avérée efficace pour améliorer les performances en reproduction des vaches atteintes d'endométrite (LeBlanc et coll., 2002b, Kasimanickam et coll., 2005b, Runciman et coll., 2008). Les résultats obtenus dans l'essai clinique de ce projet indiquent une tendance pour l'amélioration du succès à la première saillie des vaches diagnostiquées avec de l'endométrite subclinique par cytologie, tel que rapporté précédemment par Kasimanickam et coll. (2005b). Dans la littérature, l'efficacité du traitement n'a jamais été évaluée chez les vaches atteintes d'endométrite subclinique lorsque l'estérase leucocytaire est utilisée comme test diagnostique. Les résultats de notre étude montrent une association numérique positive entre le traitement et les performances en reproduction à la première saillie, mais de moindre importance comparativement à lorsque le diagnostic est effectué par cytologie. Cette différence pourrait être reliée à la sensibilité moindre de l'estérase leucocytaire par rapport à la cytologie. Contrairement à la littérature précédemment publiée (LeBlanc et coll., 2002b, Runciman et coll., 2008), aucune association n'a été observée dans notre étude entre le traitement et l'amélioration des performances en reproduction à la première saillie chez les vaches atteintes d'endométrite clinique. Bien qu'une augmentation numérique du risque de gestation soit observable (contrôle : 23.3%, céphapirine : 26.5%), la taille d'échantillon nécessaire pour obtenir la puissance pouvant soutenir un si petit changement serait immense. De plus, une si petite différence est peu intéressante en pratique et justifierait difficilement l'utilisation d'un

traitement antibiotique. Une seule autre étude publiée n'avait pas mis en évidence d'amélioration suite au traitement, mais les vaches y étaient enrôlées plus tardivement, soit jusqu'à 107 JEL (McDougall, 2001).

Comme la céphapirine intra-utérine a précédemment été associée à une amélioration des performances en reproduction chez les vaches atteintes d'endométrite clinique (LeBlanc et coll., 2002b, Runciman et coll., 2008) et que le diagnostic est simple, la vaginoscopie et le Metrichick sont couramment utilisés à des fins de prise de décision de traitement. Par contre, les résultats de cet essai clinique indiquent une lacune à l'utilisation unique du Metrichick pour identifier les animaux à traiter. Dans la présente étude, seule l'utilisation de la cytologie a permis d'identifier les animaux bénéficiant de ce traitement (tendance, $P = 0.06$).

Ce faible impact du traitement est étonnant puisque plusieurs études ont rapporté une association significative avec l'amélioration des performances en reproduction (LeBlanc et coll., 2002b, Kasimanickam et coll., 2005b, Runciman et coll., 2008). LeBlanc et coll. (2002b) avait précédemment mis en évidence une diminution marquée de l'efficacité du traitement chez les animaux n'ayant pas de corps jaune au moment du traitement. De plus, il a été démontré que l'anovulation prolongée avait un impact négatif sur les performances en reproduction subséquentes (Walsh et coll., 2007, Galvao et coll., 2010b, Dubuc et coll., 2012). Ainsi, comme les données d'anovulation prolongée étaient disponibles pour les vaches enrôlées dans le projet, la stratification selon le statut d'anovulation nous a permis de constater que le traitement semblait avoir un impact différent pour les vaches atteintes d'endométrite clinique ayant un niveau de progestérone inférieur à 1 ng/L à 35 (± 7) et 49 (± 7) JEL. Aucune autre étude ciblant l'efficacité du traitement intra-utérin de céphapirine ne présentait de données d'anovulation prolongée, ce qui rend difficile la comparaison. Il est donc possible que la proportion de vaches anovulatoires ait été plus élevée dans cette étude ce qui expliquerait le plus faible impact du traitement sur les performances en reproduction. Cette hypothèse n'est, par contre, pas soutenue par la prévalence d'anovulation observée

qui n'est que légèrement plus élevée que les études contemporaines (Galvao et coll., 2010b, Dubuc et coll., 2012).

IV. Retour sur le protocole

Plusieurs imprévus ont parsemés les résultats de ce projet de recherche tels que l'impact réduit de l'endométrite sur les performances subséquentes en reproduction comparativement aux études de la littérature, le faible effet positif du traitement sur les performances en reproduction et la modulation d'effet du traitement par l'anovulation prolongée. Dans un effort d'amélioration constante des projets de recherche, quelques points devraient donc être considérés lors d'études futures.

