

Université de Montréal

**Évaluation de l'endométrite clinique chez la vache laitière  
et efficacité d'un traitement de céfapirine sous forme d'une  
infusion intra-utérine.**

par

Nicolas Tison

Département de Sciences cliniques

Faculté de médecine vétérinaire

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

en sciences vétérinaires

Sciences cliniques

Décembre 2014

© Nicolas Tison, 2014

## Résumé

Cette étude valide l'efficacité du traitement de céfapirine intra-utérin sur les vaches diagnostiquées comme positives à l'endométrite clinique (PVD+) par vaginoscopie.

Un seuil diagnostique des PVD+ a, d'abord, été déterminé selon les effets néfastes significatifs des écoulements vaginaux sur le statut de gestation à 120 jours post-partum. Les observations de 1247 vaches de 18 troupeaux, faites à  $34 \pm 7$  jours post-partum, ont mené à considérer la présence de mucus vaginal trouble avec ou sans flocons de pus comme seuil pour les PVD+. La prévalence de PVD+ était de 21.6%. La chance d'être gestante à la première insémination effectuée à temps fixe sur un protocole de synchronisation était 1.89 fois moindre chez les vaches PVD+.

Le traitement de céfapirine a été administré aléatoirement lors de la première visite. Même en absence d'effets significatifs sur la guérison clinique évaluée après 2 semaines, le traitement améliore significativement les performances en reproduction des PVD+. Les PVD+ ayant reçu le traitement avaient 1.85 fois plus de chance d'être gestantes à la première insémination que les PVD+ du groupe contrôle. Elles présentaient aussi une amélioration du jour ouvert médian de 38 jours.

**Mots-clés** : céfapirine, endométrite, gestation, vaginoscopie, écoulements vaginaux, vache laitière, mucus trouble.

## **Abstract**

This study validates the benefits of intra-uterine cephalosporin treatment on cows diagnosed with clinical endometritis (PVD+) by vaginoscopy.

The diagnostic threshold of PVD+ was determined using the negative impact on the reproductive status at 120 days postpartum for each class of vaginal discharge. Observations of 1247 cows of 18 herds examined at  $34 \pm 7$  days postpartum led to the positive threshold of PVD+ being cloudy vaginal discharge with or without flecks of pus. The prevalence of PVD+ was 21.6%. The risk of pregnancy at fixed time first insemination after a reproductive program was 1.89 times less for PVD+ cows.

Cephalosporin treatment was randomly administered during the first visit. It improved significantly the reproductive performances of PVD+ cows even without significant clinical cure after two weeks. Treated PVD+ cows had 1.85 times more chances of getting pregnant on 1st insemination compared to PVD+ control cows. They also presented a median time to pregnancy improved by 38 days.

**Keywords** : dairy cows, endometritis, vaginal discharge, cephalosporin, vaginoscopy, cloudy.

# Table des matières

Résumé .....	i
Abstract.....	ii
Table des matières.....	iii
Liste des tableaux.....	v
Liste des figures .....	vi
Liste des sigles et des abréviations .....	viii
Remerciements.....	x
Introduction.....	1
Revue de littérature .....	3
1 Définition d'endométrite clinique / écoulements vaginaux purulents.....	3
2 Changements utérins en période post-partum.....	5
2.1 Involution structurelle/tissulaire/vasculaire .....	5
2.1.1 Vulve, vestibule, vagin.....	5
2.1.2 Col de l'utérus .....	6
2.1.3 Corps utérin et cornes utérines .....	8
2.2 Contenu utérin .....	10
2.2.1 Lochies (débris-liquide) .....	10
2.2.2 Contamination et élimination des bactéries de l'utérus en post-partum .....	10
2.2.3 Virus.....	12
2.3 Activité ovarienne chez la vache laitière en post-partum et l'involution utérine.....	13
3 Réponse immunitaire utérine en post-partum.....	14
3.1 Immunité et gestation.....	14
3.2 Les Polymorphonucléaires neutrophiles en période post-partum .....	15
3.3 Fonctionnement des polymorphonucléaires neutrophiles.....	16
3.4 Dysfonctionnement des polymorphonucléaires neutrophiles .....	17
3.5 Immunité complémentaire aux polymorphonucléaires neutrophiles.....	17
4 Outils diagnostiques des inflammations du tractus génital.....	18
4.1 Biopsie .....	18

4.2	Cytologie.....	20
4.3	Vaginoscopie, Metrichek <sup>®</sup> et palpation vaginale.....	22
4.4	Échographie.....	24
4.5	Palpation transrectale.....	25
4.6	Bactériologie.....	26
5	Facteurs de risque de l'endométrite clinique.....	27
6	Traitements des endométrites et leur efficacité.....	28
6.1	Traitements homologués.....	30
6.1.1	Céfapirine.....	30
6.1.2	Prostaglandines F2 $\alpha$ .....	32
6.2	Traitement alternatif de l'endométrite clinique.....	33
7	Essai clinique pour évaluer l'efficacité du traitement de céfapirine intra-utérin sur l'endométrite clinique : Rigueur du protocole expérimental.....	35
8	Problématique.....	40
9	Hypothèse.....	40
10	Objectifs :.....	40
	Article 1.....	42
11	Discussion générale.....	93
	Conclusion.....	98
	Bibliographie.....	99

## Liste des tableaux

<b>Table 1</b> Prevalence of the different types of vaginal discharge at 34 DIM (EXAM1) in 992 cows and at 48 DIM (EXAM2) in 978 cows enrolled in the clinical trial. ....	77
<b>Table 2</b> Sensitivity and specificity for the threshold at each mucus grade from the vaginoscopy exam based on pregnancy rate at 120 DIM in CONT cows. The threshold for PVD at 34 and 48 DIM was cloudy mucus with or without flecks of pus. ....	78
<b>Table 3</b> Number and percentage of isolates of pure culture (n = 287) from uterine samples taken from a subset of cows at EXAM1 (n = 527). ....	79
<b>Table 4</b> Results for pure and mixed cultures. 165 cows had cultures with no growth, 356 cows (186 CEPH and 170 CONT) had positive cultures. A total of 447 cultures were positive for bacteria. ....	80
<b>Table 5</b> The effect of treatment, adjusted for season and parity, for PVD+/PVD+ cows on time to pregnancy up to 300 DIM.....	81

## Liste des figures

**Figure 1** Figure 1: Synchronization protocol. Timeline for treatment of PVD cows, monitoring of cure and evaluation of uterine health. At EXAM1, cows were randomly assigned to receive either cephalirin or no treatment. PVD+ cows were defined based on the highest sum of sensitivity and specificity on pregnancy status at 120 DIM. ....85

**Figure 2** Survival curves for time to pregnancy up to 300 days after parturition in 477 cows based on uterine status at 34 DIM (EXAM1): CONT PVD-cows (n = 374) ( — ) and CONT PVD+ cows (n = 103) ( ●●● ). The median time to pregnancy (95% CI) was 118 (107 to 128) and 158 (130 to 204) for CONT PVD- and CONT PVD+ cows, respectively. ...86

**Figure 3** Survival curves for time to pregnancy up to 300 days after parturition in 468 cows based on uterine status at 48 DIM (EXAM2): CONT PVD- cows (n = 394) ( — ) and CONT PVD+ cows (n = 74) ( ●●● ). Median time to pregnancy (95% CI) was 118 (107 to 129) and 181 (145 to 218) for CONT PVD- and CONT PVD+ cows, respectively. ....87

**Figure 4** The cumulative proportion of cows not pregnant after diagnosis of PVD at EXAM1 and treatment with intrauterine cephalirin. The group PVD+CONT ( ●●● ) was significantly different from the other groups (PVD+CEPH: ▲▲▲ , p = 0.02; PVD-CONT: — , p < 0.01; PVD-CEPH: - - - - , p < 0.01). The treatment improved median time to pregnancy of PVD+ cows at 34 DIM (PVD+CONT: 158 days (95% CI: 130-203) and PVD+CEPH: 120 days (95% CI: 94-132)). ....88

**Figure 5** The cumulative proportion of cows not pregnant after diagnosis of PVD at EXAM2 and treatment with intrauterine cephalirin. The group PVD+CONT ( ●●● ) is significantly different from the other groups (PVD+CEPH: ▲▲▲ , p = 0.02; PVD-CONT: — , p < 0.05; PVD-CEPH: - - - - , p = 0.01) The treatment improved median time to pregnancy for PVD+ cows at 48 DIM (PVD+CONT: 181 days (95% CI: 145-219) and PVD+CEPH: 116 days (95% CI: 98-132)). ....89

**Figure 6** Survival curves for time to pregnancy up to 300 days after parturition in 468 cows based on uterine status at 34 DIM and 49 DIM (EXAM1/EXAM2): CONT PVD-/PVD- cows (n = 331) ( — ), CONT PVD-/PVD+ cows (n = 36) ( - - - - ), CONT PVD+/PVD- (n = 63) ( ▲▲▲ ) and CONT PVD+/PVD+ (n = 38) ( ●●● ). Median time to pregnancy

(95% CI) for these four groups was: 116 (97 to 127), 137 (108 to 197), 130 (105 to 184) and 217 (159 to 243), respectively. There was a significant difference between PVD+/PVD+ and the other groups (see in the Results). .....90

**Figure 7** The cumulative proportion of cows not pregnant after diagnosis of PVD at the EXAM1 and EXAM2 and treatment with intrauterine Cephapirin. CONT PVD+/PVD+ ( ●—●—● ) (n = 38) is significantly different from CEPH PVD+/PVD+ ( - - - - - ) (n = 36). CONT PVD-/PVD-( ——— ) is only on the graph as a visual reference. The treatment administered at 34 DIM to cows PVD+ improved median time to pregnancy of the cows that were PVD+ again at 48 DIM (CEPH PVD+/PVD+: 132 days (95% CI: 110-176) and CONT PVD+/PVD+: 214 days (95% CI: 156-243)). .....91

**Figure 8** Different vaginal discharges: 3=mucopurulent ; 2=cloudy mucus; 1=clear mucus; U= Urine;.....92



## Liste des sigles et des abréviations

CEPH : groupe avec un traitement intra-utérin de céfapirine

CI : Confidence interval

CL : corps lutéal

CLD34 : corps luteal lors du premier examen (34 jours en lait en moyenne)

CLD48 : corps lutéal lors du deuxième examen (48 jours en lait en moyenne)

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

CONT : groupe témoin

CR : Conception Rate

DIM : Days in milk

EXAM1 : first exam (34ème jour PP en moyenne)

EXAM2 : second exam (48ème jour PP en moyenne)

FSCR : First service conception rate

LACT : parité

LPS : lypopolysaccharide

OR : Odds ratio

PGF : prostaglandine F2 $\alpha$

PMN : leucocytes polymorphonucléaires neutrophiles

PP : Postpartum

PVD : purulent vaginal discharge

SEAS : season – saison

TLR : toll like receptor

*À Ludivine, mon amour ...*

## Remerciements

Je remercie les personnes qui m'ont aidé dans la phase de récolte de données sur les fermes et au laboratoire. Ça a été un plaisir de travailler avec vous : Faly Ramanantoanina, Jean-Philippe Lequin, Mélissa Blackburn, Jean-Philippe Pelletier, Stéphanie Gayraud, Elsa Puech, Anna Maria Martinez, Daniel Mongollon, Mohamed Rhouma, Josée Guillemette, Saray Rangel, Marie-Michele Gagnon, Jessy Lapierre et Joanie Pilon.

Je remercie aussi pour leur aide et leurs conseils avisés : Dr Jérôme Carrier, Dr Guy Beauchamp, Dre Angélika Stock, Dr Émile Bouchard et Dre Christiane Girard.

Je remercie tout particulièrement Dr Réjean Lefebvre, sans qui ce projet n'aurait pas abouti. En pensant aux remerciements, des souvenirs sont revenus, des bons et des moins bons. Dr Lefebvre, vous m'avez permis de garder espoir dans les moments difficiles. Avec cette maîtrise, je me suis enrichi de cette rencontre avec vous qui savez rendre le travail très agréable de par votre ouverture d'esprit et votre optimisme. Vous côtoyer encore aujourd'hui, est pour moi un grand plaisir et un grand honneur car vous êtes quelqu'un de vrai et sincère. J'ai beaucoup apprécié nos discussions sur de potentiels projets de recherche et ça m'a réconcilié avec la Recherche. Vos commentaires et vos avis sont stimulants et enrichissants et je ne vous remercierai jamais assez pour votre soutien, votre considération et surtout pour m'avoir aidé à garder la tête hors de l'eau à plusieurs reprises.

Ludivine, tu n'as pas été épargné par tout ce stress, mais ton caractère de battante a permis à notre navire de ne pas sombrer. J'ai la chance de vivre à tes côtés depuis 10 ans.

# Introduction

La reproduction de la vache laitière est la plaque angulaire de la productivité de l'industrie laitière. Un bon succès à la reproduction durant la période d'éligibilité de la vache assure un intervalle entre les vêlages optimal pour la productivité. Après avoir atteint un pic de production de lait vers la septième semaine postpartum (PP), la production de lait de la vache décroît progressivement. Ceci explique donc pourquoi il est important économiquement que la vache ait le plus petit intervalle entre les vêlages possible. Si la gestion de la reproduction se porte bien, l'économie de la ferme se portera également bien (Overton *et al.*, 2008 ). Toutefois, les performances de la reproduction durant cette période sont tributaires de la santé utérine durant la période d'attente volontaire (Sheldon *et al.*, 2006). Il devient évident qu'une attention particulière à l'utérus durant la période PP doit être portée.

L'involution utérine chez la vache en période PP est particulière. D'un milieu stérile durant la gestation, la cavité utérine est envahie rapidement après la mise-bas par des agents bactériens (Sheldon *et al.*, 2002) commensaux (habitants normaux) du vagin et du vestibule. Physiologiquement durant la période PP, l'utérus passe d'un milieu contaminé avec une inflammation importante (Griffin *et al.*, 1974; McDougall *et al.*, 2011; Sheldon *et al.*, 2002) après la parturition à un environnement utérin stérile et non inflammatoire à nouveau pour l'établissement d'une autre gestation à la fin de la période d'attente volontaire, 45 jours après la mise-bas (LeBlanc, 2008). Malheureusement, près de 50% des vaches laitières présentent un processus utérin infectieux et inflammatoire qui semble persister (LeBlanc, 2008) causant une infertilité consécutive à la perturbation de la fonction utérine et ovarienne (Williams *et al.*, 2007). Ce qui est au départ un mécanisme physiologique de remise en condition de la cavité utérine avant qu'une gestation puisse être établie à nouveau se transforme en un processus pathologique qui affecte la fertilité future de la vache.

Lorsque l'involution utérine se déroule de façon anormale, des conditions pathologiques surviennent à différents moments durant la période PP. La métrite survient généralement dans les deux premières semaines PP. Le pyomètre est généralement diagnostiqué plus tard après la première ovulation alors que l'endométrite est diagnostiquée

dans le dernier tiers de la période PP ou en période d'éligibilité (Sheldon *et al.*, 2006). La littérature avait proposé des critères histologiques pour définir les différentes conditions pathologiques. Toutefois dans la dernière décennie, des critères cliniques (signe clinique et impact sur les performances de la reproduction) ont été proposés (Sheldon *et al.*, 2006). Malgré les nombreuses études, l'incertitude demeure à savoir si ces conditions sont différentes et indépendantes ou si elles sont des expressions différentes dans le temps d'un même processus pathologique. L'endométrite attire l'attention des scientifiques parce qu'elle est plus insidieuse et est présente juste avant la mise en reproduction. De plus, les outils de diagnostic sont loin de rencontrer les besoins du clinicien diagnosticien (faible sensibilité et spécificité pour prédire les performances en reproduction). Les outils de diagnostic utilisés sont : l'examen transrectal (Leutert *et al.*, 2013), la vaginoscopie (Barlund *et al.*, 2008; LeBlanc *et al.*, 2002a; Leutert *et al.*, 2012; Runciman *et al.*, 2009), le Metricheck (Dubuc *et al.*, 2010a), le toucher vaginal (Runciman *et al.*, 2009; Williams *et al.*, 2005), la cytologie endométriale, la bactériologie et virologie utérine (Barlund *et al.*, 2008; Couto *et al.*, 2012; Deguillaume *et al.*, 2012; Kasimanickam *et al.*, 2005a) et la biopsie utérine. Malgré la faiblesse de ces outils, l'endométrite PP est associée à une altération des performances en reproduction. Même si les effets négatifs de l'endométrite sur les paramètres de reproduction sont consistants dans la littérature, l'efficacité du traitement demeure incertaine.

La littérature propose deux approches thérapeutiques pour le traitement de l'endométrite chez la vache laitière en période PP. La première option consiste à utiliser un antibiotique localement (intra-utérin) ou systémiquement, alors que la deuxième approche propose l'utilisation de prostaglandines (Lefebvre *et al.*, 2012). Avec une origine infectieuse, l'antibiotique est le traitement le plus rationnel pour contrôler la charge bactérienne. Malgré le grand nombre d'études, l'impact positif d'un traitement de vaches atteintes d'endométrite en période PP avec un antibiotique reste à déterminer. Le manque d'un groupe contrôle, le petit nombre d'animaux, les différentes définitions de cas et l'utilisation de paramètres sans impact économique (gestation) caractérisent beaucoup d'études. Dans un cadre d'utilisation judicieuse des antibiotiques dans les élevages, il devient impératif d'établir l'efficacité d'une antibiothérapie lors d'endométrite PP chez la vache laitière.

# Revue de littérature

## 1 Définition d'endométrite clinique / écoulements vaginaux purulents

La définition d'écoulements vaginaux purulents chez la vache laitière, aussi appelé endométrite clinique ou endométrite chronique ou métrite (plus rarement), est basée sur la présence d'écoulements du vagin dans la période PP. Ces formes d'écoulements sont en relation avec un processus physiologique ou pathologique présent à un moment donné après le vêlage. Afin d'harmoniser les différentes définitions utilisées dans les publications, en 2006, un consensus a été proposé (Sheldon *et al.*, 2006). L'endométrite clinique a été définie comme étant la présence d'écoulements purulents (mucus contenant plus de 50% de pus) à partir de 21 jours après le vêlage ou muco-purulents (mucus contenant approximativement 50% de pus) après 26 jours PP. Cette définition est basée principalement sur les observations des écoulements vaginaux faites par LeBlanc *et al.* (2002a) et Williams *et al.* (2005). Cette nomenclature se compose comme suit : score 0, mucus clair ou translucide; score 1, mucus contenant des flocons de pus blancs ou blanchâtres; score 3 exsudat formé de moins de 50% de matériel muco-purulent blanc ou blanchâtre; et score 4, exsudat formé de matériel purulent le plus souvent blanc, ou jaune mais aussi occasionnellement sanguinolent. Or cette nomenclature est incomplète. Il manque deux catégories de vaches : les vaches sans écoulements et les vaches avec un mucus trouble. Pour la première catégorie, étant donné que le diagnostic est fait à l'aide d'une palpation vaginal avec un gant lubrifié (Williams *et al.*, 2005), il n'était pas alors possible de mettre en évidence les vaches n'ayant pas d'écoulements vaginaux. Les vaches sans écoulement ont donc été assimilées au groupe de vaches ayant un mucus clair. Or, autant il est raisonnable de penser que la présence d'un mucus clair est un bon indicateur de la santé de l'appareil reproducteur (absence d'infection ou d'inflammation majeure), autant il est impossible d'en arriver à la même conclusion en absence d'écoulements (cas d'un pyomètre, par exemple). La deuxième catégorie manquante est celle entre le mucus

clair et le mucus contenant des flocons de pus : le mucus trouble. Pourtant ce grade avait déjà été évoqué dans la littérature et a été mentionné dans des publications ultérieures (Deguillaume, 2010; Knutti *et al.*, 2000; Mari *et al.*, 2012). Knutti *et al.* (2000) a divisé les vaches (n=3276) en deux catégories sur des critères d'examen transrectaux et vaginaux à plus de 21 jours PP, une catégorie de pathogénicité moyenne (utérus normal à l'examen transrectal et écoulements vaginaux troubles) en comparaison à une pathogénicité importante (gros utérus ou asymétrie entre les cornes à l'examen transrectal et écoulement purulent à l'examen vaginal). Les vaches appartenant au groupe de pathogénicité importante ont été associées à un taux de conception plus faible. Ainsi en omettant ces 2 catégories, un biais de classement est possible. Avec la recherche de la dernière décennie, de nouvelles perspectives de l'endométrite clinique ou des écoulements vaginaux purulents sont mises en évidence. Il est donc nécessaire d'apporter des ajustements ou des précisions à la définition établie en 2006 afin d'uniformiser les futures publications.

La définition de 2006 tenait compte de l'impact négatif sur les performances en reproduction (augmentation de l'intervalle entre le vêlage et la conception) pour déterminer un seuil. L'avantage d'utiliser les performances en reproduction comme définition d'une condition est d'apporter un outil pour estimer le coût économique en lien avec la pathologie étudiée. Toutefois, les paramètres utilisés habituellement incluent également une durée de temps entre le moment du diagnostic de l'infection ou de l'inflammation de l'appareil génital et celui du paramètre mesuré : 1) risque de gestation à la 1<sup>ère</sup> insémination (Brick *et al.*, 2012), 2) risque de gestation à 120 jours en lait (Dubuc *et al.*, 2010a), 3) risque de gestation à 150 jours en lait (Barlund *et al.*, 2008), 4) le jour en lait au moment de la gestation (Brick *et al.*, 2012; Dubuc *et al.*, 2010a; LeBlanc *et al.*, 2002a). Il est relativement clair que le minimum de temps entre le moment du diagnostic de la condition utérine et celui de l'établissement de la gestation représente la meilleure relation entre les deux événements. Dans de rares exceptions, les chercheurs ont éliminé le facteur temps en écouvillonnant les animaux le jour même de l'insémination. Et, en plus du facteur temps séparant le diagnostic du paramètre mesuré, il ne faut pas oublier qu'il y a de nombreux facteurs intervenant dans le processus d'ovulation, de fertilisation de l'ovule, de développement de l'embryon, de la nidation de l'embryon et de sa survie jusqu'au moment où le statut de reproduction (gestation ou pas) est diagnostiqué.

Les écoulements vaginaux dans la période PP peuvent être représentatifs d'une inflammation de l'ensemble du tractus génital, ou bien d'une partie uniquement. Stephens *et al.* (1986) indiquait que seulement 50% des animaux qui démontraient une inflammation cellulaire de l'endomètre utérin présentaient aussi des écoulements vaginaux purulents. De plus, seulement 25% des animaux qui présentaient des écoulements vaginaux avaient une inflammation de l'endomètre de la cavité utérine, les 75% restant présentaient une inflammation du vagin ou du col de l'utérus. Husted (2003) avait 64% des vaches de son étude qui présentaient des écoulements vaginaux purulents en lien avec des signes d'inflammation de la paroi vaginale, ce qui appuie les observations précédentes. Malgré que l'examen vaginal par vaginoscopie demeure probablement la méthode la plus précise pour évaluer les écoulements vaginaux, l'origine des écoulements reste incertaine et pourrait expliquer l'incohérence mentionnée précédemment. La définition d'endométrite clinique n'est donc pas toujours associée à une inflammation à proprement parler de l'endomètre. Le terme d'inflammation du tractus génital serait probablement plus approprié.

## **2 Changements utérins en période post-partum**

### **2.1 Involution structurelle/tissulaire/vasculaire**

#### **2.1.1 Vulve, vestibule, vagin**

Il n'y a pas d'informations disponibles sur l'involution PP des parties caudales du tractus génital: la vulve, le vestibule et le vagin. Il serait pourtant intéressant de connaître le processus d'involution et de reconstruction de ces parties anatomiques qui sont soumises à des étirements et des traumatismes importants lors de la parturition. Des lésions traumatiques à ces parties anatomiques du tractus génital lors de la parturition pourraient induire une réponse inflammatoire locale et potentiellement, sur tout le reste de l'appareil génital. En effet, la vascularisation du vagin et de l'utérus a pour origine l'artère iliaque interne. Les vaisseaux



utérins et vaginaux partagent des anastomoses artérielles et veineuses. Il existe aussi des anastomoses entre les vaisseaux utérins et les vaisseaux ovariens (Barone, 1990). L'épithélium vaginal est principalement formé de cellules cylindriques à vocation sécrétrice. Le nombre de couches cellulaires et l'activité de sécrétion est dépendante de l'environnement hormonal (Cole, 1930; Miroud *et al.*, 1991). La muqueuse vaginale peut être infiltrée par des leucocytes en fonction du cycle œstral (Cole, 1930; Miroud et Noakes, 1991; Wrobel *et al.*, 1986), du stade de reproduction comme la parturition (Wehrend *et al.*, 2004) et lors de contamination microbienne comme la vaginite (Husted, 2003).

La muqueuse vaginale est une voie potentielle d'administration de progestagènes chez la vache. En médecine humaine, il y a un intérêt à développer la voie vaginale comme voie d'administration médicamenteuse (Srikrishna *et al.*, 2013). Compte tenu que le tractus génital caudal pourrait représenter une source potentielle d'infection ou d'inflammation ou une voie de traitement pour les affections utérines, des études plus exhaustives de la vulve, du vestibule et du vagin en période PP pourraient faire avancer la compréhension de l'endométrite clinique chez la vache.

### **2.1.2 Col de l'utérus**

Pendant la parturition, sous l'influence d'une haute imprégnation œstrogénique, le col de l'utérus se dilate et est abondamment infiltré par les leucocytes éosinophiles (Wehrend *et al.*, 2004) et des leucocytes polymorphonucléaires neutrophiles (PMN) (van Engelen *et al.*, 2009). Les leucocytes éosinophiles et les PMN permettraient une dilatation optimale en participant à la dégradation du collagène (Hibbs *et al.*, 1982). Les éosinophiles pourraient aussi limiter l'inflammation due au vêlage grâce à leur propriété anti-inflammatoire (Wehrend *et al.*, 2004).