Il a été impossible de recruter un total de 2400 vaches, tel que prévu initialement, durant la durée de cette étude (1 an), car la tâche technique de collecte des données s'est avérée plus difficile que prévue. La tendance observée lors du traitement des vaches atteintes d'endométrite subclinique serait possiblement mieux définie avec une telle taille d'échantillon. Par contre, l'association entre le traitement et les performances en reproduction des vaches atteintes d'endométrite clinique est pratiquement nulle, et même une telle taille d'échantillon n'aurait probablement pas su mettre en évidence un avantage au traitement de ces vaches. Une si petite différence ne vaut d'ailleurs probablement pas la peine d'être mise en évidence en raison de sa faible implication pratique. En tenant compte de la population de cette étude, l'amélioration du succès à la première saillie entre les vaches traitées et contrôle de plus de 11% et de 9% auraient été significative pour les vaches atteintes d'endométrite clinique et subclinique, respectivement (Dohoo et coll., 2009). Comme ces différences ne sont pas observées dans la population à l'étude, il semble que l'efficacité du traitement dans cette étude soit moindre que celle qui a été démontrée dans les études précédentes (LeBlanc et coll., 2002b, Kasimanickam et coll., 2005b, Runciman et coll., 2008).

Une seule autre étude n'ayant pas démontré d'effet positif du traitement chez les vaches atteintes d'endométrite clinique avait tout de même identifié un effet lorsqu'elles

avaient également été atteintes de rétention placentaire ou qu'elle avaient donné naissance à un mort-né (McDougall et coll., 2001). Les données de maladies péri-partum telles la dystocie, les mort-nés, les jumeaux, la rétention placentaire et la métrite auraient pu être des facteurs intéressants à considérer dans les analyses de ce projet. Bien que ces conditions soient parfois enregistrées par les producteurs, il aurait été essentiel de former ces derniers avant le début de l'étude pour uniformiser les définitions et donc les données obtenues, ce qui n'a malheureusement pas été fait dans ce projet. Ces données auraient peut-être pu expliquer certaines variations entre ce projet et les études précédentes.

V. Pistes d'avenir

Malgré une taille d'échantillon insuffisante, les résultats de ce projet ont mis en évidence certaines pistes qui pourront être suivies pour accroître les connaissances sur la surveillance et le traitement de l'endométrite.

Afin de rendre plus accessible le diagnostic d'endométrite subclinique à la ferme, l'amélioration de la sensibilité du test d'estérase leucocytaire serait intéressant. Les performances actuelles de ce test, lorsqu'il est utilisé en parallèle avec le Metricheck, permettent d'offrir une meilleure valeur prédictive du succès à la première saillie. Son utilisation comme test complémentaire serait donc intéressant pour la surveillance. Par contre, l'association entre le traitement de céphapirine intra-utérine et les performances en reproduction des vaches atteintes d'endométrite subclinique diagnostiquée par l'estérase leucocytaire n'est pas aussi importante que lorsque le diagnostic est fait par cytologie. Ainsi, il semblerait, pour l'instant, que cet outil ne serait pas optimal pour informer une décision de traitement.

L'efficacité du traitement intra-utérin de céphapirine dans ce projet a été moindre que prévu ce qui a entraîné l'évaluation de nouveaux aspects pouvant influencer l'effet du traitement. Bien que le design d'étude n'avait pas été planifié pour la stratification des données par statut utérin et statut d'anovulation prolongée, ces analyses ont permis d'identifier une variation de l'impact du traitement lorsque l'endométrite et l'anovulation

étaient considérés ensemble. Il semble donc que cette approche devrait être explorée lors de projets subséquents.

De plus, comme la prévalence d'anovulation est très variable d'un troupeau à l'autre, il serait intéressant d'investiguer l'impact de cette prévalence de troupeau sur l'efficacité du traitement au sein du troupeau. Bien sûr, un design ayant le troupeau comme unité d'étude serait nécessaire pour cette évaluation et pourrait permettre d'atteindre plusieurs autres objectifs en surveillance de la santé utérine. Ces objectifs pourraient être, par exemple, l'identification de facteurs de risque au niveau du troupeau qui sont associés à une forte prévalence d'endométrite et l'identification du seuil de prévalence d'endométrite anormal qui serait associé avec un impact négatif sur les performances en reproduction du troupeau.

Conclusion

L'utilisation du Metrichack pour le diagnostic de l'endométrite clinique et l'utilisation de la cytologie endométriale ainsi que de l'estérase leucocytaire pour le diagnostic de l'endométrite subclinique ont été validés comme outils de surveillance lors de cette étude. L'utilisation de ces tests diagnostiques en série et parallèle n'a pas permis de mieux prédire les performances en reproduction subséquentes.

Ces outils diagnostiques ne se sont, par contre, pas tous révélés aussi utiles pour l'identification des animaux bénéficiant d'un traitement intra-utérin de céphapirine. En effet, seul le diagnostic cytologique d'endométrite subclinique s'est avéré approprié à cette fin. L'anovulation prolongée chez les vaches laitières a semblé moduler l'impact du traitement sur les performances en reproduction à la première saillie. Cette observation est particulièrement importante pour les animaux atteints d'endométrite clinique et d'anovulation prolongée.

Bibliographie

- Abeyawardene, S. A., D. J. Hathorn et R. G. Glencross. 1984. Concentrations of oestradiol-17 beta and progesterone in bovine plasma and defatted milk during the post-partum anovulatory period, during oestrous cycles and following ovariectomy. *Br. Vet. J.* 140(5):458-467.
- Arechiga, C. F., S. Vazquez-Flores, O. Ortiz, J. Hernandez-Ceron, A. Porras, L. R. McDowell et P. J. Hansen. 1998. Effect of injection of beta-carotene or vitamin E and selenium on fertility of lactating dairy cows. *Theriogenology* 50(1):65-76.
- Arlt, S., W. Padberg, M. Drillich et W. Heuwieser. 2009. Efficacy of homeopathic remedies as prophylaxis of bovine endometritis. *J. Dairy Sci.* 92(10):4945-4953.
- Barlund, C. S., T. D. Carruthers, C. L. Waldner et C. W. Palmer. 2008. A comparison of diagnostic techniques for postpartum endometritis in dairy cattle. *Theriogenology* 69(6):714-723.
- Beutler, B. 2004. Innate immunity: an overview. *Molecular immunology* 40(12):845-859.
- Bicalho, M. L., V. S. Machado, G. Oikonomou, R. O. Gilbert et R. C. Bicalho. 2012. Association between virulence factors of *Escherichia coli*, *Fusobacterium necrophorum*, and *Arcanobacterium pyogenes* and uterine diseases of dairy cows. *Vet. Microbiol.* 157(1-2):125-131.
- Bicalho, R. C., T. M. Santos, R. O. Gilbert, L. S. Caixeta, L. M. Teixeira, M. L. Bicalho et V. S. Machado. 2010. Susceptibility of *Escherichia coli* isolated from uteri of postpartum dairy cows to antibiotic and environmental bacteriophages. Part I: Isolation and lytic activity estimation of bacteriophages. *J. Dairy Sci.* 93(1):93-104.
- Bonnett, B. N., R. B. Miller, S. W. Martin, W. G. Etherington et B. C. Buckrell. 1991. Endometrial biopsy in Holstein-Friesian dairy cows. II. Correlations between histological criteria. *Can. J. Vet. Res.* 55(2):162-167.

- Bonnett, B. N., S. Wayne Martin et A. H. Meek. 1993. Associations of clinical findings, bacteriological and histological results of endometrial biopsy with reproductive performance of postpartum dairy cows. *Prev. Vet. Med.* 15(2–3):205-220.
- Bretzlaff, K. 1987. Rationale for treatment of endometritis in the dairy cow. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 3(3):593-607.
- Burke, C. R., S. Meier, S. McDougall, C. Compton, M. Mitchell et J. R. Roche. 2010. Relationships between endometritis and metabolic state during the transition period in pasture-grazed dairy cows. *J. Dairy Sci.* 93(11):5363-5373.
- Burnham, K. P. et D. R. Anderson. 2002. *Model Selection and Multimodel Inference*. 2nd ed ed. Springer New York.
- Cai, T. Q., P. G. Weston, L. A. Lund, B. Brodie, D. J. McKenna et W. C. Wagner. 1994. Association between neutrophil functions and periparturient disorders in cows. *Am. J. Vet. Res.* 55(7):934-943.
- Chapwanya, A., K. G. Meade, M. L. Doherty, J. J. Callanan, J. F. Mee et C. O'Farrelly. 2009. Histopathological and molecular evaluation of Holstein-Friesian cows postpartum: toward an improved understanding of uterine innate immunity. *Theriogenology* 71(9):1396-1407.
- Chapwanya, A., K. G. Meade, F. Narciandi, P. Stanley, J. F. Mee, M. L. Doherty, J. J. Callanan et C. O'Farrelly. 2010. Endometrial biopsy: a valuable clinical and research tool in bovine reproduction. *Theriogenology* 73(7):988-994.
- Cheong, S. H., D. V. Nydam, K. N. Galvao, B. M. Crosier et R. O. Gilbert. 2011. Cow-level and herd-level risk factors for subclinical endometritis in lactating Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 94(2):762-770.
- Cheong, S. H., D. V. Nydam, K. N. Galvao, B. M. Crosier, A. Ricci, L. S. Caixeta, R. B. Sper, M. Fraga et R. O. Gilbert. 2012. Use of reagent test strips for diagnosis of endometritis in dairy cows. *Theriogenology* 77(5):858-864.
- Couto, G. B., D. H. Vaillancourt et 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.