Selon Wehrend *et al.* (2003), l'involution du col pendant les 10 premiers jours PP se déroule en 4 étapes :

- la première journée, il y a une réduction rapide du diamètre cervical (de 25 à 5 cm avec une réduction moyenne de  $19.2 \pm 1.6$  cm) accompagnée d'une réorganisation structurelle réduisant les risques d'infections ascendantes.
- Le deuxième jour, la réorganisation et la diminution du diamètre du col de l'utérus se poursuit mais plus lentement et dans un sens cranio-caudal. Les replis du col ne sont pas encore apparents. Le col reste ouvert pour permettre l'élimination du liquide et des déchets cellulaires et tissulaires de la cavité utérine.
- Entre le troisième et le septième jour PP, l'involution cranio-caudale du col se poursuit (ouverture du col : 3 à 5 cm) avec la formation des replis du col de l'utérus.
- La dernière phase correspond à un agrandissement de l'ouverture cervicale aux alentours du dixième jour PP (6 cm vers Jour 10). Cette phase est spécifique à l'espèce bovine et est en lien avec la phase finale d'élimination de caroncules utérines. Cette réouverture correspond aussi à l'apparition d'un premier pic d'œstrogènes en PP (Zhang *et al.*, 2010). Les œstrogènes vont provoquer un relâchement du col de l'utérus et son ouverture tout en favorisant les contractions du myomètre (Wehrend *et al.*, 2004) et facilitent l'expulsion des lochies.

Le diamètre extérieur du col montre une involution macroscopique constante et rapide jusqu'à environ la quatrième semaine PP pour ensuite se stabiliser jusqu'à la septième semaine indépendamment de la parité (Zhang *et al.*, 2010) ou du rétablissement du cycle œstral (Heppelmann *et al.*, 2013; Senosy *et al.*, 2009). Toutefois, les animaux présentant des écoulements vaginaux fétides ou contenant du matériel purulent entre 8 et 21 jours PP (Oltenacu *et al.*, 1983) ou des animaux avec une rétention placentaire et/ou une métrite entre 4 et 21 jours PP (Heppelmann *et al.*, 2013) montrent une involution macroscopique cervicale moins rapide. À 26 jours PP, les vaches avec des écoulements vaginaux purulents avaient significativement un diamètre cervical moyen plus gros que les vaches sans écoulement purulent ( $>4.2$  vs  $3.6$ ,  $p=0.02$ ) (Brick *et al.*, 2012).

Selon Wehrend et Bostedt (2003), un vêlage difficile dû à un col de l'utérus pas assez dilaté entraîne, dans environ 20% des cas, un retard de l'involution de l'ouverture du col dans

les 10 premiers jours PP, surtout si une fœtotomie a été réalisée. Cette proportion n'est cependant pas différente de ce qu'il a observé chez les animaux avec une dilatation adéquate du col au moment du vêlage. Toutefois, ces observations s'arrêtent au 10<sup>e</sup> jour PP. Il serait intéressant de suivre l'évolution sur la totalité de la période d'attente volontaire et aussi de les mettre en relation avec les performances en reproduction futures de ces vaches.

L'épithélium du col de l'utérus, formé par des cellules cylindriques, certaines ciliées, d'autres à vocation sécrétrice de mucus, est infiltré par les leucocytes en période pré et PP. Selon Stephens *et al.*, (1986), il y a une corrélation très forte entre la présence de bactéries aérobies et anaérobies lors d'un écouvillonnage du col utérin et la présence de plus de 5% de PMN cervicaux. Ce seuil de 5% a été également validé par Deguillaume *et al.* (2012) pour les vaches entre 21 et 35 jours PP. Il est considéré comme néfaste sur les performances en reproduction des vaches laitières si la proportion de PMN dépasse ce seuil.

### **2.1.3 Corps utérin et cornes utérines**

Dans la première semaine PP, l'utérus est gros, difficile à palper et impossible à rétracter manuellement. On peut toutefois sentir un fort tonus de la paroi de l'utérus amenant la formation de gros sillons. L'involution utérine macroscopique se termine vers la quatrième semaine PP (Heppelmann *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2010). La corne utérine de la gestation mesure environ 40, 10 et 3 cm de diamètre au moment du vêlage, vers le dixième jour PP et vers la quatrième semaine PP, respectivement (Gier *et al.*, 1968). Deux semaines après le vêlage, l'utérus entier est palpable et possible à circonscrire. Chez ces mêmes vaches l'utérus passe d'un poids de 10 kg au vêlage à 0.8 kg en l'espace de 4 à 5 semaines (Gier et Marion, 1968). Alors que l'involution macroscopique du col de l'utérus ne varie pas avec la parité, il en est autrement pour l'utérus. Les primipares ont une involution de la corne utérine gestante plus lente que les pluripares (Mateus *et al.*, 2002b).

Le corps utérin montre aussi une involution rapide tôt en PP, il est de l'ordre de 5 cm dès la première semaine PP et il termine son involution macroscopique entre la quatrième et la cinquième semaine PP avec une taille d'environ 2.2 cm (Mateus *et al.*, 2002b). Toutefois, les vaches présentant des lochies fétides et purulentes avec ou sans symptômes systémiques au

cours des 6 premières semaines PP ont montré une involution macroscopique du corps utérin plus lente que les vaches ayant eu des lochies normales. Le diamètre du corps utérin était significativement augmenté la troisième et quatrième semaine PP (Mateus *et al.*, 2002b). Au fur et à mesure de la progression de l'involution utérine, les barrières mécaniques (col, ligament vestibulo-vaginal et la vulve) reprennent leur condition et fonction en bloquant l'invasion ascendante par des agents opportunistes ou pathogènes.

Au niveau tissulaire, l'involution utérine s'accompagne par une obturation quasi complète des vaisseaux sanguins caroncules dans les 2 premiers jours PP et amène à une nécrose progressive des caroncules (Archbald *et al.*, 1972). À la fin de la première semaine PP, une ligne de démarcation évidente apparaît entre la partie viable des caroncules et la partie nécrosée qui sera éliminée. Vers la fin de la 2<sup>ème</sup> semaine, la partie nécrotique se détache et s'additionne au sang et autres fluides utérins pour former les lochies qui seront rejetés. À ce moment, l'épithélialisation de l'endomètre commence (Wagner *et al.*, 1969). Ce processus de reconstruction de l'endomètre prend fin selon les auteurs vers le 30<sup>ème</sup> jour PP (Archbald *et al.*, 1972; Wagner et Hansel, 1969) ou plus tard, entre 45<sup>ème</sup> et le 50<sup>ème</sup> jour (Morrow, 1986). L'épithélium de l'ensemble du tractus génital (vestibule vaginal, cavité vaginale, col de l'utérus et cavité utérine) est formé principalement de cellules cylindriques dont certaines sont à vocation sécrétrice (Cole, 1930; Miroud et Noakes, 1991; Wrobel *et al.*, 1986). Cet épithélium est infiltré par des leucocytes dépendamment de l'environnement hormonal (cycle oestral, gestation) (Cole, 1930; Miroud et Noakes, 1991; Wrobel *et al.*, 1986), de l'évolution PP et aussi de la contamination microbienne (Prunner, Pothmann, *et al.*, 2014). Cette infiltration ne se fait pas de façon uniforme ni synchrone au sein de l'ensemble du tractus génital (Cole, 1930; Deguillaume, 2010; Deguillaume *et al.*, 2012; Miroud et Noakes, 1991).

L'involution du tractus génital de la vache se déroule majoritairement dans les 4 à 5 premières semaines PP que ce soit au niveau macroscopique ou microscopique. Toutefois, la présence d'écoulements purulents témoigne généralement d'un retard de l'involution.

## 2.2 Contenu utérin

### 2.2.1 Lochies (débris-liquide)

Suite au vêlage, les liquides placentaires, le sang, les débris cellulaires et l'exsudat de l'endomètre qui se sont accumulés dans la cavité utérine vont être expulsés en grande partie par les contractions du myomètre utérin (Vaillancourt, 1987). La nécrose des caroncules et l'accumulation de débris cellulaires, de sang et d'exsudat endométrial (Wagner et Hansel, 1969) vont former les lochies. Ces lochies seront en partie expulsées vers la deuxième semaine PP, au moment du premier pic d'œstrogène qui conduit à la réouverture du canal du col de l'utérus et à la contraction du myomètre utérin (Wehrend, Failing, *et al.*, 2003). La dégénérescence des caroncules produit une décharge blanchâtre qui se mélange aux pertes brunâtres (Olson, 1986). Ce matériel blanchâtre peut être difficile à distinguer des écoulements purulents pathologiques. Les lochies sont un milieu favorable à la croissance bactérienne. Avant l'expulsion complète du contenu utérin, le milieu utérin est donc favorable à la croissance bactérienne. Vers le vingt-cinquième jour PP, l'utérus a vidangé la grande partie de son liquide et les pertes génitales deviennent plus épaisses et brunâtres. Cette observation n'est pas constante. Dans l'étude de Senosy *et al.* (2009), à  $18 \pm 2$  jours PP, environ 2 tiers des vaches présentent un écoulement mucopurulent ou purulent à la vaginoscopie, et à  $24 \pm 2$  jours PP, elles ne sont plus que 30%. Dans cette étude, les vaches ayant présenté des signes de métrite, de rétention placentaire, ou ayant présenté une dystocie ont été exclues. Dans une autre étude (Williams *et al.*, 2005), où il n'y avait pas ces critères d'exclusion, les mêmes observations ont, quand même, été faites : 31% d'écoulements muco-purulents et purulents à  $21 \pm 1$  jours PP et 17% à 28 jours PP. On peut donc estimer que dans des conditions d'élevage normales, environ un quart des vaches présentent des écoulements vaginaux muco-purulents à purulents entre la troisième et la quatrième semaine PP.

### 2.2.2 Contamination et élimination des bactéries de l'utérus en post-partum

Durant la gestation, la cavité utérine est stérile (Foldi *et al.*, 2006) et sauf rare exception, l'infection de l'utérus durant la gestation entraîne la mort du fœtus. Avec le part,

l'utérus perd ses barrières anatomiques protectrices naturelles (col utérin, sphincter vestibulo-vaginal et vulve) et se contamine de bactéries de façon quasi systématique avec 90% des vaches présentant une flore bactérienne importante (diversifiée mais équilibrée) dès la première semaine PP (Sheldon et Dobson, 2004). La contamination bactérienne immédiatement après le part est donc considérée comme physiologique (le vocabulaire normal serait plus adapté) tant qu'elle ne persiste pas dans le temps (plus de quelques semaines PP) et qu'elle n'entraîne pas de signes systémiques chez l'animal. (Bonnett, Martin, *et al.*, 1991; Mateus *et al.*, 2002b; Sheldon et Dobson, 2004; Sheldon, Noakes, *et al.*, 2004). Dans un processus d'involution utérine physiologique, la prévalence de vaches avec la présence de bactéries utérines diminue avec le temps pour être pratiquement inexistante à la fin de la période d'attente volontaire (Griffin *et al.*, 1974; McDougall *et al.*, 2011; Sheldon *et al.*, 2002). Le temps représente donc une variable importante dans l'involution utérine et le développement des pathologies utérines.

L'équilibre de la population bactérienne peut être brisé, et certaines bactéries dont des souches pathogènes perdurent durant l'involution utérine et deviennent associées aux différentes conditions pathologiques utérines. Les vaches dont les cultures bactériennes de l'utérus mettent en évidence des bactéries pathogènes jusqu'à 5 semaines PP présentent un retard plus ou moins grand d'involution utérine (Mateus *et al.*, 2002a). La prévalence de vaches ayant une culture bactérienne positive était de 40% à 28 jours PP dans une étude effectuée en Nouvelle-Zélande (McDougall *et al.*, 2011).

Le type de bactérie est un facteur important dans l'étiologie des conditions pathologiques utérines. Un lien étroit existe entre la persistance de certaines bactéries et l'inflammation du tissu utérin (Williams *et al.*, 2005). Ce lien peut aussi s'étendre à la détérioration des paramètres de la reproduction de la vache en PP (LeBlanc *et al.*, 2011). La corrélation entre la présence de bactéries dans l'utérus et la présence d'inflammation (mesurée en terme de % de PMN) n'est pas parfaite (McDougall *et al.*, 2011; Prunner, Pothmann, *et al.*, 2014; Westermann *et al.*, 2010). L'un peut être présent sans l'autre. Les bactéries pathogènes plus fréquemment rencontrées dans les conditions utérines pathologiques sont *Trueperella pyogenes* (précédemment nommée *Arcanobacterium pyogenes*), *Escherichia coli*, *Fusobacterium necrophorum*, *Bacteroides spp*, *Prevotella spp* (Bonnett, Martin, *et al.*, 1991;

Mateus *et al.*, 2002b; Sheldon et Dobson, 2004; Sheldon *et al.*, 2002; Williams *et al.*, 2005). Il n'est pas encore bien établi que certains groupes ou clones particuliers de ces bactéries entraînent une pathologie du système reproducteur (Silva *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2009). Dans le cas d'*E. coli*, un groupe clonal récemment caractérisée et appelée *Escherichia coli* pathogène endométrial (En PEC) semble plus pathogène par sa capacité d'adhérer et d'envahir plus facilement les cellules de l'endomètre (Sheldon *et al.*, 2010). Cette étude a été effectuée sur une seule ferme. D'autres études sont nécessaires afin de déterminer la prévalence et la pathogénicité réelle de cette bactérie.

Cette panoplie de bactéries potentiellement pathogènes se retrouvant en même temps au sein de l'utérus et peuvent agir de façon synergique pour déjouer les défenses immunitaires (Bonnett, Martin, *et al.*, 1991; Gier et Marion, 1968; Herath *et al.*, 2009; Mateus *et al.*, 2002b). Cette présence prolongée de bactéries après le vêlage a aussi des conséquences néfastes sur la cyclicité fonctionnelle des ovaires. En effet, il a été rapporté des anœstrus, des anovulations et une production faible de progestérone par le corps jaune (Mateus *et al.*, 2002b; Sheldon, Cronin, *et al.*, 2009; Sheldon *et al.*, 2002).

### 2.2.3 Virus

L'Herpes virus bovin de type 4 est un gamma-herpesvirus, répandu dans les troupeaux du monde entier. Il se diffère de l'Herpès virus bovin de type 1 qui, lui est un alpha-herpesvirus. La vaccination à l'aide des vaccins commerciaux contre le virus de type 1 ne permet pas de développer une protection contre le type 4. Ce virus a un attrait pour les cellules épithéliales et il a été isolé sur l'ensemble du tractus génital (Chastant-Maillard, 2013; Donofrio *et al.*, 2007; Monge *et al.*, 2006; Sheldon, Price, *et al.*, 2009). Son rôle dans le développement de maladie génitale est encore incertain. Mais les conditions du PP, propices aux réactivations des herpesvirus, font qu'il a potentiellement un rôle sous-estimé dans certains processus pathologiques (Donofrio *et al.*, 2008).

## 2.3 Activité ovarienne chez la vache laitière en post-partum et l'involution utérine

Durant les 2 premières semaines après le vêlage, la concentration sérique du métabolite de la prostaglandine (13,14 dihydro-15 céto PGF $2\alpha$ ) est très élevée alors qu'il y a absence complète de progestérone et d'œstrogènes (Edqvist *et al.*, 1978; Slama *et al.*, 2002). L'axe hypothalamo-hypophysaire est inactif, mais reprendra fonction vers la fin de la deuxième semaine après la mise bas alors que l'hypophyse redevient réceptive à l'hormone de relâchement des gonadotropines, la gonadolibérine (GnRH). Cette réceptivité de l'hypophyse convergera par la première ovulation vers le vingt-cinquième jour en moyenne après le vêlage. Les primipares ont une première ovulation retardée avec 31 jours en lait comparativement à 21 jours en lait pour les multipares (Zhang *et al.*, 2010). De même les vaches avec et sans endométrite, ont présenté aussi une différence au moment de la deuxième ovulation à 57 et 43 jours, respectivement. Dans une autre étude, aucune différence de temps à la première ovulation, vers 4 semaines PP, n'a été mesurée entre les vaches sans et celles avec une endométrite moyenne et sévère (Mateus *et al.*, 2002b).

Dans une autre perspective, l'involution utérine ne semble pas affectée par la folliculogénèse. Durant les 6 premières semaines PP, les vaches dont tous les follicules de plus de 6 mm ont été ponctionnés systématiquement ont eu une involution utérine similaire à celles dont les follicules n'ont pas été ponctionnés (Heppelmann *et al.*, 2013). La même observation a été faite avec les vaches à risque élevé de développer des anomalies utérines (rétention placentaire et écoulements de métrite lors de la première semaine PP) et les vaches normales. Toutefois ces vaches prédisposées à l'endométrite ont montré un risque de conception à la première insémination diminué et un allongement de l'intervalle vêlage-gestation. Elles ont aussi montré plus d'écoulement vaginaux purulents si elles n'avaient pas subi de ponction des follicules. L'absence de progestérone circulant due à l'absence d'un corps jaune fonctionnel chez les animaux ponctionnés pourrait expliquer cette observation, car la progestérone a un effet immunosuppresseur (Lewis, 2003). Dans cette étude particulière, environ 38% des animaux à risque ont développé un corps jaune persistant (Heppelmann *et al.*, 2013). L'induction de l'ovulation (formation d'un corps lutéal) en injectant de la GnRH à 17 et 20



jours PP, n'améliore pas ni les écoulements vaginaux à 35 jours PP, ni le risque de gestation (Bittar *et al.*, 2014).

Il est intéressant de soulever l'effet négatif de la progestérone sécrétée par le corps lutéal lors du premier cycle œstral PP. Des essais d'utilisation des œstrogènes de façon systémique ou localement (infusion intra-utérin) tôt en PP, ont montré qu'il n'y avait pas d'effet bénéfique sur l'involution utérine (Sheldon, Noakes, Bayliss, *et al.*, 2003; Sheldon, Noakes, Rycroft, *et al.*, 2003). Il y a même eu un effet négatif, en favorisant la croissance bactérienne et surtout des bactéries anaérobies potentiellement pathogènes au moment où l'épithélium utérin est dans sa phase de régénération (entre la deuxième et la troisième semaine PP) (Sheldon, Noakes, *et al.*, 2004). Les hormones stéroïdiennes du cycle œstral tôt en PP semblent jouer contre le système immunitaire dans le contrôle bactérien.

### **3 Réponse immunitaire utérine en post-partum**

#### **3.1 Immunité et gestation**

Le système immunitaire a un rôle important durant toutes les étapes physiologiques de la vie reproductive de la vache, mais particulièrement durant la gestation et la période PP qui est sensée conduire au retour de la fertilité initiale. Durant la gestation, le fœtus et ses membranes sont perçus comme une allogreffe à cause, entre autres, de la différence des gènes fœtaux du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) qui sont reconnus comme un corps étranger par la mère. Il est donc important d'inhiber le système immunitaire de la mère durant toute la gestation. L'accumulation de macrophages au sein du tissu endométrial est un bel exemple de l'importance du système immunitaire inné parce que ces cellules immunitaires jouent un rôle dans le remodelage tissulaire, l'apoptose cellulaire et la régulation générale du système immunitaire (Oliveira *et al.*, 2012). Après 9 mois d'inhibition du système immunitaire durant toute la gestation, il faut assumer que l'immunité innée est réactivée pour rencontrer les besoins de défense utérine nécessaire durant la période PP. Le système immunitaire joue également un rôle important dans l'involution (remodelage) utérine PP (Chapwanya *et al.*, 2009).

## 3.2 Les Polymorphonucléaires neutrophiles en période post-partum

Après la mise-bas, les bactéries présentes dans le passage vestibulo-vaginal et la région périnéale envahissent rapidement la cavité utérine. À partir de ce moment, le système de défense immunitaire inné doit reconnaître l'envahisseur, articuler et activer la première ligne de défense pour assurer la prise en charge des bactéries envahissantes et les expulser du tractus (Stossel, 1975). Le système immunitaire inné inclut les cellules polymorphonucléaires dont le principal joueur est le PMN. Les PMN représentent de loin la population de cellules inflammatoires la plus importante en terme de nombre.

La parturition est caractérisée par une leucocytose et une différenciation des globules blancs (Kim *et al.*, 2005) associée à l'élévation du cortisol produit par le fœtus (Preisler *et al.*, 2000). Cette leucocytose se transforme en leucopénie dans la première semaine PP à cause de la migration des PMN de la circulation sanguine au site d'inflammation et d'infection de l'utérus et de la glande mammaire (Guidry *et al.*, 1976). Une accumulation de PMN dans l'utérus a été mesurée dans les 12 heures qui ont suivi la parturition (Prunner, Pothmann, *et al.*, 2014). Les PMN dans la circulation sanguine ont une demi-vie très courte (6 à 12 heures). Leur passage du système circulatoire au site inflammatoire utérin augmente leur demi-vie de façon considérable (à quelques jours) (Goldsby, 2003). Une fois l'infection ou l'inflammation utérine sous contrôle, le nombre de PMN utérins retourne à des valeurs normales. Durant l'involution utérine normale, les PMN utérins disparaissent presque complètement vers la quatrième semaine PP (Gabler *et al.*, 2010). Toutefois, un utérus en bonne santé ne devrait pas être exempt complètement de PMN mais en contenir un nombre restreint (Klucinski, Targowski, Winnicka et Miernik-Degorska, 1990). La grande majorité des vaches auront donc éliminées la contamination utérine bactérienne entre 4 ou 5 semaines PP (Griffin *et al.*, 1974; Hussain *et al.*, 1990; Sheldon *et al.*, 2002). Toutefois, pour un certain nombre de vaches, la contamination bactérienne et/ou l'inflammation persisteront. Environ 40% des vaches qui présentent des écoulements vaginaux à 28 ou à 42 jours PP, et 50% de celles présentant une

inflammation de l'utérus, ont une culture bactérienne positive pour les 5 bactéries considérées communément comme pathogènes (McDougall *et al.*, 2011).

### 3.3 Fonctionnement des polymorphonucléaires neutrophiles

L'efficacité des PMN repose sur 4 fonctions importantes : 1) migration / chemotaxis, 2) adhérence / agrégation, 3) phagocytose, et 4) action cytocyde / dégranulation / production de peroxyde. La migration des neutrophiles de la circulation sanguine vers le tissu ou la cavité utérine est rendue possible grâce à une cascade d'évènements amenant la synthèse de cytokines pro-inflammatoires. Les dommages tissulaires et cellulaires de l'utérus et tout particulièrement de l'endomètre (Moller, 1970) lors de la mise-bas neutralisent des barrières physiques importantes comme la mucine (Davies *et al.*, 2008) qui est responsable de prévenir l'attachement des bactéries sur l'endomètre. La perte d'épithélium endométrial implique aussi une perte de production de peptides antibactériens (Davies *et al.*, 2008) et de d'autres protéines (Tekin *et al.*, 2003). Avec la perte d'épithélium utérin vient également la perte de récepteurs de type 'toll-like' (TLRs) présents à la surface des cellules endométriales. Les récepteurs TLRs reconnaissent les ligands bactériens comme les peptidoglycanes et les lipopolysaccharides (LPS) à la surface des bactéries (Kim *et al.*, 2005; Sheldon et Dobson, 2004) et sont une partie importante du système immunitaire inné. Les substances chimiotactiques produites par les bactéries elles-mêmes jouent également un rôle important dans l'appel de cellules inflammatoires. L'inflammation et/ou l'infection induisent la production importante de protéines de la phase aiguë par les hépatocytes (Baumann *et al.*, 1994) qui reviennent à des niveaux normaux deux semaines plus tard (Sheldon *et al.*, 2001). D'autres molécules comme le plasminogène (Moraitis *et al.*, 2004), l'orosomucoïde [ $\alpha$ 1 glycoprotéine acide, (Cairolì *et al.*, 2006)], et l'haptoglobine (Skinner *et al.*, 1991) ont également un rôle dans la cascade de l'inflammation.

### **3.4 Dysfonctionnement des polymorphonucléaires neutrophiles**

L'activité des PMN est essentielle à l'élimination des bactéries utérines (Hussain, 1989; Beutler, 2004). Chez les vaches développant des infections utérines en période PP, le mécanisme de défense des PMN, et tout particulièrement leur fonction de phagocytose, est perturbé (Kimura *et al.*, 2002). Les vaches avec une endométrite en période PP ont des PMN sanguins avec une capacité de phagocytose en période pré-partum réduite comparativement à celles qui restent saines (Kim *et al.*, 2005). Une fonction réduite des PMN prédispose également les vaches à des infections utérines plus grave comme la métrite puerpérale (Kim *et al.*, 2005). Les vaches avec des PMN sanguins contenant moins de glycogène sont plus à risque de développer une métrite aiguë après le vêlage (Galvao *et al.*, 2010). Une capacité réduite d'oxydation des PMN (réduction de l'activité du cytochrome C et de la myéloperoxydase) et un chimiotactisme déficient sont également associés à une plus grande incidence d'infections utérines PP et de rétention placentaire (Cai *et al.*, 1994; Hammon *et al.*, 2006; Kimura *et al.*, 2002). L'utilisation d'antioxydants semble améliorer l'activité des neutrophiles et réduit l'incidence de métrite et d'endométrite (Hansen, 2012). L'association entre l'infection utérine PP et le dysfonctionnement du système immunitaire n'est pas seulement reliée exclusivement aux PMN, mais également aux mécanismes en amont de ces derniers. Les vaches qui présentent ultérieurement des pathologies utérines sécrètent moins de cytokines pro-inflammatoires pendant la première semaine PP (Ghasemi *et al.*, 2012). Le rapport cytokines pro/anti-inflammatoires est augmenté suite à une contamination utérine chez les vaches qui ultérieurement auront des performances reproductives altérées (Herath *et al.*, 2009).

### **3.5 Immunité complémentaire aux polymorphonucléaires neutrophiles**

Même si les PMN apparaissent comme les principaux acteurs dans la première ligne de défense de l'utérus, d'autres éléments de l'immunité jouent aussi un rôle. L'action des opsonines, dont certaines globulines, et des protéines du complément, est essentielle dans le

mécanisme de reconnaissance et de phagocytose de l'agent envahisseur. L'activité des lymphocytes B est également importante à travers la production d'anticorps locaux dirigés contre des bactéries présentes dans l'utérus (Dhaliwal *et al.*, 1996; Watson *et al.*, 1990).

Les anticorps naturels, anticorps présents en absence d'une immunisation, semblent être un bon indicateur de la sensibilité d'animaux à développer une pathologie utérine en PP. Dans l'étude de Machado *et al.* (2014), les animaux qui ont développé une métrite PP avaient significativement moins d'anticorps naturels circulants. Ce déficit était mesurable déjà un mois avant le vêlage.

Le système immunitaire est donc un agent important dans la fonction reproductrice de la vache. Lors de la gestation, il est freiné pour ne pas rejeter l'allogreffe qu'est le fœtus et ses membranes. Ensuite, il participe, de manière très active, à la reconstruction du tractus génital et au contrôle des infections dans cette zone qui a perdu toutes ses défenses physiques pendant et juste après le vêlage. Plus tard, il participe aussi au cycle œstral (Shirasuna *et al.*, 2013) et enfin au moment de l'insémination la présence de PMN en faible quantité favoriserait le risque de gestation (Kaufmann, Drillich, *et al.*, 2009).

La difficulté dans la compréhension du rôle bénéfique ou néfaste de la réaction inflammatoire réside dans la balance entre les processus physiologiques et ceux pathologiques. Les outils diagnostics disponibles pour le clinicien restent à améliorer dans cette optique de mieux discerner et contrôler le processus pathologique.

## **4 Outils diagnostiques des inflammations du tractus génital**

### **4.1 Biopsie**

La biopsie est une technique qui permet de mettre en évidence un statut inflammatoire de la muqueuse en se basant sur l'infiltration de celle-ci par des leucocytes. Son interprétation en observant les coupes histologiques est subjective (Bonnett, Miller, Etherington, *et al.*, 1991). Meira *et al.* (2012) a essayé d'en améliorer l'interprétation en développant un système

de score plus détaillé. Mais la détermination du seuil n'a pas été basée sur les performances ultérieures en reproduction des animaux, ce qui le rend donc difficilement utilisable pour prédire l'infertilité. Toutefois, en lien avec le développement des technologies « -omiques », la biopsie devient un outil très intéressant et objectif dans l'analyse des mécanismes moléculaires (Chapwanya *et al.*, 2010). De plus, cette technique ne montre pas d'effets néfastes ni sur la muqueuse utérine, même avec des prélèvements répétés dans une zone précise (Chapwanya *et al.*, 2010), ni sur les performances en reproduction chez la vache (Chapwanya *et al.*, 2010; Goshen *et al.*, 2012). Cependant les prélèvements ne sont pas toujours d'assez bonne qualité pour être exploitables. Deux études rapportent entre 60 et 70% de biopsies amenant à une lecture de bonne à très bonne qualité (Bonnett, Miller, Martin, *et al.*, 1991; Meira *et al.*, 2012). Par contre, pour ce qui est de l'extraction d'ADN ou d'ARN dans le but d'analyse avec les technologies « -omiques », Chapwanya *et al.* (2010) a obtenu une moyenne de 7.6 sur une échelle de qualité de 10.

L'utilisation de la biopsie pour mettre en évidence la présence de bactéries, a démontré une capacité d'isoler 33% de plus de bactéries au sein de l'utérus que si le prélèvement avait été fait par écouvillonnage (Messier *et al.*, 1984). Mais dans cette étude, il n'avait pas été possible d'associer des lésions histologiques à un type de bactérie ou bien à une quantité de bactéries.

Un modèle prenant compte la biopsie, l'examen clinique et la bactériologie entre 26 et 40 jours PP, proposé par Bonnett *et al.* (1993), a démontré une bonne sensibilité (92%) et une bonne spécificité (77%) en vue de prédire le statut de gestation à 120 jours PP. Avec la charte développée par Meira *et al.* (2012), la biopsie entre 21 et 47 jours PP est une technique faiblement sensible (44%) mais spécifique (92%) pour détecter l'inflammation endométriale diagnostiquée par la cytologie.

La biopsie comme technique de diagnostic basée sur l'observation histologique reste difficilement utilisable sur la ferme, mais avec les nouvelles technologies moléculaires, la biopsie s'avère être un outil avec un grand potentiel.

## 4.2 Cytologie

La cytologie est basée sur l'analyse d'échantillons prélevés soit à l'aide d'un écouvillon ou d'une cytobrosse sur la muqueuse du col utérin ou niveau de l'endomètre utérin, soit en faisant un lavage utérin (dans ce cas, c'est l'endomètre utérin qui est analysé). La technique de cytobrosse a été comparée à la technique de lavage utérin par Kasimanickam *et al.* (2004), elle a montré des avantages suivants : la proportion de PMN était plus élevée, il n'y avait donc pas l'effet de dilution du lavage qui, étant plus irritant, détache plus de cellules de la muqueuse. Contrairement au lavage, où il y a eu 17% de non échantillonnage dû à l'impossibilité de ré-aspirer assez de liquide, la cytobrosse permet d'avoir du matériel à chaque fois avec des cellules moins déformées. Il faut cependant préciser que même si du matériel est présent sur la cytobrosse, la lecture cytologique peut ne pas être réalisable. Il a été rapporté dans certaines études 7 à 8% de lames cytologiques non utilisables (Prunner, Pothmann, *et al.*, 2014; Westermann *et al.*, 2010).

Sur ces échantillons, un comptage de cellules PMN et de cellules épithéliales est réalisé afin d'exprimer une proportion de PMN. Il est aussi possible d'utiliser un test d'estérase leucocytaire (Cheong *et al.*, 2012; Couto *et al.*, 2012; Santos *et al.*, 2006) sur ces échantillons. Ce test se réalise en mettant en contact le prélèvement avec le réactif qui se trouve sur une bandelette de tests urinaires. Il permet d'avoir une évaluation essentiellement semi-quantitative de la présence de ces PMN.

La cytologie n'a pas été utilisée pour évaluer l'inflammation de la muqueuse vaginale.

En ce qui concerne le col utérin, deux études ont utilisé la méthode d'écouvillonnage. Le seuil de PMN qui montre un effet négatif sur les performances en reproduction s'avère être 5% (Deguillaume *et al.*, 2012; Stephens *et al.*, 1986). Dans l'étude de Stephens *et al.* (1986), il n'a été possible de mettre en évidence une culture bactérienne positive que dans 37% des cas de vaches ayant plus de 5% de PMN. Deguillaume *et al.* (2012) a montré que 20% des animaux entre 21 et 35 jours PP avaient une cytologie supérieure au seuil de 5% et cette proportion se maintient jusqu'à 60 jours PP.

Il n'y a pas une forte corrélation entre les vaches présentant une inflammation au niveau du col de l'utérus et celles présentant une inflammation au niveau de l'endomètre :

environ 70% des animaux positifs à un test était positif aussi à l'autre. Dans l'étude de (Stephens *et al.*, 1986), 60% des vaches de la catégorie *repeat breeders* présentaient une cervicite sans endométrite mais tous les animaux avec une endométrite présentaient aussi une inflammation du col. Dans l'étude de Deguillaume *et al.* (2012), l'inflammation physiologique côtoie l'inflammation pathologique entre 21 et 35 jours PP, ce qui est différent de l'étude de Stephens *et al.* (1986), où les observations ont été faites sur des animaux avec de l'infertilité avérée. Couto *et al.* (2012) a trouvé une forte corrélation entre l'utilisation du test d'estérase leucocytaire au niveau du col entre 20 et 35 jours PP et la proportion de PMN au niveau de l'endomètre utérin sans toutefois pouvoir faire un lien avec un processus pathologique affectant le statut de reproduction à 90 jours PP.

Stephens *et al.* (1986) ont dans leur étude 90% des vaches avec une inflammation du col qui présentaient aussi des écoulements vaginaux.

La cytologie de l'endomètre utérin a été utilisée chez des animaux tôt en PP afin de la mettre en relation avec l'involution utérine. Prunner *et al.* (2014) a rétrospectivement regardé l'évolution moyenne de la proportion de PMN du vêlage jusqu'à 28 jours PP de 3 groupes de vaches reparties selon leur statut d'inflammation utérine au vingt-et-unième jour PP. L'évolution de la proportion de PMN est très variable au sein d'un même groupe de vaches et aussi dans le temps. La diminution de la proportion de PMN au fil du temps, ne se fait pas de façon progressive. Il a été observé une fluctuation rendant les groupes non significativement différents jusqu'au vingt-et-unième jour PP. Cette variabilité a été aussi rapportée au niveau individuel avec des profils variés dont certains montraient des pics de réactivation de l'inflammation de l'endomètre au cours du temps (Deguillaume, 2010; Gabler *et al.*, 2010). Étant donné que la période de ré-épithélialisation de l'endomètre utérin s'étend jusqu'à environ 30 jours PP (Archbald *et al.*, 1972; Wagner et Hansel, 1969), les fluctuations de la proportion de PMN au sein de cette période pourraient-elles permettre de faire la distinction entre un phénomène physiologique et un phénomène pathologique ? Les vaches ayant des écoulements vaginaux purulents au vingt-et-unième jour PP n'avaient pas un profil de la proportion de PMN au fil du temps, significativement différent des vaches considérées comme normales entre le vêlage et le vingt-et-unième jour PP.



La cytologie a été étudiée pour prédire les performances en reproduction des vaches. Selon les études, le moment du prélèvement était entre 21 et 60 jours PP (Barlund *et al.*, 2008; Couto *et al.*, 2012; Deguillaume *et al.*, 2012; Dubuc *et al.*, 2010a; Galvao, Frajblat, *et al.*, 2009; Ghasemi, 2011; Kasimanickam *et al.*, 2004; McDougall *et al.*, 2011), et les objectifs étaient le statut de gestation à un moment donné (de 90 jours PP à 150 jours PP), le jour PP médian de la gestation ou la vitesse à laquelle les vaches sont devenues gestantes sur une période allant de 200 à 300 jours PP. Les seuils ont donc été déterminés en fonction du moment du prélèvement, ils variaient entre 4 et 18% de PMN.

Etant donné le laps de temps écoulé entre le moment du diagnostic et la constatation de la gestation, la sensibilité de ces tests est généralement faible (moins de 50%) mais la spécificité est généralement bonne (supérieure à 80%).

En ce qui concerne la concordance entre la cytologie utérine et les écoulements vaginaux, elle est généralement faible (Dubuc *et al.*, 2010a; McDougall *et al.*, 2011; Peter *et al.*, 2011; Westermann *et al.*, 2010).

La cytologie est donc un instrument intéressant qui met en évidence la présence de signe d'inflammation. Toutefois, son utilisation actuelle ne permet pas de faire la différence entre une inflammation physiologique et une inflammation pathologique.

### **4.3 Vaginoscopie, Metrichek<sup>®</sup> et palpation vaginale.**

Les écoulements vaginaux peuvent être de différentes natures. Tôt en PP, les vaches présentent des écoulements physiologiques correspondant aux lochies vers la 2<sup>e</sup> semaine PP. Par la suite, les vaches ne présenteront plus d'écoulement, ou un écoulement mucoïde contenant plus ou moins de matériel purulent.

En utilisant la charte de Williams *et al.* (2005), complétée par celle de Knutti *et al.* (2000) et Mari *et al.* (2012), les écoulements vaginaux peuvent être décrits comme suit : score 0 pour les vaches ne présentant pas d'écoulement, score de 1 pour un mucus clair, score de 2 pour un mucus trouble avec ou sans flocons de pus, score 3 pour des écoulements muco-

purulents, un score de 4 pour des écoulements purulents. Williams proposait de donner un score à l'odeur : score de 1 si fétide sinon, 0.

La présence d'écoulements vaginaux est mise en évidence de 3 façons différentes : la palpation vaginale, la vaginoscopie et le Metricheck®.

La palpation vaginale présente le gros inconvénient de devoir utiliser un gant lubrifié, ce qui amène à ne pas pouvoir mettre en évidence les animaux sans écoulements. Toutefois, l'avantage de cette technique est de pouvoir évaluer la quantité de liquide présent dans le vagin et de l'échantillonner de façon représentative (Williams *et al.*, 2005).

Le Metricheck® est un outil formé d'une tige en acier terminée par une cupule de silicone. Il est destiné à prélever un échantillon des sécrétions présentes dans le vagin. Il permet de faire rapidement un prélèvement vaginal mais la difficulté résulte dans la manipulation et la visualisation de cet échantillon dans la cupule. Lors du prélèvement, des petites bulles d'air se forment dans le mucus, ces bulles pourraient entraîner une erreur de lecture en masquant la présence de flocons de pus mais aussi, dans l'autre sens, en laissant penser que ceux sont des flocons de pus. De plus, le mucus trouble est plus difficilement visualisable. Pour cette raison, dans les études où cet instrument est utilisé, le mucus trouble n'est jamais mentionné (Dubuc *et al.*, 2010a; McDougall *et al.*, 2011; McDougall *et al.*, 2007; Runciman *et al.*, 2009; Senosy *et al.*, 2009).

La vaginoscopie permet de bien visualiser la paroi vaginale et la présence d'écoulement. Elle demande un peu plus de temps que le Metricheck®.

Pour le Metricheck® et les vaginoscopes réutilisables, le risque de propager des pathogènes entre les vaches est important. Il est donc nécessaire de pratiquer une désinfection adéquate entre les vaches pour des raisons de biosécurité.

La présence d'écoulements au niveau du vagin peut avoir comme origine le vagin, le col de l'utérus et l'utérus. Selon McDougall *et al.* (2007), 50% des animaux présentent des écoulements vaginaux contenant du matériel purulent lors de la première semaine PP, 40% la seconde, 35% la troisième et 20% la quatrième semaine PP.

La mise en évidence d'écoulements vaginaux est une méthode, qui comme la cytologie, est peu sensible (environ 20%) mais bien spécifique (90%) en lien avec les

performances en reproduction futures des vaches (Dubuc *et al.*, 2010a; LeBlanc *et al.*, 2002a; McDougall *et al.*, 2007).

Dans la définition proposée en 2006 par Sheldon *et al.* (2006), les écoulements vaginaux considérés comme pathologiques étaient muco-purulents et purulents à partir de 26 jours PP. Toutefois le stade flocons de pus a un impact négatif sur les performances en reproduction. À 28 jours PP, les vaches diagnostiquées avec des flocons de pus avaient un jour médian à la première insémination et un jour médian à la gestation significativement augmentés (Williams *et al.*, 2005). Dans l'étude de McDougall *et al.* (2007), l'examen réalisé à 35 jours PP, un effet significatif du grade flocons de pus était aussi observé.

L'observation des écoulements vaginaux a le même point faible que les techniques précédentes: une sensibilité faible pour prédire le risque de gestation et une spécificité relativement bonne. Une explication de la faible sensibilité des tests provient du fait que la gestation est dépendante d'un grand nombre de facteurs autres que la santé utérine. Il y a aussi le facteur temps entre le moment du diagnostic et la constatation du statut de gestation, qui est souvent long (supérieur à 30 jours) (Barlund *et al.*, 2008; Kasimanickam *et al.*, 2004; Leutert *et al.*, 2012). Le manque de spécificité est lui relié possiblement au facteur temps avec les guérisons spontanées [70% de guérisons cliniques ont été observées dans l'espace de 2 à 3 semaines pour les vaches ayant des écoulements muco-purulents à purulents vers 30 jours PP (Dubuc *et al.*, 2010a; LeBlanc *et al.*, 2002b)]. On peut aussi remettre en question la façon usuelle de catégoriser les animaux à l'aide d'un seuil et le moment où le diagnostic est posé. Les valeurs actuelles de spécificité entraînent l'utilisation de traitement sur des animaux qui n'en avaient pas besoin. Cette remarque est importante dans le cadre de l'usage raisonné des antibiotiques.

## 4.4 Échographie

L'échographie est une technique facile à mettre en place à la ferme et avec le temps, la technologie améliore ces appareils. Cette technique est utilisée pour mesurer différents paramètres au niveau de l'utérus. Cependant :

- L'épaisseur de l'endomètre utérin n'a pas pu être associée significativement à la présence d'une inflammation cytologique de l'endomètre, basée sur un seuil de 8% de PMN ou de 15% de PMN (Barlund *et al.*, 2008; Ghasemi, 2011).
- La grosseur du col de l'utérus mesuré entre 28 et 41 jours PP n'est pas différente dans les groupes de vaches réparties selon un seuil cytologique de l'endomètre de 15% de PMN (Ghasemi, 2011).
- La présence de liquide au sein de l'utérus entre 21 et 47 jours PP chez des animaux ne présentant pas d'écoulements vaginaux purulents, n'est qu'en faible concordance avec le statut cytologique de l'utérus (Kappa de 33%, sensibilité de 88% et spécificité de 62%) (Meira *et al.*, 2012). Si on ajoute la taille du col (seuil à 5cm) on obtient une sensibilité de 50% et une spécificité de 88% pour une faible concordance avec un kappa de 39% (Meira *et al.*, 2012).

L'utilisation de ces paramètres (épaisseur de l'endomètre et présence de liquide au sein de l'utérus) pour déterminer le statut de gestation à 150 jours PP, individuellement ou ensemble, donne une sensibilité faible de l'ordre de 20% et une bonne spécificité de l'ordre de 80% (Barlund *et al.*, 2008). La sensibilité et la spécificité semblent améliorées si les observations sont faites un peu plus tard en PP [entre 34 et 47 jours PP (Kasimanickam *et al.*, 2004) vs 28 à 41 jours PP (Barlund *et al.*, 2008)]

L'échographie, bien que facile à utiliser sur la ferme, ne permet pas de l'intégrer dans le cadre d'une surveillance en santé utérine. Son emploi pour déterminer la nécessité de faire un traitement à base de céfapirine entre 28 et 41 jours PP n'est pas recommandée (Ghasemi, 2011).

## 4.5 Palpation transrectale

La palpation transrectale du col de l'utérus en PP ne donne qu'un accord modéré avec la mesure effectuée par échographie, et cet accord diminue avec l'augmentation du diamètre du col (Leutert *et al.*, 2013). En référence à la définition proposée par Sheldon *et al.* (2006), les cols mesurés à l'échographie de la taille de 6 cm était classés lors de la palpation

transrectal dans la catégorie 7.5 cm et plus, ce qui donne donc des faux positifs à l'endométrite clinique (Leutert *et al.*, 2013).

La palpation transrectale de l'utérus n'a pas pu être associée avec le risque de gestation (LeBlanc *et al.*, 2002a).

## 4.6 Bactériologie

La bactériologie est réalisée sur des prélèvements effectués par biopsie ou par écouvillonnage. L'échantillon peut alors être mis en culture dans des conditions aérobies ou anaérobies. Un classement a été proposé pour les bactéries en fonction de leur pathogénicité en lien avec 1) la présence de lésions endométriales observées, 2) la présence de bactéries lors de cas d'endométrite sans être forcément associée à des lésions endométriales et 3) des contaminants opportunistes isolées dans l'utérus (Sheldon *et al.*, 2002; Williams *et al.*, 2005). Ainsi les bactéries considérées comme pathogènes sont *Trueperella pyogenes*, *E. coli*, *Fusobacterium necrophorum* et *Prevotella melaninogenicus*. À cette liste, (McDougall *et al.*, 2011) a ajouté *Proteus spp.*. De plus, *Bacteriodes spp.* a aussi été proposé comme bactérie pathogène (Bonnett, Martin, *et al.*, 1991; Mateus *et al.*, 2002b).

Parmi ces bactéries, dans plusieurs études, *T. pyogenes* est la seule bactérie à avoir été associée à des lésions endométriales, à la présence d'écoulements vaginaux purulents et à des performances en reproduction diminuées (Werner *et al.*, 2012; Wagener *et al.*, 2014; Williams *et al.*, 2005 ; Bonnett, Martin, *et al.*, 1991; Petit *et al.*, 2009; Prunner, Pothmann, *et al.*, 2014). Lors d'échantillonnage réalisé à la fois au niveau vaginal et cervical, *T. pyogenes* a plus souvent été mise en évidence dans les écouvillons du col de l'utérus que dans ceux du vagin (Petit *et al.*, 2009).

Jeremejeva *et al.* (2010) soulève dans son étude le fait que certaines des biopsies étaient négatives à la culture bactérienne alors que sur les lames cytologiques, il y avait des bactéries phagocytées et la présence d'inflammation. Il émet l'hypothèse de contamination possible de l'utérus par des mycobactéries ou des levures. Des levures ont aussi été rapportées en très faible proportion (< 2%) dans des écouvillons vaginaux, cervicaux et utérins (Petit *et*

*al.*, 2009). D'autres facteurs, comme le milieu de transport, les conditions de transport, l'intervalle de temps entre le prélèvement et la mise en culture, et aussi l'interaction entre les cellules et les bactéries de l'échantillon peuvent influencer la croissance bactérienne lors de la mise en culture.

## 5 Facteurs de risque de l'endométrite clinique

La prévalence d'endométrite clinique varie énormément selon les troupeaux (entre 5 et 26% d'endométrite clinique au sein d'un troupeau) et selon les études (entre 10 à 27% des animaux échantillonnés) (Barlund *et al.*, 2008; Dubuc *et al.*, 2010a; Gautam *et al.*, 2010; LeBlanc *et al.*, 2002a; McDougall *et al.*, 2013; Potter *et al.*, 2010; Prunner, Pothmann, *et al.*, 2014). La définition des conditions pathologiques, la terminologie, les outils de diagnostic, le nombre de jours PP auquel l'examen génital a été réalisé ainsi que les facteurs de risque particuliers aux troupeaux ou à la population étudiée peuvent expliquer cette grande variation. De nombreux facteurs de risque associés à l'endométrite clinique ont été étudiés (Dubuc *et al.*, 2010a; Gautam *et al.*, 2010; Potter *et al.*, 2010; Prunner, Pothmann, *et al.*, 2014). Ces études ont utilisé la même définition de l'endométrite clinique, c'est-à-dire, la présence de plus de 50% de matériel purulent dans les écoulements vaginaux.

Le développement des conditions pathologiques utérines dépend du fragile équilibre entre la pathogénicité de l'agent envahisseur, la réponse immunitaire (innée et adaptative) et l'environnement de l'hôte. L'étude des facteurs de risque devient primordiale pour comprendre la relation entre ces trois différents éléments dans le développement des conditions pathologiques utérine et pour l'établissement de programmes de prévention des infections utérines comme l'endométrite. Les études utilisant des définitions similaires de l'endométrite clinique basées sur l'évaluation des écoulements vaginaux, s'accordent sur le fait que la majorité des facteurs de risque sont des facteurs associés à l'animal et tout particulièrement à la parturition de la vache. Les facteurs les plus significatifs sont la rétention placentaire, l'assistance au vêlage, les veaux mort-nés, l'angle de la vulve, la naissance d'un veau mâle et la mise bas pour la première fois (Potter *et al.*, 2010). Dubuc *et al.* (2010b) a rapporté des facteurs similaires avec la dystocie, la mise bas de jumeaux, la métrite et

l'élévation de l'haptoglobine sérique (>0.8 g/L) dans la première semaine PP. La signification de ces facteurs était basée sur l'examen vaginal à 35 JEL alors que Potter *et al.*, (2010) a réalisé l'examen vaginal entre 21 et 28 jours PP. De façon similaire, la prévalence de l'endométrite clinique PP était associée à un vêlage anormal, à une rétention placentaire et aux complications PP (Gautam *et al.*, 2010). Pour ce dernier auteur, le temps PP auquel l'examen vaginal fut réalisé (10 à 60 JEL) et le troupeau étaient également des facteurs de variation. Dans les troupeaux de petite et moyenne dimension, Prunner *et al.* (2014) a rapporté l'assistance au vêlage, le gras dorsal et le type d'agent infectieux comme facteurs de risque de l'endométrite clinique. Dans ce cas particulier, le type d'étable, la saison du vêlage, la parité, le vêlage de jumeaux et la ferme n'ont pas affecté la prévalence de l'endométrite clinique.

## **6 Traitements des endométrites et leur efficacité**

Présentement, deux approches thérapeutiques principales sont proposées pour le traitement des vaches laitières aux prises avec une endométrite clinique ou des écoulements vaginaux purulents: l'utilisation d'antibiotiques (locaux ou systémiques) ou de prostaglandines (systémiques). La stratégie derrière l'utilisation des antibiotiques est de réduire la charge utérine de bactéries pour éventuellement réduire l'inflammation de l'endomètre (Bretzlaff, 1987). Pour sa part, l'utilisation de prostaglandines est liée à leur capacité de lutéolyser le corps lutéal et à induire un œstrus. L'œstrus est associé à une augmentation de la contractilité utérine et à la vidange du contenu utérin. L'œstrus stimule également l'immunité innée locale et prépare donc un milieu utérin favorable au développement de l'embryon et au maintien de la gestation.