- Davies, D., K. G. Meade, S. Herath, P. D. Eckersall, D. Gonzalez, J. O. White, R. S. Conlan, C. O'Farrelly et I. M. Sheldon. 2008. Toll-like receptor and antimicrobial peptide expression in the bovine endometrium. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 6:53.
- Deguillaume, L., A. Geffré, L. Desquilbet, A. Dizien, S. Thoumire, C. Vornière, F. Constant, R. Fournier et S. Chastant-Maillard. 2012. Effect of endocervical inflammation on days to conception in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 95(4):1776-1783.
- Denis-Robichaud, J. et J. Dubuc. 2013. Article 1: Definition and diagnosis of clinical and subclinical endometritis in dairy cows and their impact on reproductive performance. Université de Montréal.
- Dinsmore, R. P., R. D. Stevens, M. B. Cattell, M. D. Salman et S. F. Sundlof. 1996. Oxytetracycline residues in milk after intrauterine treatment of cows with retained fetal membranes. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 209(10):1753-1755.
- Dohoo, I. R., S. W. Martin et H. Stryhn. 2009. *Veterinary epidemiologic research*. 2nd ed. VER, Inc., Charlottetown, P.E.I.
- Drillich, M., D. Raab, M. Wittke et W. Heuwieser. 2005. Treatment of chronic endometritis in dairy cows with an intrauterine application of enzymes. A field trial. *Theriogenology* 63(7):1811-1823.
- Dubuc, J. 2012. Diagnostic, traitements et impacts des maladies utérines post-partum chez les vaches laitières. in *Proc. Congr. Odr. Méd. Vét. Qc., Saint-Hyacinthe, Canada*.
- Dubuc, J., T. F. Duffield, K. E. Leslie, J. S. Walton et S. J. LeBlanc. 2010a. Definitions and diagnosis of postpartum endometritis in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 93(11):5225-5233.
- Dubuc, J., T. F. Duffield, K. E. Leslie, J. S. Walton et S. J. LeBlanc. 2010b. Risk factors for postpartum uterine diseases in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 93(12):5764-5771.
- Dubuc, J., T. F. Duffield, K. E. Leslie, J. S. Walton et S. J. Leblanc. 2011. Randomized clinical trial of antibiotic and prostaglandin treatments for uterine health and reproductive performance in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 94(3):1325-1338.
- Dubuc, J., T. F. Duffield, K. E. Leslie, J. S. Walton et S. J. LeBlanc. 2012. Risk factors and effects of postpartum anovulation in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 95(4):1845-1854.

- Elliott, L., K. J. McMahon, H. T. Gier et G. B. Marion. 1968. Uterus of the cow after parturition: bacterial content. *Am. J. Vet. Res.* 29(1):77-81.
- Faraggi, D. et B. Reiser. 2002. Estimation of the area under the ROC curve. *Stat. Med.* 21(20):3093-3106.
- Fisher, R. A. 1925. *Statistical Methods For Research Workers*. Cosmo Publications.
- Foldi, J., M. Kulcsar, A. Pecsí, B. Huyghe, C. de Sa, J. A. Lohuis, P. Cox et G. Huszenicza. 2006. Bacterial complications of postpartum uterine involution in cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 96(3-4):265-281.
- Fonseca, F. A., J. H. Britt, B. T. McDaniel, J. C. Wilk et A. H. Rakes. 1983. Reproductive traits of Holsteins and Jerseys. Effects of age, milk yield, and clinical abnormalities on involution of cervix and uterus, ovulation, estrous cycles, detection of estrus, conception rate, and days open. *J. Dairy Sci.* 66(5):1128-1147.
- Fourichon, C., H. Seegers et X. Malher. 2000. Effect of disease on reproduction in the dairy cow: a meta-analysis. *Theriogenology* 53(9):1729-1759.
- Galvao, K. N., M. J. Flaminio, S. B. Brittin, R. Sper, M. Fraga, L. Caixeta, A. Ricci, C. L. Guard, W. R. Butler et R. O. Gilbert. 2010a. Association between uterine disease and indicators of neutrophil and systemic energy status in lactating Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 93(7):2926-2937.
- Galvao, K. N., M. Frajblat, S. B. Brittin, W. R. Butler, C. L. Guard et R. O. Gilbert. 2009a. Effect of prostaglandin F2alpha on subclinical endometritis and fertility in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 92(10):4906-4913.
- Galvao, K. N., M. Frajblat, W. R. Butler, S. B. Brittin, C. L. Guard et R. O. Gilbert. 2010b. Effect of early postpartum ovulation on fertility in dairy cows. *Reprod. Domest. Anim.* 45(5):e207-211.
- Galvao, K. N., L. F. Greco, J. M. Vilela, M. F. Sa Filho et J. E. Santos. 2009b. Effect of intrauterine infusion of ceftiofur on uterine health and fertility in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 92(4):1532-1542.