Une autre approche est l'utilisation d'antiseptique intra-utérin qui vise à réduire la charge bactérienne intra-utérine et à favoriser ainsi la guérison, sans avoir à se soucier des retraits dans le lait ou la viande généralement associé à l'utilisation d'antibiotiques. Toutefois, les antiseptiques sont des molécules irritantes pour l'endomètre et ne sont généralement pas conseillés en période PP où l'intégrité de l'endomètre n'est pas encore complète. Pour ce qui est des autres stratégies comme les produits homéopathiques, les solutions hypertoniques, les

anti-inflammatoires, etc., très peu d'information est disponible et la majorité des études ne sont pas très bien planifiées.

Il existe plusieurs études sur le traitement de l'endométrite clinique de la vache laitière, mais la grande majorité souffre d'un mauvais protocole expérimental qui compromet la valeur des résultats et des conclusions. Le manque d'un groupe témoin, un petit nombre d'animaux par groupe, l'utilisation de différentes définitions de la condition pathologique utérine, l'absence de randomisation du traitement, le risque de conflits d'intérêts (financement par une compagnie privée), l'utilisation de paramètres basés sur la guérison clinique ou bactériologique et non pas les performances de la reproduction sont tous des points importants qui rendent l'interprétation des résultats difficiles (Lefebvre et Stock, 2012).

La guérison spontanée vient également compliquer les essais cliniques, car elle est généralement très élevée. Une guérison clinique spontanée de 77% (LeBlanc *et al.*, 2002b) et de 63% (Dubuc *et al.*, 2011) basée sur l'absence d'écoulements vaginaux muco-purulents ou purulents 14 et 21 jours après le premier examen vaginal, respectivement, ont été rapportées. Des résultats similaires ont été observés par Gautam *et al.* (2010), (75%) et Feldmann *et al.* (2005), (57.1%). Une guérison spontanée élevée reflète probablement le processus naturel de guérison de l'endométrite clinique, mais elle ne réduit pas l'importance du traitement parce que la résolution des écoulements vaginaux n'implique pas nécessairement un retour à une fertilité normale pour la vache.

Dans la littérature, plusieurs antibiotiques ont été évalués pour le traitement de l'endométrite, tels la céfapirine (Ghasemi, 2011; LeBlanc *et al.*, 2002b; Runciman *et al.*, 2008a), le céftiofur (Dubuc *et al.*, 2011; Galvao, Greco, *et al.*, 2009), la pénicilline G (Thurmond *et al.*, 1993), l'oxacilline (Feldmann *et al.*, 2005), l'oxytétracycline (Thurmond *et al.*, 1993) et l'ampicilline (Feldmann *et al.*, 2005). La pénicilline G est sensible à l'enzyme pénicillinase sécrétée par les bactéries normalement présentes dans l'utérus en période PP. *T. pyogenes* démontre une résistance à la pénicilline (plus de 80% de résistance) et la tétracycline (de l'ordre de 50%) (Santos *et al.*, 2010). De plus, il existe très peu de données sur l'efficacité de la pénicilline G comme traitement intra-utérin parce que l'antibiotique est généralement prescrit pour une utilisation intramusculaire. Historiquement, l'oxytétracycline intra-utérine a été utilisée comme traitement de l'endométrite chez la vache laitière. Toutefois son absorption



par l'endomètre est faible et la molécule représente un risque important comme résidu dans le lait et la viande des animaux traités en plus de causer une irritation et même une nécrose de l'endomètre (Black *et al.*, 1979; Gilbert *et al.*, 1992). Le ceftiofur est une céphalosporine de 3e génération à large spectre utilisée systémiquement ou localement (produit mammaire) pour traiter l'endométrite clinique. Lorsque la molécule a été utilisée chez des vaches à 44 jours en lait et avec une endométrite, une guérison bactériologique a été observée, mais aucune amélioration des performances de la reproduction n'a été mesurée (Galvao, Greco, *et al.*, 2009). Pour ce qui est de l'ampicilline associée à l'oxacilline comme thérapies intra-utérines chez des vaches avec une endométrite clinique, aucun effet positif sur les performances reproductrices n'a pu être mesuré (Dubuc *et al.*, 2011; Feldmann *et al.*, 2005). En résumé, de tous ces antibiotiques, seulement la céfapirine a démontré un effet positif sur la reproduction de la vache laitière, aussi bien pour le système de mise à la reproduction à l'année (comme au Canada) que pour le système de mise à la reproduction saisonnier (comme en Nouvelle Zélande). Toutefois, la comparaison des résultats provenant des différentes études est difficile à cause de la différence entre les indices reproducteurs utilisés et les types d'élevage.

## 6.1 Traitements homologués

### 6.1.1 Céfapirine

En 1976, la céfapirine est proposée pour le traitement des mammites (Christie *et al.*, 1976). La molécule est utilisée pour les irrigations lors de césarienne chez la femme pour diminuer les complications post-chirurgicales (Levin *et al.*, 1983), En 1986, la céfapirine a été utilisée dans une étude sur l'endométrite post césarienne chez la femme. Elle a permis de diviser par 2 le nombre d'endométrite par rapport au placebo (Dashow *et al.*, 1986). En médecine vétérinaire, elle a été utilisé au moins depuis 1996 en infusion intra-utérine (Sutton *et al.*, 1996).

La céfapirine benzathine est une céphalosporine semi-synthétique de première génération. C'est un antibiotique bactéricide à large spectre actif sur les bactéries Gram+, anaérobies et Gram- sensibles, en milieu aérobie et anaérobie. Elle est active contre les

bactéries produisant des Béta-lactamases. La céfapirine benzathine utilisée par voie intra-utérine est une solution huileuse contenant 500 mg de céfapirine. Elle diffuse bien au sein du tissu endométrial avec des concentrations rapportées de 66 mg/kg 24 h après infusion (et le double à 6 h post-infusion si la dose utilisée est double) (EMEA/MLR/745-00). Au niveau plasmatique, la concentration de céfapirine est faible et n'est plus détectable après 24 h. Elle est éliminée par filtration rénale. L'urine ne contient plus de substance détectable après 24 h.

Les bactéries retrouvées lors d'endométrite ont des valeurs de concentration inhibitrice inférieures à la concentration de céfapirine mesurée 24 h après infusion (Sheldon, Bushnell, *et al.*, 2004). L'infusion de céfapirine intra-utérine amène des concentrations > 0.25 ug / ml dans le tissu endométrial pour 3 jours (McDougall, 2001). À ce seuil, on retrouve des concentrations minimales inhibitrices (CMI) inférieure pour l'ensemble des souches testées de *T. pyogenes*, pour plus de la moitié des souches de *Fusobacterium* et de *Prevotella* (13 sur 22 souches testées). La résistance *in vitro* de *T. pyogenes* face à la céfapirine est de 20% (Malinowski *et al.*, 2011). Dans cette étude, cet antibiotique demeure inefficace contre quasi toutes les souches de la bactérie *E. coli*.

Malgré que la céfapirine benzathine soit le seul antibiotique homologué pour le traitement de l'endométrite chez la vache laitière au Canada, il demeure néanmoins certaines questions. En général, il y a peu d'études sur l'efficacité de cet antibiotique sur les infections du système reproducteur femelle. Il est difficile de faire une analyse exhaustive et comparative de ces études dû à un manque de standardisation des définitions des conditions pathologiques traitées et des paramètres utilisés pour déterminer l'efficacité du traitement (guérison clinique, bactériologique et fonctionnelle). La perspective et le but ultime du traitement utérin étant le retour à une fertilité normale mesurée par des paramètres fiables de performance de la reproduction.

L'efficacité d'un traitement intra-utérin de céfapirine sur l'endométrite au sens générale reste controversée. Les études portant sur l'endométrite cytologique ont eu des résultats non significatifs (Ghasemi, 2011; Kasimanickam *et al.*, 2005b; LeBlanc *et al.*, 2002b; Mari *et al.*, 2012; McDougall, 2001; McDougall *et al.*, 2013; Runciman *et al.*, 2009; Runciman *et al.*, 2008a; Violas, 2012). L'effet bénéfique sur la reproduction a été noté par les études de Leblanc sur la proportion cumulative d'animaux gestants et par les études de

Runciman sur la proportion d'animaux gestants à 6 et 21 semaines après le début de la saison de reproduction. Dans l'étude de Mari *et al.* (2012), un effet bénéfique a été noté sur le score d'endométrite basée sur la somme de divers examens diagnostics, 3 à 4 semaines après l'administration. Dans l'étude de McDougall (2001), l'effet de la céfapirine est significatif sur les animaux ayant présentés des écoulements vulvaires, pour la proportion d'animaux gestants à 4 et 8 semaines après le début de la saison de reproduction. Il a aussi été proposé que l'effet bénéfique de la céfapirine dépende du moment de l'administration en PP. Mais là aussi, les résultats sont controversés. Certaines études rapportent une efficacité, sur les performances en reproduction, de la céfapirine avant 28 jours PP (Runciman *et al.*, 2009; Runciman *et al.*, 2008a), alors que d'autres suggèrent une meilleure efficacité après 28 jours PP (LeBlanc *et al.*, 2002a). Ces résultats pourraient être associés à des points circonstanciels d'élevage (mode extensif ou intensif d'élevage). D'autres études présentent des biais de suivi (répétition de traitement non contrôlé) qui rendent l'interprétation des résultats plus difficile (LeBlanc *et al.*, 2002a). De plus, plusieurs études portent leurs attentions sur le traitement de l'endométrite sans préciser le statut utérin.

### **6.1.2 Prostaglandines F2 $\alpha$**

Les prostaglandines F2 $\alpha$  (PGFs) sont des hormones endocrines capable de produire la lutéolyse du corps lutéal (Poyser, 1995; Wright *et al.*, 1992) et des contractions utérines (Hirsbrunner *et al.*, 1998; Lindell *et al.*, 1983). En causant la lyse du corps lutéal, les PGFs éliminent la progestérone et son effet inhibiteur sur le système immunitaire (Lewis, 2003).- En absence de progestérone, les PGFs favorisent la sécrétion de leucotriènes B4 par l'utérus qui supportent à leur tour le chimiotactisme, la cytotoxicité et la phagocytose par les cellules immunitaires, en plus d'améliorer la fonction des lymphocytes (Hoedemaker, 1998). Avec ces fonctions, les PGFs favorisent l'involution utérine en réduisent l'infection et l'inflammation utérine chez la parturiente (Slama *et al.*, 1993).

Malgré des avantages théoriques et pratiques évidents (produit non dispendieux et facilement utilisable à la ferme) et son utilisation intensive dans les 2 dernières décennies, l'efficacité des PGFs pour le traitement des endométrites cliniques chez la vache laitière en

période PP reste à préciser. Burton *et al.* (1995) a démontré que l'utilisation systématique en période PP sur 6696 vaches n'était pas associée à un meilleur taux de conception à la première insémination même si le nombre de jours ouverts était réduit. Plus récemment, LeBlanc *et al.* (2002b) et Dubuc *et al.* (2011) ont institué une double injection de PGFs entre 20 et 33 jours PP et 35 et 49 jours PP respectivement dans un essai clinique sans pour autant démontrer une amélioration des performances reproductrices chez les vaches avec une endométrite clinique. De multiples injections de PGFs à 7 et 14 jours PP en plus d'un protocole de synchronisation Presynch-Ovsynch n'ont démontré aucun avantage pour les vaches souffrant d'une endométrite clinique (Hendricks *et al.*, 2006). Dernièrement, McDougall *et al.* (2013), a démontré que le traitement de PGFs en période PP dans un système de vêlage saisonnier était aussi valable que le traitement de céfapirine. Toutefois, dans cette étude, l'effet négatif des écoulements vaginaux sur les performances de la reproduction n'a pas été évalué à cause de l'absence d'un groupe contrôle.

## 6.2 Traitement alternatif de l'endométrite clinique

Dans un soucis de réduire le risque de résistance aux antibiotiques ou de réduire le risque de résidus dans le lait ou la viande, des essais de traitements alternatifs aux traitements homologués ont été proposés.. Comme dans la situation de l'endométrite où le diagnostic et le traitement de la condition sont mal définis, les éleveurs sont plus portés à utiliser des traitements alternatifs. Quel que soit la raison d'utiliser des traitements alternatifs, très peu d'évidences scientifiques supportent leur utilisation.(Arlt *et al.*, 2009).

Le traitement homéopathique repose sur 3 lois principales : la loi de similitude (le semblable guérit le semblable), la loi de l'individualisation (le malade est traité et non la maladie), et la loi des hautes dilutions (la dilution et la dynamisation des remèdes potentialisent l'effet curatif). Les vaches traitées (n=929) avec la *lachesis compositum* (*Lachesis*), la *cardus compositum* (*Carduus*) et la *Traumeel LT* (*Traumeel*) 24 h après le vêlage ont démontré la même prévalence d'endométrite clinique que les vaches du groupe témoin et la même proportion de vaches cycliques entre 12 et 27 jours PP (Arlt *et al.*, 2009).

Principalement, deux types d'antiseptiques ont été utilisés comme traitement intra-utérin en période PP chez la vache laitière : les dérivés iodés (solutions à 2% de polyvinyl-pyrrolidone-iode ou de Lugol) (Nakao *et al.*, 1988; Putro, 1988) et le Lotagen<sup>®</sup> (solution de polycrésulène, utilisé à 2 ou 4 %) (Feldmann *et al.*, 2005; Tenhagen *et al.*, 1999). La solution de Lugol semble plus irritante pour l'endomètre que la solution d'iode. Ces solutions sont antibactériennes, créent une irritation et une hyperémie locales de l'endomètre tout en provoquant un appel de leucocytes (Robert, 1986). Les vaches (n = 531) traitées avec la solution à 2% de polyvinyl-pyrrolidone-iode n'ont pas démontré de meilleures performances reproductrices (taux de conception au premier service, taux de conception à 180 JEL, intervalle vêlage-conception) comparativement au groupe de vaches (n = 474) non traitées (Nakao *et al.*, 1988) La prévalence d'endométrite (écoulement vaginal) était équivalente pour les deux groupes de vaches avec 18.5% et 18.4% respectivement. Toutefois, les vaches souffrant d'une endométrite et traitées avec la solution d'iode ont démontré des performances réduites de la reproduction comparativement à celles traitées mais sans endométrite. Pour la solution de Lugol, les effets sur les performances reproductrices n'ont pas été étudiés (Putro, 1988). De plus, l'utilisation de dérivés iodés par la voie intra-utérine (60 ml de Lugol 10 %) entraîne une augmentation significative d'iode dans le lait (avec une durée de vie moyenne de 4 jours) (Carleton *et al.*, 2008; McCaughan *et al.*, 1984). Les quantités d'iode retrouvées dans le lait d'une vache traitée ne peuvent être considérées comme inoffensives pour un enfant jusqu'à 5 à 6 jours après le traitement en se basant sur les besoins journaliers recommandés (Carleton *et al.*, 2008).

En ce qui concerne les études sur le Lotagen<sup>®</sup>, il n'y a pas d'amélioration dans la guérison clinique ni dans les performances en reproduction par rapport à un groupe contrôle chez des vaches ayant des signes d'endométrites cliniques (Feldmann *et al.*, 2005). Il n'y a pas non plus d'amélioration sur les performances en reproduction par rapport à un groupe d'animaux ayant reçus un traitement de PGF (Feldmann *et al.*, 2005; Tenhagen et Heuwieser, 1999).

Des substances hypertoniques intra-utérines comme des solutions à 50% dextrose ont été proposées comme traitement pour l'endométrite clinique (Brick *et al.*, 2012). Ces solutions hypertoniques à base d'un sucre sont utilisées pour 3 raisons. 1) La première raison est que le

sucre est un composant important dans les interactions cellulaires. Dans une étude *in vitro*, le mannose interfère directement avec l'adhésion des bactéries de type *E. coli* sur les cellules endométriales de la jument (King *et al.*, 2000). 2) Ensuite, l'action hypertonique du sucre inhibe la croissance des bactéries comme dans le cas des plaies ouvertes contaminées avec l'*E. coli* (Chirife *et al.*, 1983). 3) Et enfin, l'action hypertonique induit également un appel de fluide dans la lumière utérine qui favorise le drainage lors que le col utérin est ouvert. Comme *E. coli* est une bactérie importante dans les infections utérines PP, ce type de solution pourrait avoir un certain avantage. L'utilisation d'une solution à 50 % de dextrose chez les vaches avec une endométrite clinique permet une guérison clinique (moins d'écoulements vaginaux) 14 jours après le traitement. Sur le plan des performances en reproduction, même si le traitement de dextrose 50 % améliore le nombre de jour ouvert médian par rapport à un traitement de céftiofur systémique (- 19 jours) ou par rapport au groupe contrôle (- 18 jours), les améliorations ne sont pas statistiquement significatives (Brick *et al.*, 2012).

Un mélange d'enzymes protéolytiques (Drillich *et al.*, 2005) a été étudiées pour traiter l'endométrite clinique chez les vaches laitières en période PP sans succès en termes de performance de la reproduction.

## **7 Essai clinique pour évaluer l'efficacité du traitement de céfapirine intra-utérin sur l'endométrite clinique :**

### **Rigueur du protocole expérimental.**

Compte tenu de l'importance des protocoles expérimentaux dans les essais cliniques et pour mettre en relief les points forts du protocole expérimental de la présente étude, une critique rigoureuse et pointue de certaines études cliniques (n = 6) du présent antibiotique est nécessaire. Cette étude prend toute son importance dans la situation globale où le médecin vétérinaire doit optimiser non seulement l'efficacité des traitements, mais aussi privilégier les modalités pratiques d'usage des antibiotiques dans le contexte du point de vue de l'émergence et de la diffusion de la résistance.

L'essai clinique très souvent repris est l'étude de LeBlanc *et al.* (2002b). Dans cette étude, les animaux ont été diagnostiqués à l'aide de la vaginoscopie. La classification utilisée ne met pas en évidence les écoulements de mucus trouble ni l'absence d'écoulement. Le premier diagnostic a lieu entre 20 et 33 jours PP, les animaux considérés comme positifs (écoulements muco-purulents ou purulents, n = 316) ont été assignés de façon aléatoire à un traitement ou au groupe « contrôle ». Lors d'un réexamen, 2 semaines plus tard, tous les animaux, y compris ceux du groupe contrôle, qui présentaient des écoulements muco-purulents ou purulents ont reçu un traitement. Et ces animaux ont été revus et de nouveau traités 2 semaines plus tard si les écoulements persistaient. Toutefois, aucun des animaux retraités n'a été exclu ou considéré différemment des autres animaux faisant partie de leur groupe initial. Selon les données de l'étude, il y a avait 77 % de guérison clinique entre les deux examens et il n'y avait pas de différence entre les groupes pour cet aspect. Ce qui permet d'envisager que près d'une vache sur 4 du groupe contrôle a reçu au moins un traitement. Il est dès lors difficile de parler d'un vrai groupe contrôle négatif (sans animaux traités). Il y a aussi eu répétition du traitement pour une partie des animaux. Pour évaluer l'efficacité du traitement, la guérison clinique et les performances en reproduction ultérieures ont été analysées. Or, les performances en reproduction utilisées dans cette étude (jours médians à la 1<sup>re</sup> insémination, risque de gestation à la 1<sup>re</sup> insémination, risque de gestation à 120 jours PP, jours ouverts médians, nombre d'inséminations par gestation) sont dépendantes des différentes régies dans les 27 troupeaux enrôlés. Les faiblesses de cette étude sont donc, le manque d'un réel groupe contrôle négatif, le manque d'homogénéité dans le traitement, l'absence d'étude de l'effet d'un traitement sur tous les écoulements vaginaux, et enfin le manque de standardisation de la régie de reproduction. Les points forts sont l'analyse complète des performances en reproduction. Il est aussi intéressant de noter le souci d'évaluer l'effet différent d'un traitement selon le moment d'administration soit avant ou après 30 jours PP. Mais pour cet aspect, il faut se rappeler qu'il y a eu répétition de traitements pour certains animaux et il aurait alors été plus précis de ne pas retraiter ces animaux. L'effet potentiellement différent du traitement en fonction de la présence ou non d'un corps lutéal palpable est aussi intéressant. Dans cette étude, le groupe présentant des écoulements muco-purulents et purulents bénéficie d'un traitement de céfapirine si l'application se fait après 30 jours PP et en présence d'un corps lutéal palpable. En faisant des sous-catégories, le nombre

d'animaux disponibles pour l'analyse diminue dans chaque groupe, la puissance statistique diminue et les conclusions sont donc à nuancer.

Dans l'étude suivante (Mari *et al.*, 2012), le diagnostic de l'endométrite clinique est basé sur la somme de scores des différents examens diagnostics (l'échographie, la bactériologie, la vaginoscopie et la palpation transrectale). Les animaux ont été répartis de façon aléatoire au groupe traitement ou au groupe contrôle. Le groupe contrôle a reçu un excipient sans un principe actif. Le diagnostic a été réalisé à  $103 \pm 63$  jours PP en moyenne. Un réexamen a été réalisé à  $115 \pm 60$  jours PP en moyenne. Lors du réexamen, un établissement du score d'endométrite a été établi en fonction des divers examens diagnostics précédemment cités, et des analyses statistiques ont été réalisées sur ces observations afin d'évaluer l'efficacité du traitement. Les points forts de cette étude sont notamment le fait d'avoir considéré les écoulements de mucus trouble dans l'examen vaginal. Ces écoulements faisaient partie de la catégorie regroupant la présence d'écoulements troubles ou la présence de flocons de pus dans la présente étude. L'administration d'un excipient aux animaux du groupe contrôle est un point très intéressant, car il permet de réaliser une étude à l'aveugle. Les faiblesses de cette étude portent sur l'échantillonnage. Le nombre d'animaux dans chaque groupe varie de 24 à 30, ce qui est un facteur limitant lors de l'analyse de données. De plus, un critère d'inclusion était un résultat positif à la bactériologie pour une bactérie considérée comme pathogène. Or, les bactéries retenues sont *T. pyogenes*, *E. coli*, *Streptococcus spp* et *Pasteurella spp*. Il n'est pas fait mention de bactéries anaérobies. Est-ce par absence d'une culture bactériologique en milieu anaérobie ou bien est-ce par absence de ces bactéries. Par ce critère, un tiers des animaux échantillonnés ont été exclus des analyses. La période à laquelle l'examen a été réalisé s'étale sur un intervalle très grand de jours PP. Ceci a pour effet de faire chevaucher les périodes du premier examen et du second. Une autre faiblesse de l'étude concerne l'absence d'association avec les données de reproduction des animaux.

Ensuite viennent quatre études qui ont été réalisées dans des élevages avec une période de reproduction saisonnière. À la grande différence avec le mode de reproduction utilisé dans l'élevage laitier en Amérique du Nord, les traitements vont être effectués selon le début de la période de reproduction et non pas selon le stade de lactation de l'animal (McDougall, 2001; McDougall *et al.*, 2013; Runciman *et al.*, 2009; Runciman *et al.*, 2008a).



Dans l'étude de Mc Dougall *et al.* (2013), les vaches avaient reçu un traitement entre 14 et 300 jours PP. Mais dans ce mode de régie, les vêlages sont regroupés, avec comme but d'avoir des vaches vêlées et proche de la fin de leur période d'attente volontaire au début de la saison de reproduction. Ce qui amène donc, que la médiane des animaux ayant reçu un traitement se trouvait être à 30 jours PP. Dans cette étude, le défaut majeur est le même que dans la 1<sup>re</sup> étude : le manque d'un vrai groupe contrôle négatif, sans traitement. En effet, un groupe a reçu un traitement de céfapirine et l'autre recevait en fonction de la présence d'un corps jaune palpable, soit des PGFs soit de la céfapirine. Il n'y avait donc pas de groupe non traité pour comparer la possible efficacité d'un traitement. Étant donné que 25% des animaux avaient un corps jaune, la comparaison s'est donc faite entre un groupe traité où 100% des animaux ont reçu de la céfapirine et un 2<sup>e</sup> groupe où 75% des vaches ont reçu de la céfapirine. Les 25% des vaches restantes ont reçu des PGFs. L'absence de différence entre les deux groupes n'est donc pas surprenante vu que 75% des animaux de chaque groupe ont reçu le même traitement.

Deux études de Runciman *et al.* (2008 et 2009), sont réalisées dans un mode d'élevage avec une période saisonnière de reproduction. Ces 2 études reprennent la même population analysée, mais avec un échantillonnage différent pour la 2<sup>e</sup>. Parmi les points forts de ces études, le traitement est appliqué de façon aléatoire aux vaches enrôlées, peu importe les écoulements vaginaux. Ceci a pour intérêt d'avoir des groupes contrôles pour les comparaisons. L'évaluation de l'efficacité du traitement est basée sur les performances en reproduction. Dans l'étude de 2008, les analyses d'efficacité se font sur l'ensemble de la population et sur les sous-populations formées par les animaux à risque de développer ou présentant de l'endométrite (rétention placentaire, dystocie, veau mort-né, fièvre vitulaire, gémellité, vêlage induit, ou présence d'écoulements vaginaux contenant du matériel purulent après 7 jours PP ) et par le groupe formé des autres animaux, considérés comme négatifs à l'endométrite. Les analyses sont aussi effectuées en prenant compte de l'intervalle entre le vêlage et l'administration du traitement. Cet intervalle était en moyenne de 6 semaines avec une déviation standard de 2 semaines. Toutefois, les animaux pouvaient recevoir le traitement dès le 7<sup>e</sup> jour PP. Le protocole est intéressant et le nombre d'animaux enrôlés (n = 945) est conséquent. Mais, les analyses faites sur les données du groupe d'animaux à risque

d'endométrite (n = 222) comparent parfois des groupes contenant une vingtaine d'individus, ce qui ne permet pas de conclure sur certains résultats observés. Dans l'étude de 2009, les analyses ont été faites sur l'échantillon d'animaux ayant reçu un traitement entre 7 et 27 jours PP. L'utilisation d'antibiotique requiert de cibler les animaux afin de ne pas surtraiter au risque de développer des résistances. Dans ce cas-ci, il serait utile de savoir si une application de céfapirine est aussi bénéfique pour chaque semaine PP.