- Galvao, K. N., N. R. Santos, J. S. Galvao et R. O. Gilbert. 2011. Association between endometritis and endometrial cytokine expression in postpartum Holstein cows. *Theriogenology* 76(2):290-299.
- Gautam, G., T. Nakao, K. Yamada et C. Yoshida. 2010. Defining delayed resumption of ovarian activity postpartum and its impact on subsequent reproductive performance in Holstein cows. *Theriogenology* 73(2):180-189.
- Ghasemi, F. 2011. Characterization of endometritis in postpartum dairy cows. Page 90 in Department of Large Animal Clinical sciences. Vol. Master of Science. University of Saskatchewan, Saskatoon, Saskatchewan.
- Gier, H. T. et G. B. Marion. 1968. Uterus of the cow after parturition: involutinal changes. *Am. J. Vet. Res.* 29(1):83-96.
- Gilbert, R. O., S. T. Shin, C. L. Guard et H. N. Erb. 1998. Incidence of endometritis and effects on reproductive performance of dairy cows. *Theriogenology* 49(1):251.
- Gilbert, R. O., S. T. Shin, C. L. Guard, H. N. Erb et M. Frajblat. 2005. Prevalence of endometritis and its effects on reproductive performance of dairy cows. *Theriogenology* 64(9):1879-1888.
- Glanvill, S. F. et H. Dobson. 1991. Effect of prostaglandin treatment on the fertility of problem cows. *Vet. Rec.* 128(16):374-376.
- Goff, J. P. et R. L. Horst. 1997. Physiological changes at parturition and their relationship to metabolic disorders. *J. Dairy Sci.* 80(7):1260-1268.
- Griffin, J. F., P. J. Hartigan et W. R. Nunn. 1974. Non-specific uterine infection and bovine fertility. I. Infection patterns and endometritis during the first seven weeks postpartum. *Theriogenology* 1(3):91-106.
- Grummer, R. R., D. G. Mashek et A. Hayirli. 2004. Dry matter intake and energy balance in the transition period. *Vet. Clin. North Am. Food An. Pract.* 20(3):447-470.
- Hammon, D. S., I. M. Evjen, T. R. Dhiman, J. P. Goff et J. L. Walters. 2006. Neutrophil function and energy status in Holstein cows with uterine health disorders. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 113(1-2):21-29.

- Herath, S., D. P. Fischer, D. Werling, E. J. Williams, S. T. Lilly, H. Dobson, C. E. Bryant et I. M. Sheldon. 2006. Expression and function of Toll-like receptor 4 in the endometrial cells of the uterus. *Endocrinol.* 147(1):562-570.
- Herdt, T. H., J. B. Stevens, J. Linn et V. Larson. 1981. Influence of ration composition and energy balance on blood beta-hydroxybutyrate (ketone) and plasma glucose concentrations of dairy cows in early lactation. *Am. J. Vet. Res.* 42(7):1177-1180.
- Herdt, T. H. et H. D. Stowe. 1991. Fat-soluble vitamin nutrition for dairy cattle. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 7(2):391-415.
- Hirsbrunner, G., C. Kaufmann, C. Keller, J. Husler et A. Steiner. 2010. Spontaneous myometrial contractility in cows suffering from endometritis-Influence of localisation, smooth muscle layer and cycle phase. An in vitro study. *Anim. Repro. Sci.* 118(2-4):124-130.
- Hirsbrunner, G., U. Kupfer, H. Burkhardt et A. Steiner. 1998. Effect of different prostaglandins on intrauterine pressure and uterine motility during diestrus in experimental cows. *Theriogenology* 50(3):445-455.
- Hoeben, D., R. Heyneman et C. Burvenich. 1997. Elevated levels of beta-hydroxybutyric acid in periparturient cows and in vitro effect on respiratory burst activity of bovine neutrophils. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 58(2):165-170.
- Hussain, A. M., R. C. Daniel et D. O'Boyle. 1990. Postpartum uterine flora following normal and abnormal puerperium in cows. *Theriogenology* 34(2):291-302.
- Huszenicza, G., M. Fodor, M. Gacs, M. Kulcsar, M. J. W. Dohmen, M. Vamos, L. Porkolab, T. Kegl, J. Bartyik, J. Lohuis, S. Janosi et G. Szita. 1999. Uterine Bacteriology, Resumption of Cyclic Ovarian Activity and Fertility in Postpartum Cows kept in Large-Scale Dairy Herds. *Reprod. Domest. Anim.* 34(3-4):237-245.
- Kasimanickam, R., T. F. Duffield, R. A. Foster, C. J. Gartley, K. E. Leslie, J. S. Walton et W. H. Johnson. 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, C. J. Gartley, K. E. Leslie, J. S. Walton et W. H. Johnson. 2005a. A comparison of the cytobrush and uterine lavage techniques to