Enfin, l'étude de McDougall (2001) est également réalisée dans un système de mise à la reproduction saisonnière, porte sur des animaux qui ont présentés, selon les éleveurs, des vèlages gémellaires, des dystocies, des veaux mort-nés, des fièvres vitulaires, des rétentions placentaires ou bien des écoulements vulvaires après 13 jours PP. Ces animaux ont été répartis dans un groupe traitement ou un groupe contrôle environs 6 semaines avant la saison de reproduction. Le traitement a été administré entre 14 et 107 jours PP (moyenne à 41 jours PP). L'efficacité du traitement de céfapirine a été analysée en fonction des performances en reproduction. Parmi le groupe des animaux avec des écoulements vulvaires notés par l'éleveur (n = 96), le traitement améliorait de façon significative les performances en reproduction. Dans cette étude, les écoulements vaginaux ont été notés pour un petit groupe, mais ils n'ont pas été utilisés à des fins d'analyse d'efficacité du traitement. Il aurait été intéressant d'avoir les intervalles entre le moment où les écoulements vulvaires ont été notés et le moment où le traitement a été appliqué. Dans le cadre d'une utilisation raisonnée des antibiotiques, il est nécessaire de se poser la question du moment optimal en PP pour l'utilisation de cet antibiotique.

## 8 Problématique

Compte tenu de l'importance significative des pertes de performances en reproduction associées aux écoulements vaginaux chez les vaches laitières en période postpartum, le besoin d'un traitement efficace est évident. Étant donné que la définition de la condition pathologique d'endométrite clinique proposée en 2006 (Sheldon *et al.*, 2006), présente un manque de précision sur la catégorisation des écoulements vaginaux (absence du grade de mucus trouble et non-différenciation entre l'absence d'écoulement et la présence d'un écoulement de mucus clair) et ne se base pas sur les performances en reproduction d'un réel groupe témoin (présence d'écoulement et absence de quelconque traitement jusqu'à la première insémination), une étude prenant en compte ces divers aspects est nécessaire. Comme la grande majorité des traitements proposés, soit systémiques, soit locaux, se sont avérés inefficaces dans un système de production annuel, il devient impératif de soumettre une étude avec un protocole expérimental plus rigoureux et des prélèvements plus minutieux. L'approche de traitement intra-utérin homologué avec une meilleure concentration d'antibiotique au niveau de l'endomètre pour aider la guérison bactériologique et ainsi couper le cycle de l'inflammation chronique, devrait être la meilleure approche pour obtenir les meilleures chances de traiter l'endométrite clinique en période postpartum et réduire la diffusion de résistance à l'antibiotique proposé.

## 9 Hypothèse

Un traitement antibiotique pourrait améliorer la santé du tractus génital des vaches en post-partum et ainsi améliorer les performances en reproduction.

## 10 Objectifs :

Tester l'efficacité de l'application intra-utérine de céfapirine avant un protocole de synchronisation de l'ovulation chez la vache laitière présentant des écoulements vaginaux

purulents sur le risque de gestation à la première insémination et sur les performances en reproduction globale des 300 premiers jours en lactation.

Définir la condition pathologique d'endométrite clinique par l'étude des performances en reproduction à 120 jours en lait des différentes catégories d'écoulements vaginaux d'animaux n'ayant pas reçu le traitement de céfapirine.

Évaluer la guérison clinique, et l'utilité de ce paramètre en le confrontant aux performances en reproduction des animaux ayant reçu le traitement de céfapirine et des animaux témoins.

Évaluer la présence de bactéries aérobies sur la condition pathologique d'endométrite clinique.

## **Article 1**

**Effectiveness of intrauterine treatment of purulent vaginal discharge with cephalosporin in dairy cows: A randomized clinical trial**

**Effectiveness of intrauterine treatment of purulent vaginal discharge with cephalosporin in dairy cows: A randomized clinical trial**

N. Tison, E. Bouchard, L. DesCôteaux, R.C. Lefebvre

Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal,  
Saint-Hyacinthe, Quebec, Canada

Corresponding author:

Rejean C. Lefebvre

Faculté de médecine vétérinaire

Université de Montréal

C. P. 5000

St-Hyacinthe, QC J2S 7C6

Tel.: 450-773-8521, ext. 8514

Fax: 450-778-8120

## Abstract

The objective of this study was to assess the efficacy of cephalosporin intrauterine treatment preceding a timed AI protocol in lactating dairy cows with purulent vaginal discharges (PVD). Holstein dairy cows (n=1247) from 18 herds were enrolled in a controlled randomized clinical trial. At 34 days in milk (DIM,  $\pm 7$  days), cows had a genital examination (transrectal palpation, vaginoscopy and uterine bacteriology). A second examination was made 2 weeks later. At the first examination, cows were randomly assigned to either the control group (CONT) or the treatment group (CEPH) consisting of one intrauterine infusion of 500 mg cephalosporin benzathine (Metricure<sup>®</sup>, Merck Animal Health, Montreal, Canada). All cows were systematically enrolled in a Presynch-Ovsynch synchronization protocol for the first insemination. Cows that received any systemic or local antibiotics from 10 days before sampling to the end of the synchronization protocol were excluded from the study. Reproductive data of cows were collected for at least 300 DIM, entered in a databank and validated (health record management software, DSAHR). Pregnancy diagnosis was done by transrectal palpation at the routinely scheduled veterinarian visits. Based on the highest sum of sensitivity and specificity for pregnancy status at 120 DIM, the optimal cut-off for vaginal discharge was the presence of cloudy discharge with or without purulent material (PVD+, score 2). With a prevalence of 21.6% at 34 DIM, PVD + was detrimental to first service conception rate (FSCR) (PVD+: 26%  $\pm$  5; PVD-: 40%  $\pm$  3; P = 0.02). The negative effect of PVD+ was indicated by a hazard ratio of 0.72 (chi-square = 8.58, p < 0.01, 95% CI = 0.56 to 0.91). Treatment with cephalosporin was associated with a significant improvement in FSCR in PVD+ cows (PVD+CEPH: 36%  $\pm$  5, PVD+CONT: 23%  $\pm$  5; P < 0.05). Cephalosporin treatment did not produce a significant clinical cure as assessed 14 days following intrauterine treatment.

Thus, a longer period of time following treatment may be needed to properly assess the efficacy of intrauterine treatment in cows with purulent vaginal discharge. In conclusion, cephalixin intrauterine treatment in PVD+ cows at 34 DIM significantly improves reproductive performance compared to untreated PVD+ cows.

Key words: dairy cows, endometritis, vaginal discharge, cephalixin

## 1. Introduction

Reproductive performance in dairy cows (Sheldon *et al.*, 2006) and farm economic efficiency (Bartlett *et al.*, 1986; Drillich *et al.*, 2001; Overton et Fetrow, 2008) are related to uterine health status at the end of the voluntary waiting period. Uterine diseases affect about half of all dairy cows in the post-partum (PP) period (Klucinski, Targowski, Winnicka et Miernikdegorska, 1990; LeBlanc, 2008), causing infertility by disrupting uterine and ovarian functions (Williams *et al.*, 2005). In the last decade, uterine diseases have generally been defined based on their clinical presentation and effect on fertility (Sheldon *et al.*, 2006). The prevalence of clinical endometritis in PP cows is about 20% (Dubuc *et al.*, 2011). Clinical endometritis is defined as an inflammation of the endometrium in a normal-sized uterus, associated with purulent vaginal discharge (PVD) after 21 days in milk (DIM), or mucopurulent discharge after 26 DIM in the absence of any systemic clinical disease. Based on risk factors and the low correlation between PVD and endometrial inflammation as measured by endometrial cytology, some researchers have proposed that PVD replace the term clinical endometritis (Dubuc *et al.*, 2010a). In general, PVD is associated with a *Trueperella pyogenes* infection in the uterus (Williams *et al.*, 2005). Although testing for vaginal discharge



is an indirect method of diagnosing inflammation and uterine infection, the presence of purulent discharge in the anterior vagina or vaginal opening of the cervix has been consistently associated with reduced fertility in dairy cows (Kasimanickam *et al.*, 2005b; Kaufmann, Westermann, *et al.*, 2009; LeBlanc *et al.*, 2002a; Runciman *et al.*, 2009). However, while the effect of PVD on fertility is well known, there is still considerable controversy about how to best treat the underlying endometrial condition (Lefebvre et Stock, 2012).

Historically, two major therapeutic approaches have been used to treat endometritis: antibiotics (intrauterine or systemic) and prostaglandins (PGF<sub>2</sub>  $\alpha$ , systemic). Treatment efficacy appears to vary depending on the type of antibiotic used, the calving-treatment interval, the severity of endometrial inflammation, and ovarian status (Lefebvre et Stock, 2012). Antibiotics are assumed to reduce bacterial loads in the uterus and, indirectly, diminish inflammation in the endometrium (Bretzlaff, 1987). Antibiotics are the main treatment prescribed to treat endometritis in dairy cows (Lefebvre et Stock, 2012), with the intrauterine route the most widely recommended treatment protocol (LeBlanc *et al.*, 2002, Drillich *et al.*, 2005, Runciman *et al.*, 2008). The systemic approach has not been well studied. A study of the intramuscular administration of oxytetracycline has shown that this antibiotic reaches the endometrial tissue as required (Masera *et al.*, 1980). The use of subcutaneous ceftiofur crystalline free acid on endometritis cows at 26 DIM did not improve the reproductive performance (Brick *et al.*, 2012).

Prostaglandins (PGF<sub>2</sub> $\alpha$ ) are also used to treat endometritis (Haimerl *et al.*, 2012). They cause luteolysis of the corpus luteum and induce estrus, thereby increasing uterine contractility and subsequent clearance of the uterine cavity. During estrus, the local immune response

prepares the uterine environment so that it can eventually support embryo development (Hill *et al.*, 2008) and the establishment of pregnancy. Although many reports on this type of treatment for PVD can be found in the literature, its efficacy is still a matter of some debate (Haimerl *et al.*, 2012). Kauffmann *et al.* (2010) showed that ceftiofur was as effective as prostaglandins at treating clinical endometritis. However, the effects of PGF2 $\alpha$  and antibiotics are often confounded in studies (Lefebvre et Stock, 2012). In general, the lack of negative controls, the small number of animals per treatment, the use of multi-level experimental designs, the use of different case definitions, and the use of outcome parameters based on clinical cure instead of reproductive performance all make it difficult to assess the best evidence-based therapeutic approach.

We compared the clinical cure rate and first service conception rate (FSCR) for cows with PVD treated with an intrauterine infusion of 500 mg cephalixin benzathine with non-treated cows, both groups being submitted to a Presynch-Ovsynch systematic synchronization protocol. We hypothesized that PP dairy cows with purulent vaginal discharge treated with intrauterine cephalixin would demonstrate a clinical cure and show improved reproductive performance.

## **2. Materials and methods**

All procedures conformed to national guidelines for the care and use of laboratory animals and were approved by the institutional animal care committee of the University of Montreal

## *2.1 Herds, facilities and feeding management*

A total of 18 different commercial dairy herds located in Quebec (Canada) were recruited based on convenience. Herds size was from 40 to 250 lactating cows. The reproductive and health data were entered in a databank with health record management software (DSAHR). The rolling herd average milk production was 9900 kg. Cows from free stall barns (n = 2) were milked thrice daily and cows from tied stall barns (n = 16) were milked twice daily. Cows were fed a total mixed ration formulated mainly with corn and hay silage to meet the dietary requirements for a lactating dairy cow (NRC, 2011). From these selected herds, 1247 Holstein cows were enrolled in a controlled randomized clinical trial.

## *2.2 Treatment description and group allocation*

All cows were systematically enrolled in a synchronization protocol (Presynch-Ovsynch using dinoprost tromethamine and gonadorelin injection; Lutalyse<sup>®</sup> and Factrel<sup>®</sup>; Zoetis Animal Health) at first exam (EXAM1) at 34 ( $\pm$  7) DIM (Figure 1). After genital examination, the cows were randomly assigned to one of two treatments: administration of an intrauterine infusion of cephalosporin (CEPH, n = 642) (Metricure, 500 mg cephalosporin benzathine; Merck Animal Health, Montreal, Canada) or a control group (CONT, n = 605). We did not add a sham treatment because of the large sample size and the fact that farmers could not distinguish between treated and non-treated cows. Cephalosporin is currently the only intrauterine antibiotic approved in Canada for the treatment of uterine infection. The cows were examined and a uterine sample taken 2 weeks later at the second exam (EXAM2) at 48 ( $\pm$  7) DIM. Reproductive data for the cows were collected for at least 300 DIM. Herd records

were compiled in a databank (DSAHR, 1925 rue Girouard Ouest, St-Hyacinthe, Quebec, J2S 3A5). Cows in the treatment group that acquired PVD- status between the two examinations were designated a clinical cure, while in the control group they were designated a spontaneous cure. Cows that maintained the PVD+ status between the two exams were defined as persistent affected cows and those passing from PVD- to PVD+ status were defined as new PVD+ cases.

Except for the experimental treatment (CEPH and synchronization protocol) and an intramammary mastitis treatment, no treatments were administered to trialed animals for the whole experimental period. If a cow received any other treatment, it was excluded from the study.

### *2.3 Gynecologic exams*

Farms were visited every two weeks by the same veterinarian. EXAM1 was always carried out before the beginning of the synchronization protocol. In order to characterize the reproductive tract and vaginal vault and check for discharge, all cows (n = 1247) were examined by uterus and ovaries transrectal palpation (size of the uterus and presence of a corpus luteum, follicles and cysts) and by vaginoscopy at 34 and 48 DIM ( $\pm 7$  days, EXAM1 and EXAM2 respectively). Following transrectal palpation, the vulva was cleaned with a dry paper towel and gauze with alcohol before performing the vaginoscopy. The disposable vaginoscope was unwrapped, moistened with sterile lubricant and inserted through the vulva into the vagina up to the outer cervical os. With a light source, the vaginal vault and cervical os were checked visually for the presence of discharge and categorized using a 4-point classification system, where 0 = no discharge, 1 = clear and translucent mucus, 2 = cloudy

mucus with or without flecks of pus (<50% pus), 3 = mucopurulent discharge (> 50% pus), and 4 = purulent discharge (described by Williams *et al.* (2005), Knutti *et al.* (2000) and Mari *et al.* (2012) ). The transrectal examination was performed first for convenience as the detection of vaginal discharge by vaginoscopy is not enhanced by a preceding transrectal palpation of the uterus (Leutert *et al.*, 2012).

Uterine cytobrush samples (n= 783 for EXAM1 and n= 720 for EXAM2) were collected for routine bacteriological examination. The sterile cytobrush was screwed onto a stainless steel rod and placed in a 65 cm-long stainless steel tube for passage through the cervix (Couto *et al.*, 2012). The instrument was inserted into a protective sheath (IMV Technologies, ZI No. 1 Est, L'Aigle, France) in order to reduce the risk of contamination. The veterinarian introduced the sheathed instrument into the vagina by parting the vaginal lips in order to avoid contamination and moved it into the first ring of the cervix. With a sleeved arm in the rectum for manipulation of the cervix, the veterinarian pushed the instrument through the sheath and advanced it through the cervix and into the body of the uterus. The cytobrush was then pushed out of the stainless steel tube and into the lumen of the uterus (a distance of approximately 1.0 cm). The sterile cytobrush, now in contact with the endometrium, was gently rotated clockwise for approximately one turn in order to collect cellular material from the endometrium. The veterinarian then retracted the cytobrush into the stainless steel tube and withdraw the whole apparatus from the genital tract. The brush was cut and packaged in a sterile plastic tube, placed in an insulated transport box and transported to the diagnostic bacteriology laboratory of the Faculty of veterinary Medicine within 12 hours.

#### *2.4 Uterine bacterial culturing and identification*

At the laboratory, bacteriological samples were cultured for aerobic bacteria using standard methods for bacteriological testing (API System: bioMerieux, Marcy-Etoile, France). For microbiological analysis, the brushes were plated onto sheep blood agar with a sterile disposable plastic loop (soy agar with 5% sheep blood, Becton Dickinson). Plates were incubated for 48 h at 35°C under aerobic conditions and then examined. When growth was observed, colony types were identified based on morphology, pigmentation, and hemolytic pattern. Organisms were further purified (subcultured) and identified using biochemical profiles and other standard methods (Barrow GI and Feltham, 1993). Plates containing one or more colony-forming units were considered positive for bacterial growth.

#### *2.5 Statistical analyses*

Reproductive performance data was obtained from the health information databank. We calculated descriptive statistics and then analyzed the data using SAS v. 9.2, with the cow as the unit of interest.

The optimum cut-off point for defining PVD+ was determined in two steps. First, for cows in the control group, sensitivity and specificity were calculated for each class of vaginal discharge based on pregnancy status at 120 DIM. Then the statistical significance of the negative effect of the highest sum of sensitivity-specificity on pregnancy status at 120 DIM was assessed using a mixed logistic regression model. The model took into account the following effects: herd (HERD), a random effect; season (SEAS), a fixed effect, with summer=1 (July to September), autumn=2 (October to December), winter=3 (January to

March) and spring=4 (April to June); and lactation (LACT), a fixed effect, with primiparous=1 and multiparous=0. The following were entered as covariables (GLIMMIX): presence of a CL at EXAM1 (CLD34), with a CL measuring more than 2 cm=1, otherwise CLD34=0; and the presence of a CL at EXAM2 (CLD48), with a CL measuring more than 2 cm=1, otherwise CLD48=0. The prevalence of PVD+ for each group was calculated from the results of the vaginal examination and based on the optimum cut-off.

PVD at EXAM1 and EXAM2, along with CEPH, were used to predict FSCR (odds ratio (OR) 95% CI;  $p < 0.05$ ) after the synchronization protocol with a generalized linear mixed model (PROC GLIMMIX, SAS) and to assess time to pregnancy up to 300 DIM (PROC PHREG). To measure the effect of PVD and CEPH on FSCR, we used cows from CONT and PVD+, respectively. The model included HERD, LACT, SEAS, CLD34 and CLD48. Because the present study was not designed to compare primiparous and pluriparous cows, nor the effect of the season or effect of the presence of a CL at EXAM1, before determining the CEPH and CONT groups, LACT, SEAS and CLD34 were kept in the statistical model although it was not significant. In the case of CLD34, the presence of a corpus luteum at EXAM1 could have an effect on the outcome of the synchronization protocol. The variable CLD48 were eliminated from the logistic model when found to be not significant. The results (least squares means) were adjusted using the Tukey-Kramer method. Statistical significance was defined as  $p < 0.05$  and  $p < 0.10$  was deemed a tendency. A backward elimination procedure was used and only significant interactions were retained ( $p < 0.05$ ). For the cumulative proportion of pregnant cows, we used a Cox proportional hazards model in the survival analysis (PROC PHREG) to assess the effect of PVD at EXAM1 and EXAM2 or the combined PVD (at EXAM1 and EXAM2) and of CEPH, controlling for SEAS, LACT,

CLD34 and CLD48. The variable CLD48 was kept only if significant in the statistical model for FSCR. Herds were included in the STRATA statement (Dubuc *et al.*, 2010a). The assumption of proportional hazards in the model was assessed graphically using the method of Kaplan-Meier curves plotting the logarithm of the hazard function by the logarithm of the time. The data from SAS were plotted on graphs representing the proportion of cows not pregnant over time.

The effect of CEPH on the presence of a corpus luteum at EXAM2 was tested in PROC GLIMMIX. The model was constructed for CLD48 as a function of HERD, CLD34, LACT, SEAS, PVD at EXAM1 and the treatment. The 14 d post therapy cured (Clercure) and new infection rates (Newinf) were analyzed using a generalized linear mixed model (PROC GLIMMIX). The model was constructed for PVD at EXAM2 as a function of HERD, CLD34, CLD48, SEAS, LACT and CEPH in the group PVD+ at 34 DIM for clinical cure and in the group PVD- at EXAM1 for the new infection rate.

Descriptive bacteriological results for the two groups (CONT and CEPH) were analyzed. A regression model was constructed to assess the relationship between bacteriological results and PVD status at EXAM1 and EXAM2. The covariables were SEAS, LACT, HERD, CLD34. For EXAM2, only the CONT group was used.

Before the study, statistical power and sample size calculations were performed. Based on the results of Runciman *et al.* (2008), the values expected for FSCR were 22% in control group and, based on reproductive performance in the enrolled herds, 35% in treatment group. Like the study was a randomized clinical trial at the cow level, adjustment of sample size for clustering was not necessary (Dohoo *et al.*, 2009). So, using a one-sided test with 95%



confidence and 80% power, 149 cows per group were required (G\*Power Version 3.1.9.2, Germany) (Faul *et al.*, 2007). With these assumptions, with the expected endometritis prevalence of 25% and with an adjustment of 15% for unusable data, a sample size of 1380 cows was targeted.

### 3. Results

#### 3.1 Descriptive results

The initial sample comprised 1247 cows from 18 herds. However, 255 cows were removed from the analysis for failure to comply with the experimental protocol. Cows were excluded for five reasons: failure to respect the synchronization protocol (n = 70, cows from the same herd), EXAM1 performed before 27 DIM or after 41 DIM (n = 9), no vaginoscopy performed (n = 6), use of antibiotics during the experimental protocol (n = 14) and no insemination at the end of the synchronization protocol (n = 156). In the end, 992 cows (297 primiparous, 29.9%) and 978 (294 primiparous, 30.1%) from 17 herds were available for analysis at EXAM1 and EXAM2. For EXAM1, there were 477 cows (140 primiparous) in the control group (CONT) and 515 cows (157 primiparous) in the cephalosporin treatment group (CEPH). The number of primiparous cows in CONT and CEPH (29.4% and 30.5%, respectively) was not significantly different (chi-square = 0.15, p = 0.70). Mean DIM at EXAM1 and EXAM 2 were 34 (27 to 41) and 48 (42 to 57), respectively, the mean values were identical in CONT and CEPH. The frequency distribution of vaginal discharge scores in cows examined at EXAM1 and EXAM2 are presented in Table 1.

### *3.2 Optimum cut-off point for PVD+ and disease prevalence*

Based on the highest sum of sensitivity and specificity of the vaginoscopy for pregnancy status at 120 DIM, we determined that the presence of cloudy discharge with or without flecks of purulent material (score 2) was the optimum cut-off point for defining PVD+ (Table 2 and Figure 8). At EXAM1, cows with a score of 2 or more ( $n = 95$ ) on the vaginal examination had a significantly lower probability of conceiving than cows with a lower score ( $n = 362$ ): OR = 0.62,  $p < 0.05$ , 95% CI = 0.38-1.00. In the model, the conception rate at 120 DIM was  $53.6 \pm 3.5\%$  for PVD- cows versus  $41.8 \pm 5.9\%$  for PVD+ cows. Similar results were obtained at EXAM2: cows with a score 2 or more ( $n = 70$ ) had significantly lower probability of conceiving than cows with a lower score ( $n = 379$ ): OR = 0.48,  $p = 0.01$ , 95% CI = 0.27 to 0.84. In the model, the conception rate at 120 DIM was  $54.5 \pm 3.5$  for PVD- cows versus  $35.4 \pm 6.6$  for PVD+ cows at EXAM2.

The prevalence of PVD+ cows in CONT was 21.6% ( $n = 477$ ) and 15.8% ( $n = 468$ ) at EXAM1 and EXAM 2, respectively, and the median herd prevalence for PVD+ was 19.1% (6.2% to 40.5%) at EXAM1 and 13.3% (0% to 35.1%) at EXAM2. However, there was great variability among herds. Four herds (of the total 17 herds, therefore 25%) had a prevalence of 0% for PVD+ at EXAM2. At EXAM1, the prevalence of PVD+ cows in the CONT and CEPH (21.6% and 29.2% respectively) were not significantly (chi-square = 0.54,  $p = 0.46$ ). The frequency of a corpus luteum at EXAM1 in CONT was 34.8% ( $n = 166$ ) versus 38.6% ( $n = 199$ ) in CEPH, which is not significantly different (chi-square = 1.57,  $p = 0.21$ ).

### *3.3 Effect of PVD on reproductive performance*

To validate the experimental modal for the present study, it was important substantiate the effect of PVD on the actual reproductive performance of cows. Using results for CONT (n = 468) at EXAM1 and controlling for herd (random variable), we assessed the effect of having a corpus luteum at EXAM1 and EXAM2, parity and season (fixed variables) as well as the effect of PVD+ on reproductive performance (on both FSCR and the cumulative proportion of cows pregnant) (Figures 2 and 3).

When PVD- cows started on the Presynch-Ovsynch protocol at EXAM1 (n = 374), they had  $40.3 \pm 2.9\%$  FSCR, compared to  $26.4 \pm 4.8\%$  FSCR for PVD+ cows (n = 103) (p = 0.02; OR = 1.89, adjusted p = 0.02, adjusted 95% CI = 1.13 to 3.16). There was no interaction in the final model. However, CLD48 had a significant effect on FSCR ( $41.1 \pm 4.1\%$  for CLD48 = 1;  $25.8 \pm 3.5\%$  for CLD48 = 0, p < 0.01).

PVD+ status at EXAM1 also had a detrimental effect on time to pregnancy until 300 d after parturition. The negative effect of PVD+ was manifest as a hazard ratio of 0.72 (p < 0.01; 95% CI = 0.56 to 0.91) and as an increased median time to pregnancy of about 41 days (Figure 2).