- evaluate endometrial cytology in clinically normal postpartum dairy cows. *Can. Vet. J.* 46(3):255-259.
- Kasimanickam, R., T. F. Duffield, R. A. Foster, C. J. Gartley, K. E. Leslie, J. S. Walton et W. H. Johnson. 2005b. The effect of a single administration of cephalixin or cloprostenol on the reproductive performance of dairy cows with subclinical endometritis. *Theriogenology* 63(3):818-830.
- Kaufmann, T. B., S. Westermann, M. Drillich, J. Plontzke et W. Heuwieser. 2010. Systemic antibiotic treatment of clinical endometritis in dairy cows with ceftiofur or two doses of cloprostenol in a 14-d interval. *Anim. Reprod. Sci.* 121(1-2):55-62.
- Kelton, D. F., K. D. Lissemore et R. E. Martin. 1998. Recommendations for recording and calculating the incidence of selected clinical diseases of dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 81(9):2502-2509.
- Kim, I. H., K. J. Na et M. P. Yang. 2005. Immune responses during the peripartum period in dairy cows with postpartum endometritis. *J. Reprod. Dev.* 51(6):757-764.
- Kimura, K., J. P. Goff, M. E. Kehrl, Jr. et T. A. Reinhardt. 2002. Decreased neutrophil function as a cause of retained placenta in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 85(3):544-550.
- Lamote, I., E. Meyer, L. Duchateau et C. Burvenich. 2004. Influence of 17beta-estradiol, progesterone, and dexamethasone on diapedesis and viability of bovine blood polymorphonuclear leukocytes. *J. Dairy Sci.* 87(10):3340-3349.
- Larson, L. L. et P. J. Ball. 1992. Regulation of estrous cycles in dairy cattle: A review. *Theriogenology* 38(2):255-267.
- LeBlanc, S. 2005. Overall reproductive performance of Canadian dairy cows: Challenges we are facing. *Adv. Dairy Technol.* 17:137-157.
- LeBlanc, S. 2007. Economics of Improving Reproductive Performance in Dairy Herds. Pages 201-214 in *Proc. West. Can. Dairy Sem. Adv. Dairy Technol.*, Edmonton, Canada.
- LeBlanc, S. J. 2008. Postpartum uterine disease and dairy herd reproductive performance: a review. *Vet. J.* 176(1):102-114.

- LeBlanc, S. J., T. F. Duffield, K. E. Leslie, K. G. Bateman, G. P. Keefe, J. S. Walton et W. H. Johnson. 2002a. Defining and diagnosing postpartum clinical endometritis and its impact on reproductive performance in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 85(9):2223-2236.
- LeBlanc, S. J., T. F. Duffield, K. E. Leslie, K. G. Bateman, G. P. Keefe, J. S. Walton et W. H. Johnson. 2002b. The effect of treatment of clinical endometritis on reproductive performance in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 85(9):2237-2249.
- LeBlanc, S. J., T. F. Duffield, K. E. Leslie, K. G. Bateman, J. TenHag, J. S. Walton et W. H. Johnson. 2002c. The effect of prepartum injection of vitamin E on health in transition dairy cows. *J. Dairy Sci.* 85(6):1416-1426.
- LeBlanc, S. J., T. Osawa et J. Dubuc. 2011. Reproductive tract defense and disease in postpartum dairy cows. *Theriogenology* 76(9):1610-1618.
- Lefebvre, R. C. et A. E. Stock. 2012. Therapeutic Efficiency of Antibiotics and Prostaglandin F₂ α in Postpartum Dairy Cows with Clinical Endometritis: An Evidence-Based Evaluation. *Vet. Clin. North Am. Food An. Pract.* 28(1):79-96.
- Lewis, G. S. 1997. Uterine health and disorders. *J. Dairy Sci.* 80(5):984-994.
- Lewis, G. S. 2004. Steroidal regulation of uterine immune defenses. *Anim. Reprod. Sci.* 82-83:281-294.
- Machado, V. S., M. L. Bicalho, R. V. Pereira, L. S. Caixeta, J. H. Bittar, G. Oikonomou, R. O. Gilbert et R. C. Bicalho. 2012. The effect of intrauterine administration of mannose or bacteriophage on uterine health and fertility of dairy cows with special focus on *Escherichia coli* and *Arcanobacterium pyogenes*. *J. Dairy Sci.* 95(6):3100-3109.
- Macmillan, K. L. et A. M. Day. 1982. Prostaglandin F₂ α - A fertility drug in dairy cattle? *Theriogenology* 18(3):245-253.
- Maldonado, G. et S. Greenland. 1993. Simulation study of confounder-selection strategies. *Am. J. Epidemiol.* 138(11):923-936.
- Martin, J. L., K. A. Vonnahme, D. C. Adams, G. P. Lardy et R. N. Funston. 2007. Effects of dam nutrition on growth and reproductive performance of heifer calves. *J. Anim. Sci.* 85(3):841-847.

- Masera, J., B. K. Gustafsson, M. M. Afiefy, C. M. Stowe et G. P. Bergt. 1980. Disposition of oxytetracycline in the bovine genital tract: systemic vs intrauterine administration. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 176(10 Spec No):1099-1102.
- McDougall, S. 2001. Effect of intrauterine antibiotic treatment on reproductive performance of dairy cows following periparturient disease. *New Zel. Vet. J.* 49(4):150-158.
- McDougall, S., M. de Boer, C. Compton et S. J. Leblanc. 2013. Clinical trial of treatment programs for purulent vaginal discharge in lactating dairy cattle in New Zealand. *Theriogenology* 79(8):1139-1145.
- McDougall, S., H. Hussein, D. Aberdein, K. Buckle, J. Roche, C. Burke, M. Mitchell et S. Meier. 2011. Relationships between cytology, bacteriology and vaginal discharge scores and reproductive performance in dairy cattle. *Theriogenology* 76(2):229-240.
- McDougall, S., R. Macaulay et C. Compton. 2007. Association between endometritis diagnosis using a novel intravaginal device and reproductive performance in dairy cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 99(1-2):9-23.
- Meira, E. B., Jr., L. C. Henriques, L. R. Sa et L. Gregory. 2012. Comparison of ultrasonography and histopathology for the diagnosis of endometritis in Holstein-Friesian cows. *J. Dairy Sci.* 95(12):6969-6973.
- Miller, H. V., P. B. Kimsey, J. W. Kendrick, B. Darien et L. Doering. 1980. Endometritis of dairy cattle: diagnosis, treatment, and fertility. *Bov. Pract.* (15):13-23.
- Moeini, M. M., H. Karami et E. Mikaeili. 2009. Effect of selenium and vitamin E supplementation during the late pregnancy on reproductive indices and milk production in heifers. *Anim. Reprod. Sci.* 114(1-3):109-114.
- Murray, R. D., J. D. Allison et R. P. Gard. 1990. Bovine endometritis: comparative efficacy of alfaprostol and intrauterine therapies, and other factors influencing clinical success. *Vet. Rec.* 127(4):86-90.
- Nakao, T., M. Moriyoshi et K. Kawata. 1988. Effect of postpartum intrauterine treatment with 2% polyvinyl-pyrrolidone-iodine solution on reproductive efficiency in cows. *Theriogenology* 30(6):1033-1043.

- Nikolakopoulos, E. et E. D. Watson. 1999. Uterine contractility is necessary for the clearance of intrauterine fluid but not bacteria after bacterial infusion in the mare. *Theriogenology* 52(3):413-423.
- Noakes, D. E., L. Wallace et G. R. Smith. 1991. Bacterial flora of the uterus of cows after calving on two hygienically contrasting farms. *Vet. Rec.* 128(19):440-442.
- Olson, J. D., L. Ball, R. G. Mortimer, P. W. Farin, W. S. Adney et E. M. Huffman. 1984. Aspects of bacteriology and endocrinology of cows with pyometra and retained fetal membranes. *Am. J. Vet. Res.* 45(11):2251-2255.
- Oltenacu, P. A., J. H. Britt, R. K. Braun et R. W. Mellenberger. 1983. Relationships among type of parturition, type of discharge from genital tract, involution of cervix, and subsequent reproductive performance in Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 66(3):612-619.
- Osawa, T., R. C. Neves et S. LeBlanc. 2011. Inflammation and infection of the reproductive tract in dairy cows. Page 746 in *Proc. Joint Annual Meeting. J. Dairy Sci.*, New Orleans, US.
- Rajala-Schultz, P. J., A. H. Torres, F. J. DeGraves, W. A. Gebreyes, and P. Patchanee. 2009. Antimicrobial resistance and genotypic characterization of coagulase-negative staphylococci over the dry period. *Vet. Microbiol.* 134(1-2):55-64.
- Ramadan, A. A., G. L. Johnson, 3rd et G. S. Lewis. 1997. Regulation of uterine immune function during the estrous cycle and in response to infectious bacteria in sheep. *J. Anim. Sci.* 75(6):1621-1632.
- Rowson, L. E., G. E. Lamming et R. M. Fry. 1953. Influence of ovarian hormones on uterine infection. *Nature* 171(4356):749-750.
- Runciman, D. J., G. A. Anderson et J. Malmo. 2009. Comparison of two methods of detecting purulent vaginal discharge in postpartum dairy cows and effect of intrauterine cephalosporin on reproductive performance. *Aust. Vet. J.* 87(9):369-378.
- Runciman, D. J., G. A. Anderson, J. Malmo et G. M. Davis. 2008. Effect of intrauterine treatment with cephalosporin on the reproductive performance of seasonally calving dairy cows at risk of endometritis following periparturient disease. *Aust. Vet. J.* 86(7):250-258.