At EXAM2, PVD- cows (n=394) also showed better FSCR compared to PVD+ cows (n = 74): their chances of becoming pregnant were  $39.0 \pm 2.8\%$  versus  $29.2 \pm 5.9\%$ , respectively (p = 0.14). Cows CLD48+ had a significantly greater probability of becoming pregnant (OR = 1.95; p < 0.01; 95% CI = 1.28 to 2.97).

PVD+ status at EXAM2 had a significant detrimental effect on time to pregnancy until 300 d after parturition. Cows PVD+ at EXAM2 were slower to conceive than cows PVD- (HR

= 0.70,  $p = 0.02$ , 95% CI = 0.52 to 0.94), with an increasing median time to pregnancy of about 62 days (Figure 3). The effect of CLD48 on FSCR was not significant ( $p = 0.09$ )

When both exams were considered in the model, there was a significant effect of the diagnosis of PVD at EXAM1 and EXAM2 on CR at 120 DIM ( $p = 0.02$ ). In the model, cows PVD+/PVD+ (EXAM1/EXAM2), showed a CR at 120 DIM that was significantly less ( $23.7\% \pm 7.9$ ) than cows PVD-/PVD- ( $53.9\% \pm 3.7$ ). However, there was no significant difference between cows PVD-/PVD+ ( $46.5\% \pm 9.2$ ) and PVD+/PVD- cows ( $49.2\% \pm 7.3$ ). At FSRC, the effect of diagnosis of PVD was not significant, although there was a tendency ( $p = 0.10$ ). There was no significant difference between the four groups for FSCR. However, in the model, cows CLD48+ had a greater probability of becoming pregnant than cows CLD48- (OR = 1.89;  $p < 0.01$ ; 95% CI = 1.26 to 2.85).

PVD+/PVD+ cows also experienced a negative effect on time to pregnancy until 300 d after parturition. CONT cows that were PVD+/PVD+, had a 1.68 lower probability of conceiving compared to cows PVD+/PVD- ( $p = 0.03$ ; 95% CI = 1.06 to 2.66), a 1.87 lower probability than cows PVD-/PVD+ ( $p = 0.01$ ; 95% CI = 1.13 to 3.10), and a 1.98 lower probability than cows PVD-/PVD- ( $p < 0.01$ ; 95% CI = 1.34 to 2.91). The variable CLD48 was not significant in the Cox model ( $p = 0.11$ ).

### *3.4 Effect of CEPH*

To test the efficacy of CEPH on clinical endometritis, we used only the PVD+ group at EXAM1, adjusted for herd, parity, presence of a corpus luteum and season. PVD+ CEPH cows ( $n = 121$ ,  $36.1 \pm 5.0\%$ ) showed a higher FSCR than PVD+ CONT cows ( $n = 103$ ,  $22.8 \pm$

4.7%,  $p = 0.04$ ). The odds ratio for treated cows becoming pregnant was nearly twice that of PVD+ CONT cows (OR = 1.85, adjusted  $p < 0.05$ , adjusted 95% CI = 1.00 to 3.41). There was no significant interaction in the model. However, cows with a corpus luteum at EXAM2 ( $38.0 \pm 5.2\%$ ) had a greater probability of becoming pregnant than cows without a corpus luteum ( $21.4 \pm 4.5\%$ ) (OR = 2.25, adjusted  $p = 0.01$ , 95% CI = 1.20 to 4.24). PVD+ CEPH cows also experienced a beneficial effect on time to pregnancy until 300 d after parturition (HR = 1.42, chi-square = 5.90,  $p = 0.02$ , 95% CI = 1.07 to 1.88) (Figure 4). The treatment improved median time to pregnancy by 38 days.

At EXAM2, there was no significant difference in clinical cure associated with CEPH administered at EXAM1. PVD+ CEPH cows and PVD+ CONT cows showed  $75.9 \pm 5.8\%$  and  $70.4 \pm 7.0\%$  clinical cure, respectively ( $p = 0.37$ ).

FSCR was not significantly different between PVD+ CEPH cows ( $n = 88$ ) and PVD+ CONT cows ( $n = 74$ ). But treatment significantly improved CR at 120 DIM: (PVD+ CEPH  $66.3 \pm 7.8\%$  and PVD+ CONT:  $43.7 \pm 9.5\%$ ,  $p = 0.02$ ). The survival analysis showed that cows PVD+ at EXAM2 and treated at EXAM1 conceived faster than the cows in the CONT group (HR = 1.60, chi-square = 5.17,  $p = 0.02$ , 95% CI = 1.07 to 2.40) (Figure 5). Treatment at EXAM1 improved median time to pregnancy by 65 days for PVD+ cows diagnosed at EXAM2. There was no significant difference between PVD+ CEPH and PVD- CEPH cows ( $p = 0.88$ ). The number of new PDV+ at EXAM2 in CEPH ( $12.4 \pm 1.8\%$ ) was not significantly different from that in CONT ( $9.2 \pm 1.6\%$ ,  $p = 0.14$ ).

For cows PVD+/PVD+, the treatment had no significant effect on FSCR ( $p > 0.10$ ) (CEPH:  $35.2 \pm 9.0\%$ , CONT:  $21.3 \pm 8.6\%$ ,  $p = 0.25$ ), and there was no effect of CLD48 ( $p >$

0.10). But there was a tendency for the treatment to have a beneficial effect on time to pregnancy up to 300 DIM. Cows in CEPH conceived faster than those in CONT (HR = 1.81; p = 0.06; 95% CI = 0.97 to 3.37) (Table 5). The median time to pregnancy was improved by 82 days.

The treatment improved significantly the probability for cows to have a palpable CL at EXAM2. In the final model, only the interaction between the PVD at EXAM1 and the treatment was significant. Regardless the PVD status, CEPH cows had more chance to have a CL at 49 DIM than CONT cows ( $58.1 \pm 3.1$  vs  $46.4 \pm 3.4$ , OR = 1.60, p < 0.01, 95% CI = 1.17 to 2.20). About the significant interaction, among all the comparisons and when adjusted for multiple comparisons using the Tukey-Kramer method, only the effect of the treatment on cows PVD+ at EXAM1 was significant. Cows PVD+ CEPH had more CL at EXAM2 than cows PVD+ CONT ( $62.9 \pm 4.8\%$  vs  $40.7 \pm 5.4\%$ , OR = 2.47, adjusted p < 0.01, adjusted 95% CI = 1.18 to 5.18).

### 3.5 Bacteriological results

Uterine samples were collected at EXAM1 for a subset of cows (n = 527) (Table 3). Bacteria were isolated from approximately 68% of this subset. About 54% of samples showed growth of only one bacterial species (n = 284), 10% showed growth of two bacterial species (n = 51) and 4% showed growth of three bacterial species (n = 21). Samples exhibiting growth of more than three different bacterial species (contamination, n = 1) or an overgrowth of *Bacillus* (n = 5) were excluded from the dataset. A total of 284 cultures revealed a pure culture of one bacterial species. Of the uterine samples collected, the recognized uterine pathogens *T.*

*pyogenes* and *E. coli* were isolated from approximately 8% of samples. *Bacillus* spp in a pure culture was isolated in 75% of samples (n = 213).

For positive cultures, the types of isolates were very similar between CONT and CEPH (Table 4). At EXAM1, 20 % of cows (55 / 270) with a pure uterine culture became negative on EXAM2. There was no difference for bacteriological cure between CEPH (20.1%, 32 / 159) and CONT (20.8%, 26 / 125) groups. Cows with *T. pyogenes* (n = 33) in the uterus at EXAM1 had an approximately 13.51 greater probability of being PVD+ compared to cows without *T. pyogenes* at 34 DIM (cows with no bacteria or with another bacterial species) (5.85 versus 31.25,  $p < 0.01$ ). The percentage of PVD+ was higher in cows with *T. pyogenes* in the uterus than cows with any other aerobic bacteria ( $69.32 \pm 9.41\%$  versus  $13.48 \pm 3.23\%$ , OR = 14.49,  $p < 0.01$ , 95% CI = 6.17 to 34.48). PVD+ cows had a  $30.76 \pm 8.93\%$  greater probability of having *T. pyogenes* compared to PVD- cows, which had only a  $2.79 \pm 1.31\%$  probability (OR = 15.38,  $p < 0.01$ , 95% CI = 6.33 to 38.46).

At EXAM2, 4.74% of cows with a pure culture had *T. pyogenes* (n = 13), while 70.44% had *Bacillus* spp (n = 193). About 26.30% of cows in CONT (n = 116) did not show any bacterial growth (n = 58, 27.23%) versus 25.44% of cows (n = 58) in CEPH. If *T. pyogenes* was present in the uterus at EXAM1, cows had a 5.68 greater probability of being PVD+ at EXAM2 compared to cows testing positive for another bacteria (1.54 versus 20.83,  $p < 0.01$ ). If *T. pyogenes* was present in the uterus at EXAM2, cows had a 15.87 greater probability of developing PVD+ in the PP period than cows testing positive for another bacteria (4.93 versus 50,  $p < 0.01$ ).

#### 4. Discussion

The negative effect of endometritis on fertility in PP dairy cows has been well documented. Similarly, the treatment of clinical endometritis has been the subject of several studies in the past decade, although there is still considerable controversy on the most effective treatment (Lefebvre et Stock, 2012). While local antibiotics are widely used to treat endometritis, clear scientifically based evidence for their efficacy is lacking.

The most practical way of diagnosing PP endometritis is to characterize the pus present in the vagina (Dubuc *et al.*, 2010a; LeBlanc *et al.*, 2002a; Williams *et al.*, 2005). Since the publication of Williams *et al.* (2005), studies have used a scoring system for characterizing vaginal discharge. A number of different scoring scales systems and different sampling methods have been used, including the gloved hand (Williams *et al.*, 2005), vaginoscopy (Runciman *et al.*, 2008b) and Metricheck (Dubuc *et al.*, 2010a). In the present study, we used a score derived from Williams *et al.* (2005), Mari *et al.* (2012) and Knutti *et al.* (2000). Cloudy mucus appears greyish but does not have macroscopic purulent flecks. As the two categories of cloudy mucus and purulent flecks both had a significant effect on FSCR, as well as similar sensitivity and specificity, we merged the two into one score.

At EXAM1, cows with cloudy mucus had a FSCR of 26.1% and cows with mucus plus flecks (< 50% pus) had a FSCR of 17.4%. The FSCRs for cows without mucus and with clear mucus were 35.6% and 39.6%, respectively. Similar trends were also obtained for EXAM2. Cloudy mucus on the vaginoscopy was associated with moderate endometritis by Knutti *et al.* (2000).



The prevalence of PVD+ was 21.6% at EXAM1, and 15.8% at EXAM2, which is similar to the results of a previous study (Williams *et al.*, 2005). Earlier vaginal examination during the PP period (21-27 DIM) reveals a prevalence of clinical endometritis of around 40% (Kaufmann *et al.*, 2010) and at  $26 \pm 3$  DIM, around 30% (Brick *et al.*, 2012). For early after calving, Runciman *et al.*, (2008b) reported a prevalence for a positive visual examination of pus (vaginostomy) of about 25%. Gautam *et al.* (2010) found a prevalence of endometritis (on vaginoscopy) during early (15-20 DIM), intermediate (21-28 DIM), and late (29-60 DIM) PP periods of 44.9%, 25.4%, and 14.7%, respectively. Even though the prevalence of PVD+ cows is expected to decrease with number of days PP because of spontaneous clinical cures, there is large variation in PVD+ prevalence among herds and studies. In our study, the prevalence of PVD+ varied between 0% and 35%, with 4 out of 18 herds exhibiting a PVD+ prevalence of 0%. Variation among studies can be explained, in part, by differences in case definition, the techniques used to characterize vaginal discharge and/or the classification system used for scoring vaginal discharge. But the major source of variation is the failure to use analyzes, statistically, the effects of PVD score on fertility in the studied population.

A single administration of cephalixin in PP PVD+ cows at 34 DIM was associated with a significant improvement in reproductive performance compared to PVD+ CONT cows. The administration of cephalixin increased the Presynch-Ovsynch FSCR by 13.3 points compared to untreated cows. Nearly twice the number of PVD+ CEPH cows became pregnant compared to PVD+ CONT cows (OR = 1.85, ET = 0.31,  $t = 1.99$ , adjusted  $p < 0.05$ , adjusted 95% CI = 1.00 to 3.41). In a previous study, administration of a single intrauterine dose of cephalixin between 21 and 34 DIM was unsuccessful at improving FSCR in cows with clinical endometritis ( $n = 111$ ) (LeBlanc *et al.*, 2002b). However, in this study, cows treated between

27 and 34 DIM showed a shorter time to pregnancy and a 63% increase in cumulative pregnancy risk ( $p = 0.01$ ) compared to untreated cows at the first exam ( $n = 89$ ). Therefore, cows were indeed getting pregnant faster. Due to the uncertainty around number of treatments received by each cow, the main effect may not have been associated with only the first treatment given between 27 and 34 DIM. This may also explain why the significant effect of the cephalosporin on pregnancy rate seemed at least partly influenced by events occurring over a longer period (100 days) after the first treatment (survival curve). There was also a lack of association between treatment and time of enrolment ( $p = 0.59$ ) in the general model. By contrast, in our study, treated animals received a single dose of cephalosporin before AI and nothing else. In a seasonal calving system (Runciman *et al.*, 2008a), a single administration of cephalosporin resulted in a statistically positive treatment effect on PP cows with PVD+. The daily risk of pregnancy for cows with vaginal discharge treated with cephalosporin was 2-fold that for untreated cows ( $p = 0.013$ ). The treatment improved the proportion of cows with clinical endometritis that conceived with artificial insemination ( $p = 0.04$ ) when treated between 28 and 37 days before the mating start day and less than 4 weeks after calving, which is earlier than in our study. The proportion of pregnant cows within 6 and 21 weeks of mating start day date was also higher ( $p = 0.01$  and  $p = 0.03$ , respectively) and the first service to artificial insemination was significantly better ( $p = 0.03$ ) in treated cows ( $n = 103$ ) versus for untreated cows ( $n = 126$ ). The seasonal calving system with pasture-based nutrition and lower producing cows contrasts with the annual calving system with high producing cows found in Canada. Both systems may differ in terms of risk factors for uterine disease. A previous study has shown a strong interaction between treatment and calving-to-treatment interval (Runciman *et al.*, 2009; Runciman *et al.*, 2008a). In our study, because all cows were enrolled in a rigorous

Presynch-Ovsynch protocol and no medications were administered before the first AI, FSCR is a more reliable reproductive performance parameter for measuring reproductive efficacy in PP cows after treatment.

The lack of follow-up examinations of animals is noticeable in most studies and is often a confounding factor (Lefebvre et Stock, 2012). This was not the case in our study. Furthermore, the large number of cows in our study means that masking and memorization effects are minor. Furthermore, the use of sample size calculation and randomization strengthen our results. Surprisingly, the effect of CEPH-PVD+ cows with mucopurulent or purulent discharge did not react positively like other PVD+ categories. It is possible that greater PVD may be associated with more serious endometrial damage that requires a different treatment or more than just one intrauterine antibiotic treatment. PVD has been associated with a greater growth density of known pathogens from the uterus (Williams *et al.*, 2005) and potentially more endometrial lesions.

The interval between calving and treatment may be a confounding variable. One may assume that the earlier a treatment is administered during the process of uterine infection, the better the chance of resolving the infection, minimizing endometrial lesions and improving chances that the uterus will return to normal function. The early treatment of PVD+ during the PP period in a seasonal calving system may explain the positive effect of intrauterine treatment. Studies have shown that about 12% of cows are diagnosed with endometritis and treated before 20 DIM (Runciman *et al.*, 2008a), even though it is difficult to differentiate a normal vaginal discharge (physiological uterine involution) from pathological discharge during the early PP period. LeBlanc *et al.* (2002b) did not find any benefit to reproductive

performance by treating PVD+ cows before 27 DIM, although they found a significantly shorter time to pregnancy in cephalirin-treated cows versus untreated cows between 27 and 34 DIM. In our study, PP PVD+ cows were treated between 27 and 41 DIM, and we found significant improvement. During the 27 to 41 DIM interval, PVD+ cows were less likely to have a false positive result compared to cows examined in very early PP (<20 DIM). If the results are stratified by week in the study period, PVD+ CEPH cows (n = 61) treated before 34 DIM had better FSCR than cows treated after 34 DIM (n = 60): 41% versus 37% (chi-square = 0.2, p = 0.6). This time window (27-33 DIM) was also suggested by LeBlanc *et al.* (2002b), who studied the effects of an intrauterine cephalirin infusion (p = 0.01). However, the treatment effect was not dependent on time of treatment. Since CEPH did not negatively affect PVD- cows, it is also unlikely that falsely treated PVD+ cows in our study could have had an impact on the results. There was no significant difference in reproductive performance between PVD+ CEPH and PVD-CEPH cows (HR = 1.01, chi-square=0.02, p = 0.89, 95% CI = 0.83 to 1.25) on the survival analysis. It does not appear that calving-treatment interval is an important factor in PP treatment success. However, studies specifically designed to answer this question are needed.

Another confounding factor on the efficacy of uterine treatment is treatment-AI interval. Studies of a seasonal breeding system (Runciman *et al.*, 2008a) suggest that CEPH needs to be administered between 28 and 37 days before mating, which is similar to our finding of 36 days on average (between 34 and 38 days). LeBlanc *et al.*, (2002b) found no significant difference in time to first insemination between groups. While these researchers did not specify the treatment-AI interval, we estimated it to be between 43 and 59 days before the median day of AI. The efficacy of intrauterine treatment for endometritis may not be as much

a question of length of calving-treatment interval or the degree of uterine involution at time of treatment, as a question of the minimum or optimum time necessary for the antibiotic to act on the uterine environment to promote tissue repair, re-establish normal functioning and increase the likelihood of conception.

In short, the effect of treatment-AI interval on the efficacy of intrauterine antibiotic treatment in PVD+ cows has never been systematically studied and depends on the very complex pharmacodynamics between the infectious agent, the host and the antibiotic. In our study, the calving-treatment interval was not a confounding variable since all cows were bred in a narrow time window after treatment with cephalosporin. It would be rational to hypothesize that the time needed for the morphological repair of tissue and a return to an optimal function is greater than the time needed to eliminate bacteria from the uterine cavity. Furthermore, an antibiotic may not eliminate all bacteria (Bretzlaff, 1987), although over time it may reduce the bacterial load and inflammation, allowing uterine defense mechanisms to re-establish a good uterine environment and proper function for the establishment of future pregnancy.

For our study, we chose the antibiotic cephalosporin because it is presently the only intrauterine antibiotic approved for use in Canada and because it is effective against bacteria present in the uterus during the PP period. This first-generation antibiotic is active against most common uterine pathogens and maintains its activity in the uterine environment for about 72 hours at a concentration above 0.25 ug / ml in the endometrial tissue (McDougall, 2001). This tissue concentration is above the minimum inhibitory concentration required for most uterine pathogens (Bondurant, 1999; McDougall, 2001). Clinically, cephalosporin reduces the prevalence of discharge at the external cervical orifice (clinical cure) by 80%, and bacteria

(bacteriological cure) in the uterus by 60% at 2 weeks after treatment (Dohmen *et al.*, 1995). We found that PVD+ CEPH cows showed a cure rate of  $75.9 \pm 5.8\%$ . Several other antibiotics (penicillin G, oxacillin, oxytetracycline and ampicillin) have been investigated for the treatment of endometritis, but no positive effects on reproductive performance were measured in these studies (Lefebvre et Stock, 2012). The rationale behind using a local therapeutic approach for uterine infection is to reduce the number of pathogens in the uterine cavity and, consequently, mitigate the associated inflammation, enhance the local immune defence and facilitate the repair of the endometrium for a faster return to a normal uterine function. Antibiotics indirectly reduce inflammation mediators such as neutrophils, macrophages, immunoglobulins, histamines, prostaglandins and interleukin, which may interfere with embryo survival (Bondurant, 1999). One *in vitro* study (Hill et Gilbert, 2008) reported a potentially negative effect of these mediators on the establishment of pregnancy.

The choice of antibiotics for treating uterine infection is based on both efficacy and the potential for the development of antimicrobial resistance. Certain strains of *T. pyogenes* have been shown to be resistant to oxytetracycline and cephalosporins, the antibiotics most frequently used to treat endometritis in dairy cows PP (Malinowski *et al.*, 2011). Certain genotypic or phenotypic groups of *E. coli* may also be associated with uterine disease in cattle (Sheldon *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2009), although no data indicate that the minimum inhibitory concentration of antibiotic differs among these strains. No genotypic or phenotypic studies of bacteria found in the uterus were carried out in our study. Recently, the administration of intrauterine ceftiofur hydrochloride, an intra-mammary product, in cows diagnosed with vaginal discharge using the Metricheck technique at  $44 \pm 3$  DIM proved unsuccessful at improving pregnancy per AI with the Presynch-Ovsynch protocol (Galvao, Greco, *et al.*,

2009). Ceftiofur has been shown to maintain serum, endometrial and lochia concentrations above the reported MIC90 for a period of 7 days for bacteria like *E. coli* and *T. pyogenes* (Witte *et al.*, 2011). Furthermore, selecting an intrauterine antibiotic based simply on the *in vitro* sensitivity of bacteria to that antibiotic, with no consideration of physicochemical changes in the nature of the uterine environment over time (e.g. anaerobic versus aerobic and production of penicillinases) and the pharmacokinetics of the antibiotic in that environment, may be problematic because *in vivo* efficacy is not ensured. The administration route used for the antibiotic is also important. Intrauterine treatment allows the antibiotic to reach the luminal and endometrial minimum inhibitory concentrations essential for preventing bacterial growth.

In general, a large portion of cows with clinical endometritis present a spontaneous cure. In our study,  $70.4 \pm 7.0\%$  of CONT cows who were PVD+ at EXAM1 became PVD- at EXAM2, while  $75.9 \pm 5.8\%$  of CEPH cows who were PVD+ at EXAM1 became PVD- at EXAM2. Other studies have reported a cure rate of 77% (LeBlanc *et al.*, 2002b) and 63% (Dubuc *et al.*, 2011), as defined by the absence of vaginal purulent discharge 14 and 21 days, respectively, after the first examination. In our study, clinical cure was defined as PVD- at EXAM2 following a PVD+ status at EXAM1 14 days earlier. A similar result (i.e. 75% spontaneous resolution rate) was found by Gautam *et al.* (2010), while Feldmann *et al.* (2005) found a rate of 57.1 %. Such a high spontaneous cure rate reflects, most likely, the natural processes of healing during uterine involution, and may lead us to question the need for treatment of this uterine condition. However, the spontaneous cure of vaginal discharge does not imply a return to normal fertility. In some previous studies, the resolution of vaginal discharge was not associated with a return to normal pregnancy rate and was not affected by

treatment (Dubuc *et al.*, 2011; LeBlanc *et al.*, 2002b). The benefits of treating PVD+ should not be underestimated.

Like other studies, we assessed clinical cure 14 days following treatment. Among CEPH cows, 66% (n = 339) were PVD- at both examinations, 10% (n = 52) became PVD+ on EXAM2, 16% (n = 83) were cured between examinations, and 7% (n = 36) kept their PVD+ status. In CONT cows, 71% (n = 331) were PVD- at both examinations, 8% (n = 36) became PVD+ at EXAM2, 13% (n = 63) were spontaneously cured between examinations, and 8% (n = 38) stayed PVD+. Although there was no difference in the distribution of the different groups, CEPH showed a very significant effect on the reproductive performance of treated PVD+ cows at EXAM1. In addition, there was no significant clinical cure difference due to CEPH at EXAM2. We also found no difference among the different groups of PVD+ and PVD- cows between CEPH and CONT ( $p > 0.05$ ). Therefore, a reassessment for clinical cure 2 weeks after treatment would seem to be insufficient for evaluating the efficacy of an intrauterine treatment. The infection rate of 10% and 8% in CEPH and CONT, respectively, is similar to the rates of 6% and 11% found in other studies (Dubuc *et al.*, 2011; Gautam *et al.*, 2010). Procedures done during the first examination may have caused the uterine infection and PVD. However, it does not rule out the possibility of a false negative test at EXAM1 or a spontaneous infection due to other causes. The proportion of persistently affected cows between both examinations was much lower than the 37% reported by Dubuc *et al.*, (2011). The efficacy of treatment is most likely the reason for the effect seen in the CEPH group.

A potential confounding factor on the efficacy of treatment in PVD+ cows is the presence of progesterone. The presence of a functional corpus luteum can modify the



treatment response because steroids affect the cow's local immune response. Progesterone suppresses the immune response and makes the uterus more susceptible to bacterial infection (Lewis, 2003). Progesterone has been shown, for example, to suppress the immune response to lipopolysaccharides in endometrial cells *in vitro* (Herath *et al.*, 2006). The prevalence of cows with a functional corpus luteum varies in PP dairy cows. Based on progesterone levels, about 25% and 54% of high producing dairy cows have a functional corpus luteum at 12 and 49 DIM, respectively. In our study, 36.8% and 51.5% of cows had a corpus luteum on transrectal palpation at EXAM1 and EXAM2, respectively. The prevalence was 26% at about 30 DIM (McDougall *et al.*, 2013). The accuracy of transrectal palpation for determining the presence of a functional corpus luteum and true cyclicity is imperfect. Kelton *et al.* (1991) found that transrectal palpation had a mean sensitivity of 82.6% and a specificity of 52.6%. Resumed cyclicity in PP dairy cows is important because it is a factor that favors fertility in PP cows (Thatcher *et al.*, 1973). If cyclicity is defined as the presence of a corpus luteum on transrectal palpation at 2 week intervals and taking the results for CONT PVD+ cows at 49DIM, we see that the presence of a corpus luteum tends to improve FSCR (CONT PVD+ with cyclicity (n = 40):  $46.6 \pm 16.4\%$  vs CONT PVD+ without cyclicity (n = 34):  $14.1 \pm 10.8\%$ , OR = 5.32, p = 0.07, 95% CI = 0.88 to 31.25). Due to the small number of cows in this category, further studies are needed. The effect of cephalixin on cows with PVD+ was also enhanced in the presence of a corpus luteum (LeBlanc *et al.*, 2002b) as diagnosed by transrectal examination. In our study, the prevalence of a corpus luteum at 49 DIM was  $62.9 \pm 4.8\%$  for PVD+CEPH and  $40.7 \pm 5.34\%$  for PVD+CONT (OR = 2.47, adjusted p < 0.01, adjusted 95% CI = 1.18 to 5.18). Therefore, the effect of intrauterine cephalixin on PVD+ cows between 27 and 34 DIM may not necessarily be associated with the presence of a functional corpus luteum alone. In a

recent study, the reproductive performance of PVD+ cows treated with cephalosporin or PGF was not affected by the presence of a corpus luteum (McDougall *et al.*, 2013). The effect of P4 on the efficacy of intrauterine cephalosporin for PVD+ cows is still being debated.