- Santos, T. M., L. S. Caixeta, V. S. Machado, A. K. Rauf, R. O. Gilbert et R. C. Bicalho. 2010. Antimicrobial resistance and presence of virulence factor genes in *Arcanobacterium pyogenes* isolated from the uterus of postpartum dairy cows. *Vet.; Microbiol.* 145(1-2):84-89.
- Santos, T. M., R. O. Gilbert et R. C. Bicalho. 2011. Metagenomic analysis of the uterine bacterial microbiota in healthy and metritic postpartum dairy cows. *J. Dairy Sci.* 94(1):291-302.
- Scalia, D., N. Lacetera, U. Bernabucci, K. Demeyere, L. Duchateau et C. Burvenich. 2006. In vitro effects of nonesterified fatty acids on bovine neutrophils oxidative burst and viability. *J. Dairy Sci.* 89(1):147-154.
- Sheldon, I. M., J. Cronin, L. Goetze, G. Donofrio et H. J. Schuberth. 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. et H. Dobson. 2004. Postpartum uterine health in cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 82-83:295-306.
- Sheldon, I. M., G. S. Lewis, S. LeBlanc et R. O. Gilbert. 2006. Defining postpartum uterine disease in cattle. *Theriogenology* 65(8):1516-1530.
- Sheldon, I. M. et D. E. Noakes. 1998. Comparison of three treatments for bovine endometritis. *Vet. Rec.* 142(21):575-579.
- Sheldon, I. M., D. E. Noakes, A. Rycroft et H. Dobson. 2001. Acute phase protein responses to uterine bacterial contamination in cattle after calving. *Vet. Rec.* 148(6):172-175.
- Sheldon, I. M., D. E. Noakes, A. N. Rycroft et H. Dobson. 2002a. Effect of postpartum manual examination of the vagina on uterine bacterial contamination in cows. *Vet. Rec.* 151(18):531-534.
- Sheldon, I. M., D. E. Noakes, A. N. Rycroft, D. U. Pfeiffer et H. Dobson. 2002b. Influence of uterine bacterial contamination after parturition on ovarian dominant follicle selection and follicle growth and function in cattle. *Reprod.* 123(6):837-845.
- Sheldon, I. M., A. N. Rycroft, B. Dogan, M. Craven, J. J. Bromfield, A. Chandler, M. H. Roberts, S. B. Price, R. O. Gilbert et K. W. Simpson. 2010. Specific strains of *Escherichia coli* are

- pathogenic for the endometrium of cattle and cause pelvic inflammatory disease in cattle and mice. *PloS One* 5(2):e9192.
- Silva, E., M. Gaivao, S. Leitao, B. H. Jost, C. Carneiro, C. L. Vilela, L. Lopes da Costa et L. Mateus. 2008. Genomic characterization of *Arcanobacterium pyogenes* isolates recovered from the uterus of dairy cows with normal puerperium or clinical metritis. *Vet. Microbiol.* 132(1-2):111-118.
- Spears, J. W. et W. P. Weiss. 2008. Role of antioxidants and trace elements in health and immunity of transition dairy cows. *Vet. J.* 176(1):70-76.
- Subandrio, A. L., I. M. Sheldon et D. E. Noakes. 2000. Peripheral and intrauterine neutrophil function in the cow: the influence of endogenous and exogenous sex steroid hormones. *Theriogenology* 53(8):1591-1608.
- Tan, X., Y. J. Huang, Y. W. Jiang et S. H. Hu. 2007. Persistence of oxytetracycline residues in milk after the intrauterine treatment of lactating cows for endometritis. *Vet. Rec.* 161(17):585-586.
- Thurmond, M. C., C. M. Jameson et J. P. Picanso. 1993. Effect of intrauterine antimicrobial treatment in reducing calving-to-conception interval in cows with endometritis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 203(11):1576-1578.
- Walsh, R. B., D. F. Kelton, T. F. Duffield, K. E. Leslie, J. S. Walton et S. J. LeBlanc. 2007. Prevalence and risk factors for postpartum anovulatory condition in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90(1):315-324.
- Wathes, D. C., M. Fenwick, Z. Cheng, N. Bourne, S. Llewellyn, D. G. Morris, D. Kenny, J. Murphy et R. Fitzpatrick. 2007. Influence of negative energy balance on cyclicity and fertility in the high producing dairy cow. *Theriogenology* 68 Suppl 1:S232-241.
- Wenkoff, M. S. 1978. Therapeutic evaluation of the use of prostaglandin analog ICI80996 in cattle. *Can. Vet. J.* 19(10):277-278.
- Werner, A., V. Suthar, J. Plontzke et W. Heuwieser. 2012. Relationship between bacteriological findings in the second and fourth weeks postpartum and uterine infection in dairy cows considering bacteriological results. *J. Dairy Sci.* 95(12):7105-7114.

- Williams, E. J., D. P. Fischer, D. U. Pfeiffer, G. C. England, D. E. Noakes, H. Dobson et I. M. Sheldon. 2005. Clinical evaluation of postpartum vaginal mucus reflects uterine bacterial infection and the immune response in cattle. *Theriogenology* 63(1):102-117.
- Wulster-Radcliffe, M. C., R. C. Seals et G. S. Lewis. 2003. Progesterone increases susceptibility of gilts to uterine infections after intrauterine inoculation with infectious bacteria. *J. Anim. Sci.* 81(5):1242-1252.
- Zerbe, H., H. J. Schuberth, F. Engelke, J. Frank, E. Klug et W. Leibold. 2003. Development and comparison of in vivo and in vitro models for endometritis in cows and mares. *Theriogenology* 60(2):209-223.