We found no association between bacteria in the uterus and reproductive performance. Treatment with ceftiofur did not affect the prevalence of a positive bacteriological result. A previous study found that treatment at 44 DIM also did not decrease the overall prevalence of a positive bacterial culture result (Galvao, Greco, *et al.*, 2009). The range of bacterial species isolated from the uterine samples in our study is similar to previous reports (Foldi *et al.*, 2006; Westermann *et al.*, 2010; Williams *et al.*, 2005). The most prevalent bacteria found in the late PP period are *T. pyogenes*, *E. coli*, *F. necrophorum*, and *Prevotella*. Of these, *T. pyogenes* is probably the most significant because of its association with endometrial inflammation (Dohmen *et al.*, 1995) and lesions (Sheldon, Price, *et al.*, 2009), PVD (Williams *et al.*, 2005) and a reduction in reproductive efficiency (Williams *et al.*, 2005). The prevalence of *T. pyogenes* at EXAM1 is similar to the value (6.3%) found in a previous study (McDougall *et al.*, 2011). However, at EXAM2, the prevalence of *T. pyogenes* was 4%, about 2 times lower than that reported by McDougall (9.9%) (McDougall *et al.*, 2011), but very similar to that reported by Galvao (4.5%) (Galvao, Greco, *et al.*, 2009) at 51 DIM. In agreement with other studies, cows with *T. pyogenes* at EXAM1 and EXAM 2 had about a 15 and 16 times greater probability of having PVD+ ( $p < 0.01$ ), respectively. We found a much lower prevalence of *E. coli* than did other studies (McDougall *et al.*, 2013). Seventy-five percent of our culture samples showed *Bacillus* spp, which are reported to protect against endometrial inflammation (Bonnett, Martin, *et al.*, 1991). The presence of CNS and  $\alpha$ -hemolytic streptococci has been shown to decrease the risk of endometritis (Williams *et al.*, 2005). We did not find any

association between the presence of *Bacillus* spp, CNS or  $\alpha$ -hemolytic streptococci and PVD. The existence of such a protective effect remains speculative.

## **5. Conclusion**

This randomized controlled clinical trial presents the best scientific evidence available that a single intrauterine infusion of cephalosporin in PP cows positive for purulent vaginal discharge at approximately 34 DIM significantly improves reproductive performance. It also proposes accurate criteria for establishing the presence of purulent vaginal discharge or clinical endometritis based on the presence of cloudy mucus with or without flecks of pus. Cephalosporin treatment did not produce a significant clinical cure as assessed 14 days following intrauterine treatment. Thus, a longer period of time following treatment may be needed to properly assess the efficacy of intrauterine treatment in cows with purulent vaginal discharge.

## **Acknowledgments**

The authors thank the farmers for their cooperation and Dr. Guy Beauchamp for his collaboration. The study was funded by public money (Valacta and the Quebec and Canadian Departments of Agriculture). There was no potential conflict of interest.

## **References**

- Bartlett, P. C., J. H. Kirk, M. A. Wilke, J. B. Kaneene and E. C. Mather (1986). "Metritis Complex in Michigan Holstein-Friesian Cattle - Incidence, Descriptive Epidemiology and Estimated Economic-Impact." *Preventive Veterinary Medicine* 4(3): 235-248.
- Bondurant, R. H. (1999). "Inflammation in the bovine female reproductive tract." *J Anim Sci* 77 Suppl 2: 101-110.
- Bonnett, B. N., S. W. Martin, V. P. Gannon, R. B. Miller and W. G. Etherington (1991). "Endometrial biopsy in Holstein-Friesian dairy cows. III. Bacteriological analysis and correlations with histological findings." *Can J Vet Res* 55(2): 168-173.
- Bretzlaff, K. (1987). "Rationale for treatment of endometritis in the dairy cow." *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 3(3): 593-607.
- Brick, T. A., G. M. Schuenemann, S. Bas, J. B. Daniels, C. R. Pinto, D. M. Rings and P. J. Rajala-Schultz (2012). "Effect of intrauterine dextrose or antibiotic therapy on reproductive performance of lactating dairy cows diagnosed with clinical endometritis." *Journal of dairy science* 95(4): 1894-1905.
- Couto, G. B., D. H. Vaillancourt and R. C. Lefebvre (2012). "Comparison of a leukocyte esterase test with endometrial cytology for diagnosis of subclinical endometritis in PP dairy cows." *Theriogenology*.
- Dohmen, M. J. W., J. A. C. M. Lohuis, G. Huszenicza, P. Nagy and M. Gacs (1995). "The Relationship between Bacteriological and Clinical Findings in Cows with Subacute Chronic Endometritis." *Theriogenology* 43(8): 1379-1388.
- Dohoo, I. R., S. W. Martin, and H. Stryhn. 2009. *Veterinary epidemiologic research*. 2nd ed. VER, Inc., Charlottetown, P.E.I.
- Drillich, M., O. Beetz, A. Pfutzner, M. Sabin, H. J. Sabin, P. Kutzer, H. Nattermann and W. Heuwieser (2001). "Evaluation of a systemic antibiotic treatment of toxic puerperal metritis in dairy cows." *J Dairy Sci* 84(9): 2010-2017.
- Dubuc, J., T. F. Duffield, K. E. Leslie, J. S. Walton and S. J. LeBlanc (2010). "Definitions and diagnosis of PP endometritis in dairy cows." *Journal of dairy science* 93(11): 5225-5233.
- Dubuc, J., T. F. Duffield, K. E. Leslie, J. S. Walton and S. J. Leblanc (2011). "Randomized clinical trial of antibiotic and prostaglandin treatments for uterine health and reproductive performance in dairy cows." *Journal of dairy science* 94(3): 1325-1338.
- Feldmann, M., S. Tenhagen genannt Emming and M. Hoedemaker (2005). "[Treatment of chronic bovine endometritis and factors for treatment success]." *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 112(1): 10-16.

- Foldi, J., M. Kulcsar, A. Pecs, B. Huyghe, C. de Sa, J. A. Lohuis, P. Cox and G. Huszenicza (2006). "Bacterial complications of PP uterine involution in cattle." *Anim Reprod Sci* 96(3-4): 265-281.
- Galvao, K. N., L. F. Greco, J. M. Vilela, M. F. Sa and J. E. P. Santos (2009). "Effect of intrauterine infusion of ceftiofur on uterine health and fertility in dairy cows." *Journal of dairy science* 92(4): 1532-1542.
- Gautam, G., T. Nakao, K. Koike, S. T. Long, M. Yusuf, R. M. Ranasinghe and A. Hayashi (2010). "Spontaneous recovery or persistence of PP endometritis and risk factors for its persistence in Holstein cows." *Theriogenology* 73(2): 168-179.
- Haimerl, P., S. Arlt and W. Heuwieser (2012). "Evidence-based medicine: quality and comparability of clinical trials investigating the efficacy of prostaglandin F(2alpha) for the treatment of bovine endometritis." *J Dairy Res* 79(3): 287-296.
- Herath, S., H. Dobson, C. E. Bryant and I. M. Sheldon (2006). "Use of the cow as a large animal model of uterine infection and immunity." *J Reprod Immunol* 69(1): 13-22.
- Hill, J. and R. Gilbert (2008). "Reduced quality of bovine embryos cultured in media conditioned by exposure to an inflamed endometrium." *Aust Vet J* 86(8): 312-316.
- 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.
- Kaufmann, T. B., S. Westermann, M. Drillich and W. Heuwieser (2009). "Treatment of chronic endometritis with a systemic application of ceftiofur or prostaglandin F-2 alpha." *Reproduction in Domestic Animals* 44: 18-19.
- Kaufmann, T. B., S. Westermann, M. Drillich, J. Plontzke and 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. E. Leslie, W. G. Etherington, B. N. Bonnett and J. S. Walton (1991). "Accuracy of rectal palpation and of a rapid milk progesterone enzyme-immunoassay for determining the presence of a functional corpus luteum in subestrus dairy cows." *Can Vet J* 32(5): 286-291.
- Klucinski, W., S. P. Targowski, A. Winnicka and E. Miernikdegorska (1990). "Immunological Induction of Endometritis-Model Investigations in Cows." *Journal of Veterinary Medicine Series a-Zentralblatt Fur Veterinarmedizin Reihe a-Physiology Pathology Clinical Medicine* 37(2): 148-153.

- Knutti, B., U. Kupfer and A. Busato (2000). "Reproductive efficiency of cows with endometritis after treatment with intrauterine infusions or prostaglandin injections, or no treatment." *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 47(10): 609-615.
- LeBlanc, S. J. (2008). "PP 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 and W. H. Johnson (2002). "Defining and diagnosing PP clinical endometritis and its impact on reproductive performance in dairy cows." *Journal of dairy science* 85(9): 2223-2236.
- LeBlanc, S. J., T. F. Duffield, K. E. Leslie, K. G. Bateman, G. P. Keefe, J. S. Walton and W. H. Johnson (2002). "The effect of treatment of clinical endometritis on reproductive performance in dairy cows." *Journal of dairy science* 85(9): 2237-2249.
- Lefebvre, R. C. and A. E. Stock (2012). "Therapeutic efficiency of antibiotics and prostaglandin F2 $\alpha$  in PP dairy cows with clinical endometritis: an evidence-based evaluation." *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 28(1): 79-96, ix.
- Lewis, G. S. (2003). "Steroidal regulation of uterine resistance to bacterial infection in livestock." *Reprod Biol Endocrinol* 1: 117.
- Malinowski, E., H. Lassa, H. Markiewicz, M. Kaptur, M. Nadolny, W. Niewitecki and J. Zietara (2011). "Sensitivity to antibiotics of *Arcanobacterium pyogenes* and *Escherichia coli* from the uteri of cows with metritis/endometritis." *Vet J* 187(2): 234-238.
- McDougall, S. (2001). "Effect of intrauterine antibiotic treatment on reproductive performance of dairy cows following periparturient disease." *New Zealand veterinary journal* 49(4): 150-158.
- McDougall, S., M. de Boer, C. Compton and 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 and S. Meier (2011). "Relationships between cytology, bacteriology and vaginal discharge scores and reproductive performance in dairy cattle." *Theriogenology* 76(2): 229-240.
- Overton, M. and J. Fetrow ( 2008 ). " Economics of PP uterine health." *Dairy Cattle Reprod Council Conv. Omaha NE 2008*: 39-43.
- Runciman, D. J., G. A. Anderson and J. Malmo (2009). "Comparison of two methods of detecting purulent vaginal discharge in PP dairy cows and effect of intrauterine cephalixin on reproductive performance." *Aust Vet J* 87(9): 369-378.

- Runciman, D. J., G. A. Anderson, J. Malmo and G. M. Davis (2008). "Effect of intrauterine treatment with cephalixin 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, J. Malmo and G. M. Davis (2008). "Use of PP vaginoscopic (visual vaginal) examination of dairy cows for the diagnosis of endometritis and the association of endometritis with reduced reproductive performance." *Aust Vet J* 86(6): 205-213.
- Sheldon, I. M., G. S. Lewis, S. LeBlanc and R. O. Gilbert (2006). "Defining PP uterine disease in cattle." *Theriogenology* 65(8): 1516-1530.
- Sheldon, I. M., S. B. Price, J. Cronin, R. O. Gilbert and J. E. Gadsby (2009). "Mechanisms of infertility associated with clinical and subclinical endometritis in high producing dairy cattle." *Reprod Domest Anim* 44 Suppl 3: 1-9.
- Sheldon, I. M., A. N. Rycroft, B. Dogan, M. Craven, J. J. Bromfield, A. Chandler, M. H. Roberts, S. B. Price, R. O. Gilbert and 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., S. Leitao, T. Tenreiro, C. Pomba, T. Nunes, L. L. da Costa and L. Mateus (2009). "Genomic and phenotypic characterization of *Escherichia coli* isolates recovered from the uterus of puerperal dairy cows." *Journal of dairy science* 92(12): 6000-6010.
- Thatcher, W. W. and C. J. Wilcox (1973). "PP estrus as an indicator of reproductive status in the dairy cow." *J Dairy Sci* 56(5): 608-610.
- Westermann, S., M. Drillich, T. B. Kaufmann, L. V. Madoz and W. Heuwieser (2010). "A clinical approach to determine false positive findings of clinical endometritis by vaginoscopy by the use of uterine bacteriology and cytology in dairy cows." *Theriogenology* 74(7): 1248-1255.
- 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 PP vaginal mucus reflects uterine bacterial infection and the immune response in cattle." *Theriogenology* 63(1): 102-117.
- Witte, T. S., M. Iwersen, T. Kaufmann, P. Scherpenisse, A. A. Bergwerff and W. Heuwieser (2011). "Determination of ceftiofur derivatives in serum, endometrial tissue, and lochia in puerperal dairy cows after subcutaneous administration of ceftiofur crystalline free acid." *J Dairy Sci* 94(1): 284-290.

**Table 1** Prevalence of the different types of vaginal discharge at 34 DIM (EXAM1) in 992 cows and at 48 DIM (EXAM2) in 978 cows enrolled in the clinical trial.

Score	Vaginal discharge	EXAM1				EXAM2			
		Overall		CONT	CEPH	CONT		CEPH	
		n = 992	%	n = 477	n = 515	n = 468	%	n = 510	%
0	No discharge	222	22.4	104	118	124	26.5	160	31.4
1	Clear mucus	546	55.0	270	276	270	57.7	262	51.4
2	Cloudy mucus	43	4.3	23	20	19	4.1	37	7.2
	Flecks of pus	56	5.7	23	33	23	4.9	24	4.7
3	Mucopurulent	95	9.6	44	51	27	5.8	21	4.1
4	Purulent	30	3.0	13	17	5	1.1	6	1.2

Abbreviations: CONT, cows that received no treatment; CEPH, cows that received intrauterine cephalosporin treatment; DIM, days in milk;

Definitions: Clear mucus: score 1, translucent vaginal mucus clear enough to allow to see through it;

Cloudy mucus: score 2, grey vaginal mucus without flecks of pus but opaque enough that it is impossible to see through the mucus;

Flecks of pus: score 2;

Mucopurulent: score 3, mucus with 50% pus or more;

Purulent: score 4, mucus consisting only of pus.



**Table 2** Sensitivity and specificity for the threshold at each mucus grade from the vaginoscopy exam based on pregnancy rate at 120 DIM in CONT cows. The threshold for PVD at 34 and 48 DIM was cloudy mucus with or without flecks of pus.

Threshold at EXAM1	Pregnancy at 120 DIM (%)	Se	Sp	PPV	PNV	Sum Se Sp
Clear mucus	54.2	0.77	0.22	0.49	0.50	0.99
Cloudy / flecks of pus	39	0.25	0.83	0.59	0.53	1.08
Muco-purulent	40.5	0.14	0.90	0.57	0.51	1.04
Purulent	41.7	0.03	0.97	0.49	0.50	1.00

Threshold at EXAM2	Pregnancy at 120 DIM (%)	Se	Sp	PPV	PNV	Sum Se Sp
Clear mucus	54.4	0.74	0.25	0.50	0.49	0.99
Cloudy / flecks of pus	34.1	0.21	0.90	0.67	0.53	1.11
Muco-purulent	33.3	0.09	0.96	0.69	0.51	1.05
Purulent	20.0	0.02	1.00	0.80	0.50	1.01

The threshold with the higher sum of sensibility and specificity was retained. This method was used by Dubuc *et al.*, 2011.

Abbreviations: Se: Sensibility; Sp: Specificity; PPV: Predictive positive value; PNV: predictive negative value;

**Table 3** Number and percentage of isolates of pure culture (n = 287) from uterine samples taken from a subset of cows at EXAM1 (n = 527).

Bacteria	N	%
<i>Trueperella pyogenes</i>	17	6.0
<i>Escherichia coli</i>	2	0.7
<i>Bacillus</i> spp	213	75.0
Staphylococcus spp	19	6.7
Streptococcus spp	3	1.1
Other	33	11.6

**Table 4** Results for pure and mixed cultures. 356 cows (186 CEPH and 170 CONT) had positive cultures. A total of 447 cultures were positive for bacteria.

Bacteria	N	% of cows	CONT	CEPH
No growth	165	31.7	83	82
<i>Trueperella pyogenes</i>	33	6.3	14	19
<i>Escherichia coli</i>	10	1.9	5	5
<i>Bacillus</i> spp	264	50.7	125	139
Staphylococcus spp	44	8.5	18	26
Streptococcus spp	10	1.9	4	6
Other	86	16.5	42	44

Abbreviations: CONT: cows without treatment; CEPH: cows with cephalirin treatment

**Table 5** The effect of treatment, adjusted for season and parity, for PVD+/PVD+ cows on time to pregnancy up to 300 DIM.

Variable	Hazard ratio	95% CI		P-value
PVD+/PVD+	ref			
CONT				<0.05
PVD+/PVD+	1.81	1.00	3.28	
CEPH				

Abbreviations: CONT: cows without treatment; CEPH: cows with cephalirin treatment; PVD+: cows with a score of 2 or more at vaginoscopy

## Figure captions

**Figure 1.** Synchronization protocol. Timeline for treatment of PVD cows, monitoring of cure and evaluation of uterine health. At EXAM1, cows were randomly assigned to receive either cephalosporin or no treatment. PVD+ cows were defined based on the highest sum of sensitivity and specificity on pregnancy status at 120 DIM.

**Figure 2.** Survival curves for time to pregnancy up to 300 days after parturition in 477 cows based on uterine status at 34 DIM (EXAM1): CONT PVD-cows (n = 374) ( — ) and CONT PVD+ cows (n = 103) ( ●●● ). The median time to pregnancy (95% CI) was 118 (107 to 128) and 158 (130 to 204) for CONT PVD- and CONT PVD+ cows, respectively.

**Figure 3.** Survival curves for time to pregnancy up to 300 days after parturition in 468 cows based on uterine status at 48 DIM (EXAM2): CONT PVD- cows (n = 394) ( — ) and CONT PVD+ cows (n = 74) ( ●●● ). Median time to pregnancy (95% CI) was 118 (107 to 129) and 181 (145 to 218) for CONT PVD- and CONT PVD+ cows, respectively.

**Figure 4.** The cumulative proportion of cows not pregnant after diagnosis of PVD at EXAM1 and treatment with intrauterine cephalosporin. The group PVD+CONT ( ●●● ) was significantly different from the other groups (PVD+CEPH: ▲▲▲ , p = 0.02; PVD-CONT: — , p < 0.01; PVD-CEPH: - - - - , p < 0.01). The treatment improved median time

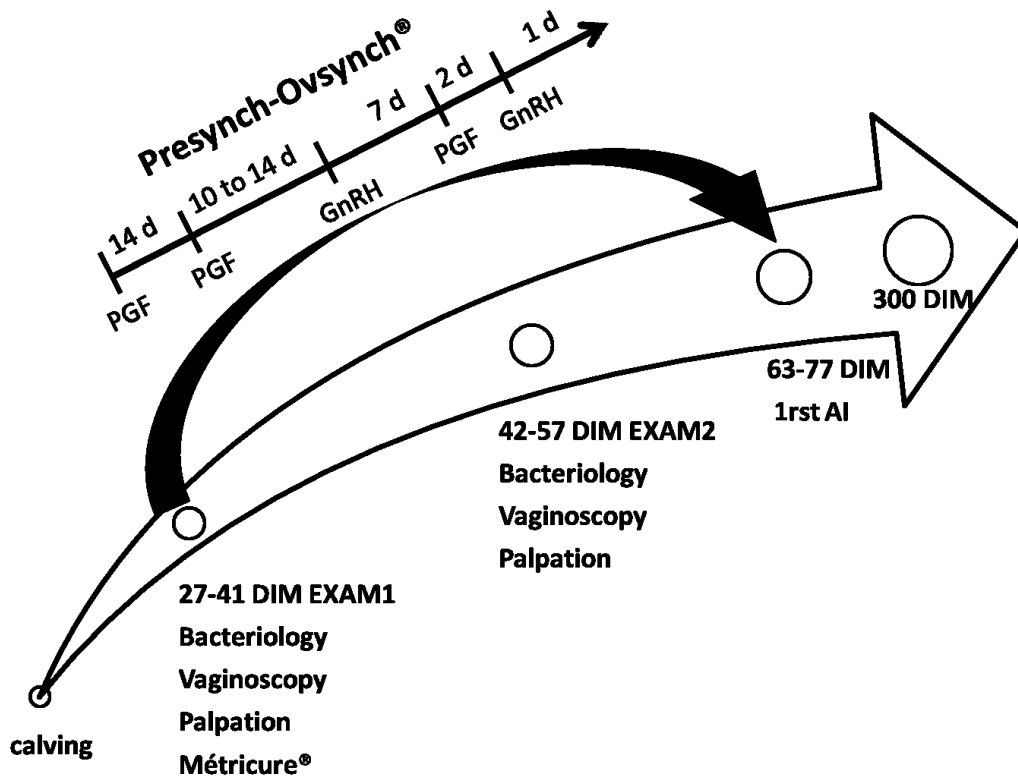
to pregnancy of PVD+ cows at 34 DIM (PVD+CONT: 158 days (95% CI: 130-203) and PVD+CEPH: 120 days (95% CI: 94-132)).

**Figure 5.** The cumulative proportion of cows not pregnant after diagnosis of PVD at EXAM2 and treatment with intrauterine cephalosporin. The group PVD+CONT ( ●-●-● ) is significantly different from the other groups (PVD+CEPH: ▲-▲-▲ , p = 0.02; PVD-CONT: — , p<0.05; PVD-CEPH: - - - - - , p = 0.01) The treatment improved median time to pregnancy for PVD+ cows at 48 DIM (PVD+CONT: 181 days (95% CI: 145-219) and PVD+CEPH: 116 days (95% CI: 98-132)).

**Figure 6.** Survival curves for time to pregnancy up to 300 days after parturition in 468 cows based on uterine status at 34 DIM and 48 DIM (EXAM1/EXAM2): CONT PVD-/PVD- cows (n = 331) ( — ), CONT PVD-/PVD+ cows (n = 36) ( - - - - - ), CONT PVD+/PVD- (n = 63) ( ▲-▲-▲ ) and CONT PVD+/PVD+ (n = 38) ( ●-●-● ). Median time to pregnancy (95% CI) for these four groups was: 116 (97 to 127), 137 (108 to 197), 130 (105 to 184) and 217 (159 to 243), respectively. There was a significant difference between PVD+/PVD+ and the other groups (see in the Results).

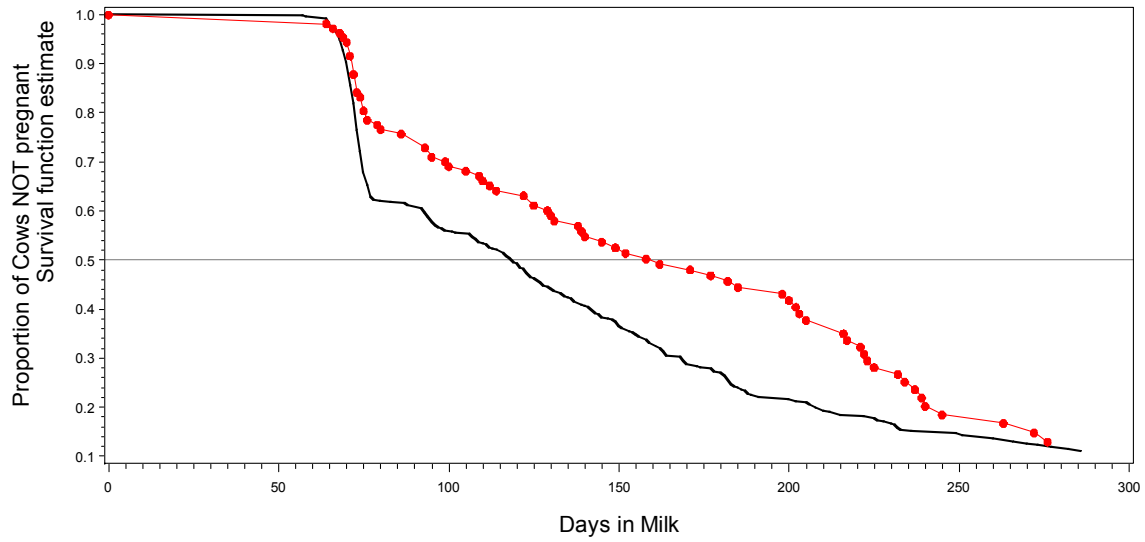
**Figure 7.** The cumulative proportion of cows not pregnant after diagnosis of PVD at the EXAM1 and EXAM2 and treatment with intrauterine Cephalosporin. CONT PVD+/PVD+ ( ●-●-● ) (n = 38) is significantly different from CEPH PVD+/PVD+ ( - - - - - ) (n = 36).

CONT PVD-/PVD-( — ) is only on the graph as a visual reference. The treatment administered at 34 DIM to cows PVD+ improved median time to pregnancy of the cows that were PVD+ again at 49 DIM (CEPH PVD+/PVD+: 132 days (95% CI: 110-176) and CONT PVD+/PVD+: 214 days (95% CI: 156-243)).

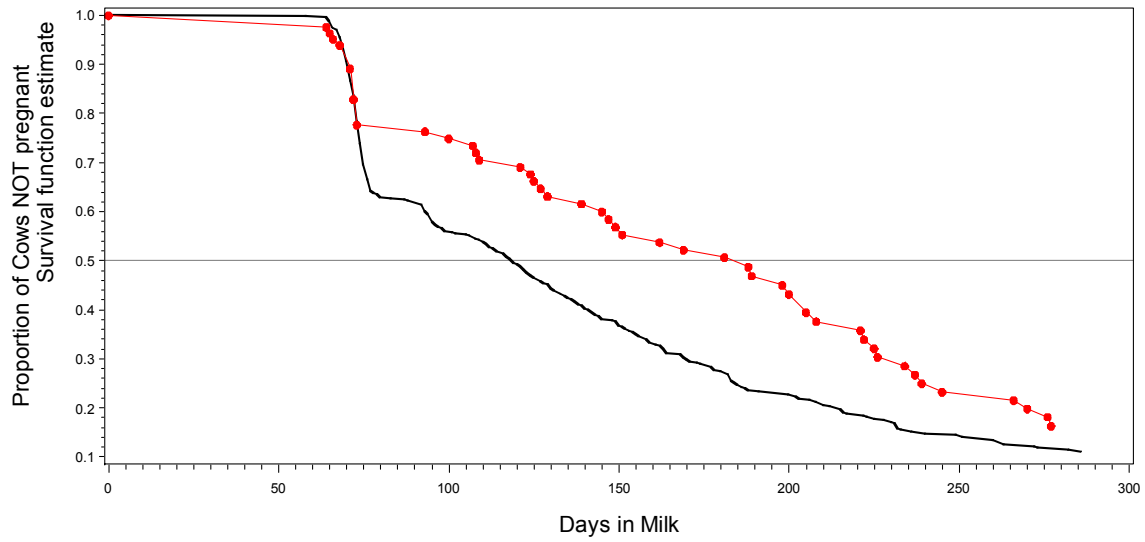


**Figure 1** Figure 1: Synchronization protocol. Timeline for treatment of PVD cows, monitoring of cure and evaluation of uterine health. At EXAM1, cows were randomly assigned to receive either cephalirin or no treatment. PVD+ cows were defined based on the highest sum of sensitivity and specificity on pregnancy status at 120 DIM.

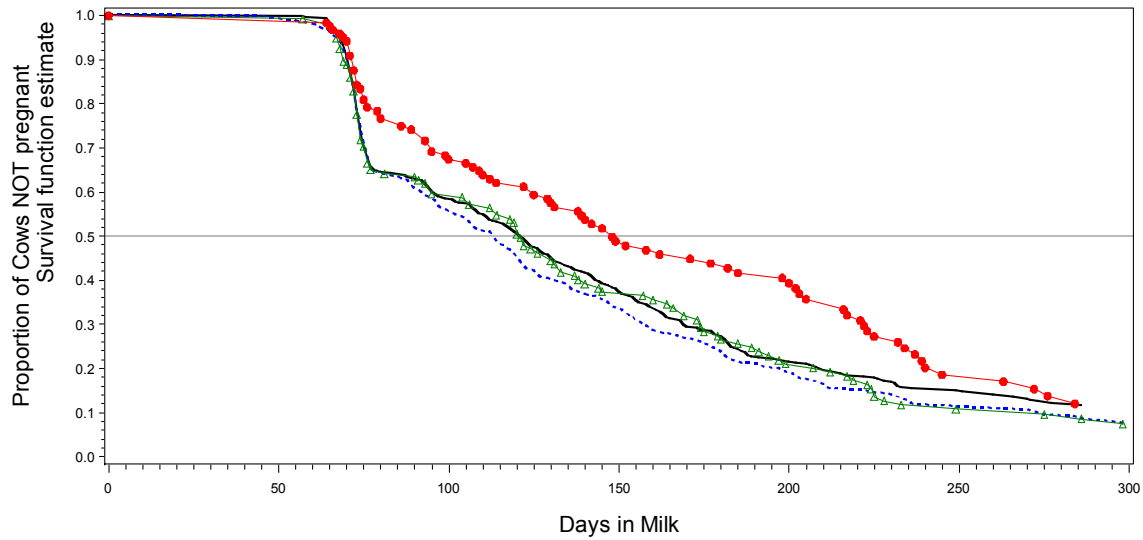




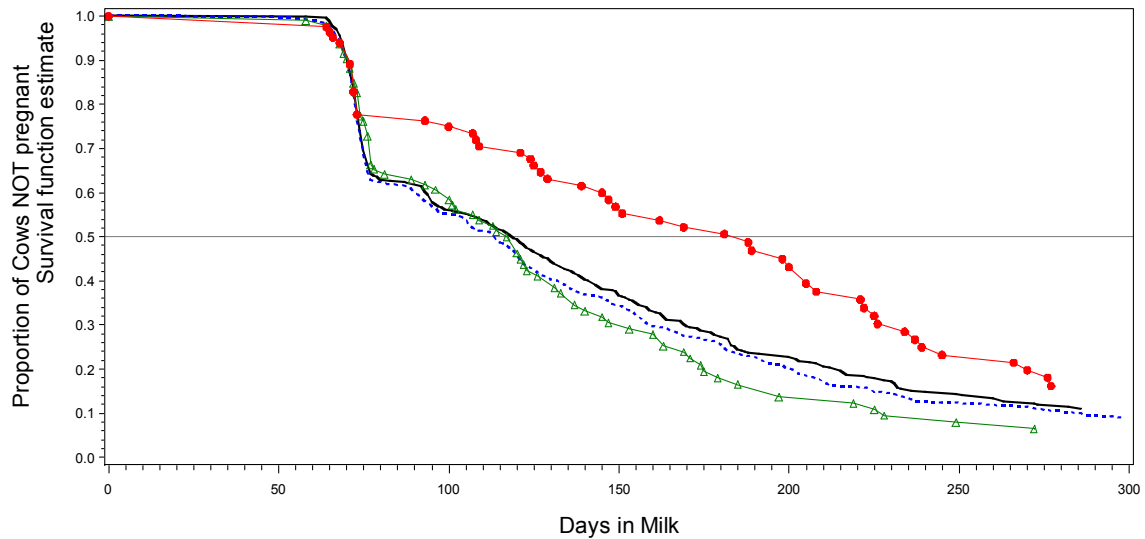
**Figure 2** Survival curves for time to pregnancy up to 300 days after parturition in 477 cows based on uterine status at 34 DIM (EXAM1): CONT PVD-cows (n = 374) ( — ) and CONT PVD+ cows (n = 103) ( ●●● ). The median time to pregnancy (95% CI) was 118 (107 to 128) and 158 (130 to 204) for CONT PVD- and CONT PVD+ cows, respectively.



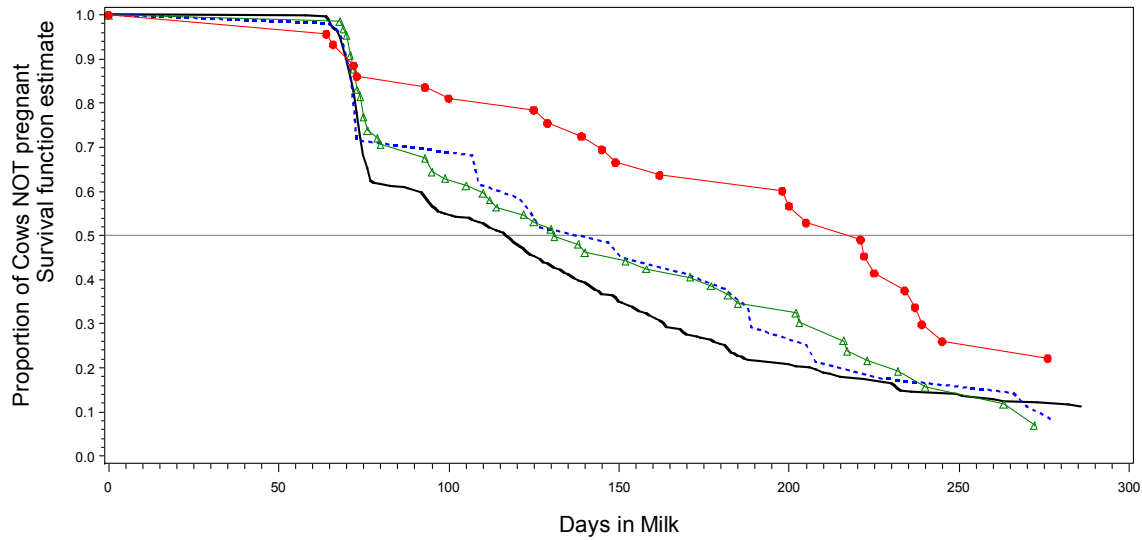
**Figure 3** Survival curves for time to pregnancy up to 300 days after parturition in 468 cows based on uterine status at 48 DIM (EXAM2): CONT PVD- cows (n = 394) ( — ) and CONT PVD+ cows (n = 74) ( ●●● ). Median time to pregnancy (95% CI) was 118 (107 to 129) and 181 (145 to 218) for CONT PVD- and CONT PVD+ cows, respectively.



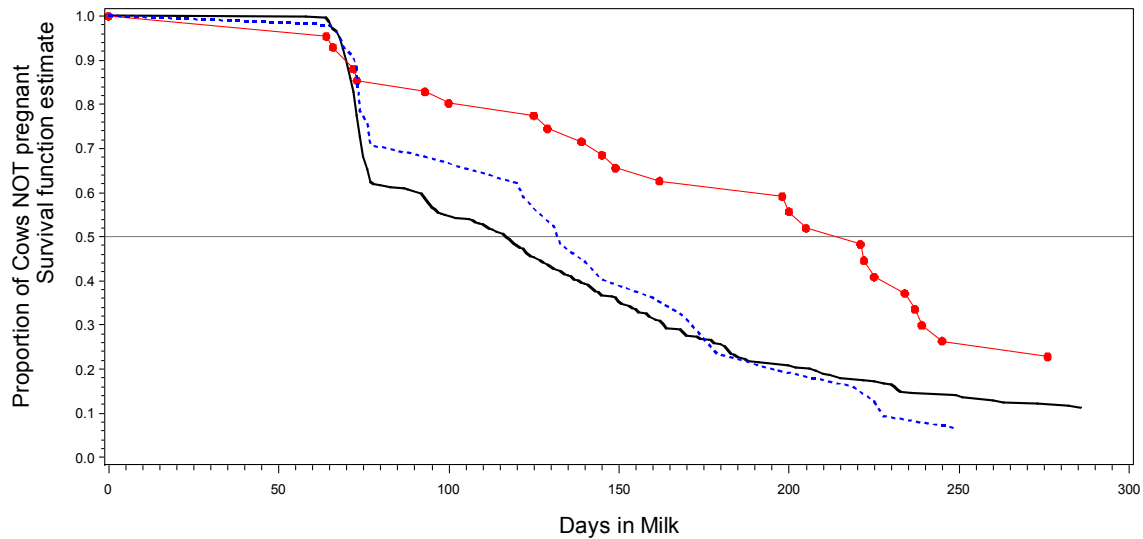
**Figure 4** The cumulative proportion of cows not pregnant after diagnosis of PVD at EXAM1 and treatment with intrauterine cephalosporin. The group PVD+CONT ( ●●● ) was significantly different from the other groups (PVD+CEPH: ▲▲▲ ,  $p = 0.02$ ; PVD-CONT: — ,  $p < 0.01$ ; PVD-CEPH: - - - - ,  $p < 0.01$ ). The treatment improved median time to pregnancy of PVD+ cows at 34 DIM (PVD+CONT: 158 days (95% CI: 130-203) and PVD+CEPH: 120 days (95% CI: 94-132)).



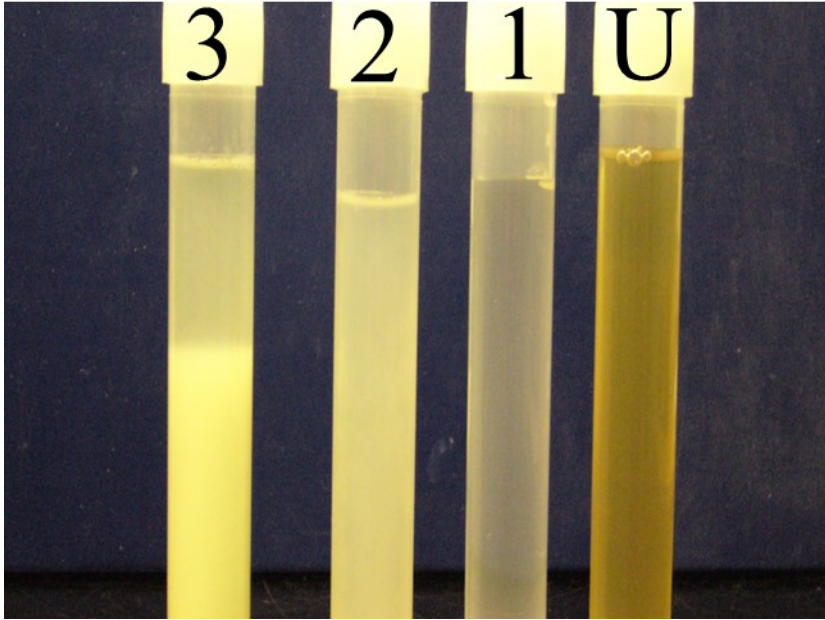
**Figure 5** The cumulative proportion of cows not pregnant after diagnosis of PVD at EXAM2 and treatment with intrauterine cephalosporin. The group PVD+CONT ( ●●● ) is significantly different from the other groups (PVD+CEPH: ▲▲▲ ,  $p = 0.02$ ; PVD-CONT: — ,  $p < 0.05$ ; PVD-CEPH: - - - - ,  $p = 0.01$ ) The treatment improved median time to pregnancy for PVD+ cows at 48 DIM (PVD+CONT: 181 days (95% CI: 145-219) and PVD+CEPH: 116 days (95% CI: 98-132)).



**Figure 6** Survival curves for time to pregnancy up to 300 days after parturition in 468 cows based on uterine status at 34 DIM and 48 DIM (EXAM1/EXAM2): CONT PVD-/PVD- cows (n = 331) ( ——— ), CONT PVD-/PVD+ cows (n = 36) ( - - - - - ), CONT PVD+/PVD- (n = 63) ( -△-△-△ ) and CONT PVD+/PVD+ (n = 38) ( ●-●-● ). Median time to pregnancy (95% CI) for these four groups was: 116 (97 to 127), 137 (108 to 197), 130 (105 to 184) and 217 (159 to 243), respectively. There was a significant difference between PVD+/PVD+ and the other groups (see in the Results).



**Figure 7** The cumulative proportion of cows not pregnant after diagnosis of PVD at the EXAM1 and EXAM2 and treatment with intrauterine Cephapirin. CONT PVD+/PVD+ ( ●—● ) (n = 38) is significantly different from CEPH PVD+/PVD+ ( - - - ) (n = 36). CONT PVD-/PVD-( — ) is only on the graph as a visual reference. The treatment administered at 34 DIM to cows PVD+ improved median time to pregnancy of the cows that were PVD+ again at 48 DIM (CEPH PVD+/PVD+: 132 days (95% CI: 110-176) and CONT PVD+/PVD+: 214 days (95% CI: 156-243)).



**Figure 8** Different vaginal discharges: 3 = mucopurulent; 2 = cloudy mucus; 1 = clear mucus;

U = Urine;

# 11 Discussion générale

La présence d'un écoulement vaginal ou cervical purulent chez une vache laitière entre 25 et 60 jours PP est systématiquement associée avec une réduction significative des performances de la reproduction. Malgré cette constante association décrite par la majorité des études réalisées dans la dernière décennie, l'effet positif d'un traitement sur les performances en reproduction reste toujours à être démontré. L'objectif central de cette étude était de démontrer l'efficacité d'un traitement intra-utérin unique chez la vache laitière souffrant d'écoulement vaginal purulent en période PP (27 à 41 jours PP). Le protocole expérimental ainsi que la minutie et la constance dans les prélèvements réalisées dans cette étude par une seule personne expérimentée, ont permis de démontrer une efficacité d'un seul traitement de céfapirine intra-utérin entre 27 et 41 jours PP. Cet effet a été défini en termes d'amélioration des performances de la reproduction chez des vaches avec des écoulements vaginaux purulents.

La démonstration de l'efficacité du traitement d'une condition pathologique est directement dépendante de la valeur du diagnostic de cette condition pathologique. Ceci permet de cibler les vaches qui bénéficieront d'un traitement. Dans la présente étude, les vaches avec des écoulements vaginaux troubles avec ou sans flocons de pus avaient des performances reproductives significativement réduites par rapport aux vaches sans écoulement ou avec un écoulement de mucus clair. Les écoulements troubles ont déjà été mentionnés dans la littérature (Knutti *et al.*, 2000), mais n'ont pas été retenus par Sheldon *et al.* (2006) pour la définition de l'endométrite et des catégories d'écoulement vaginaux. Cet écoulement trouble est probablement difficile à reconnaître en utilisant un gant lubrifié ou le Métrichек®. La vaginoscopie est une méthode d'examen du vagin et de son contenu, qui permet de distinguer ce type d'écoulement et de visualiser les écoulements provenant du col utérin. L'utilisation de la vaginoscopie dans cette étude a probablement contribué à la détection d'un effet négatif significatif des écoulements vaginaux chez les vaches laitières en période PP. Le choix du Métrichек® comme méthode d'examen vaginal est souvent favorisé par rapport à la vaginoscopie dans la prise de décision de traitement. Mais, dans les études démontrant une efficacité du traitement de céfapirine intra-utérin chez les vaches atteintes d'endométrite



clinique, l'outil diagnostique était la vaginoscopie (LeBlanc *et al.*, 2002b; Runciman *et al.*, 2009; Runciman *et al.*, 2008a). Dans de l'étude de Runciman *et al.* (2009), les deux méthodes ont été utilisées, et le traitement de céfapirine avait un effet statistiquement significatif uniquement dans le groupe de animaux diagnostiqués avec un vaginoscope.

La contamination de l'utérus par des bactéries immédiatement après le vêlage est très bien documentée et elle est généralement éliminée en même temps que l'inflammation endométriale environ 4 semaines PP. Après cette période, la persistance des bactéries utérines et/ou de l'inflammation endométriale est associée avec une endométrite chronique et/ou des écoulements vaginaux purulents (Walsh *et al.*, 2011). Il semble donc rationnelle de proposer un traitement de cette condition pathologique dans cette fenêtre de temps en période postpartum. LeBlanc *et al.*, (LeBlanc *et al.*, 2002b) n'a mesuré aucun effet positif d'un traitement de céfapirine intra-utérin avant 27 jours PP. Dans un système de vêlage saisonnier, Runciman *et al.* (2009; 2008a) a rapporté une amélioration des performances en reproduction des vaches dont les écoulements vaginaux contenaient du matériel purulent. Dans la présente étude, le traitement de céfapirine intra-utérin apporte une amélioration claire et évidente des performances reproductrices pour les vaches avec des écoulements vaginaux troubles avec ou sans de matériel purulent entre 27 et 41 jours PP (moyenne de 34 jours). L'amélioration du taux de conception à la première insémination après l'utilisation d'un protocole de synchronisation œstrale systématique est probablement la meilleure façon d'évaluer l'efficacité d'un traitement (Lefebvre et Stock, 2012). L'utilisation d'un antibiotique permet de contrôler la population bactérienne, il est donc utile dans le cas où la balance entre le système immunitaire et la pression d'infection est déséquilibrée. Le moment idéal de l'administrer reste encore à discuter. L'antibiotique serait sûrement bénéfique au début du déséquilibre, avant que le système inflammatoire, trop stimulé, n'entraîne des lésions tissulaires néfastes au fonctionnement de l'organe. Malheureusement, à l'heure actuelle, il n'y a pas d'outils pratiques qui permettent de faire la différence, en PP, entre une inflammation physiologique bénéfique et l'inflammation pathologique d'un système immunitaire en perte de contrôle. Ceci rejoint les observations de cette étude sur le groupe de vaches considérées comme cliniquement guérie. Ces vaches montrent des performances en reproduction améliorées par rapport aux vaches non guéries cliniquement, sans toutefois être au même

niveau que les vaches n'ayant pas eu d'écoulements vaginaux considérés comme problématiques au cours des 2 examens cliniques.

Le traitement de céfapirine n'améliore pas le pourcentage de guérison clinique. Toutefois, les vaches avec des écoulements vaginaux considérés comme problématique au deuxième examen clinique, bénéficie du traitement reçu 2 semaines auparavant, en ayant des performances à la reproduction améliorée en comparaison au groupe témoin. La guérison clinique après 2 semaines, comme critère d'évaluation d'un traitement ne semble pas être une méthode appropriée.

L'hypothèse selon laquelle, les vaches sans écoulements vaginaux à 34 jours PP devraient être considérées différemment des vaches avec un écoulement de mucus clair, est réfutée par cette étude. Il n'y a aucune différence entre ces groupes en ce qui concerne les performances en reproduction.

Dans cette étude, l'effet bénéfique de céfapirine a aussi été regardé pour la définition proposée par Sheldon *et al.* (2006). L'effet de la céfapirine sur l'endométrite clinique basée sur des écoulements vaginaux muco-purulents ou purulents, n'est pas suffisamment important pour être significatif. Une hypothèse est qu'à ce grade d'inflammation, la céfapirine ne permet pas, à elle seule, de rétablir l'équilibre immunité/pression d'infection dans le cas où des bactéries sont la cause de cet inflammation. Ou bien, que l'inflammation, en absence de bactérie, est hors contrôle et le déséquilibre se situe entre facteurs pro- et anti-inflammatoire. Dans ces 2 cas, il serait, peut-être, intéressant de pratiquer un lavage utérin. En faisant un lavage utérin, le col de l'utérus et le vagin seront aussi nettoyés, ainsi, la pression d'infection ou la présence de substances pro-inflammatoires seront réduites permettant éventuellement de rééquilibrer la balance. Il serait intéressant d'analyser l'effet potentiel de la céfapirine après cette manipulation sur les performances en reproduction.

Les résultats de bactériologie sont comparables avec les données de 2 études (Galvao, Greco, *et al.*, 2009; McDougall *et al.*, 2011). *Trueperella pyogenes* et *E. coli* se retrouvent chez 6% et 2% des animaux à 34 jours PP. Dans les autres études, les prévalences varient entre 6.3 et 9.9% pour *T. pyogenes* et 7.9 et 4.6 pour *E. coli* pour des prélèvements faits entre 28 et 42 jours PP (McDougall *et al.*, 2011). Et pour des vaches à 51 jours PP, les valeurs sont

4.5 % et 2.5% respectivement (Galvao, Greco, *et al.*, 2009). La grande différence porte sur la prévalence de *E. coli*, la prévalence de l'étude est nettement inférieure à ce qu'elle devrait être. La technique utilisée est peut-être à mettre en cause. La désinfection à l'alcool des canules entre les vaches, a pu diminuer la capacité de croissance des bactéries. Bien que la canule fût secouée vigoureusement et qu'elle ne fût pas utilisée immédiatement après, l'évaporation de l'alcool n'était peut-être pas optimale. Lors de l'échantillonnage, une fois la canule en place dans l'utérus, 2 frottis à l'aide de cytobrosses étaient réalisés. Une amélioration aurait pu être d'utiliser la première cytobrosse pour la cytologie et ensuite la seconde pour la bactériologie. Cet ordre n'avait pas été essayé de peur d'augmenter le risque de contamination bactérienne environnementale de la cytobrosse lors de la manipulation. Au niveau du transport entre les fermes et le laboratoire d'analyse, un milieu de transport aurait pu s'avérer utile. En effet, la cytobrosse était placée dans un tube sec et amené au laboratoire soit en fin de matinée, soit en fin d'après-midi. Il se peut que des échantillons amenés en fin d'après-midi n'aient pas été mis en culture le jour même.

En ce qui concerne l'analyse bactériologique, des cultures bactériologiques de routine ont été réalisées et les bactéries anaérobies n'ont donc pas pu être mises en évidence. Or entre 28 et 42 jours, la prévalence des bactéries anaérobies considérées comme potentiellement pathogènes : *Fusobacterium necrophorum* et *Prevotella melanigenica* était respectivement de l'ordre de 10% et 20%. Ainsi, avec nos résultats, il n'est pas possible de comparer objectivement la croissance d'un type de bactérie face à l'absence de croissance bactérienne, puisque l'absence de croissance n'implique pas l'absence de bactérie.

Comme critique au protocole de l'étude, les calculs d'échantillonnage préliminaires à la mise en place du projet demandaient des groupes de taille de 149 animaux dans l'optique d'avoir une puissance de 80%. Un nombre de prélèvements avait été estimé à 1380 vaches afin de répondre ces exigences en tenant compte d'une perte de données d'environ 15%. Malheureusement, l'expérience n'a pas pu aller jusqu'au bout et le nombre d'animaux se retrouve être légèrement inférieur à ce qui était prévu. À 34 jours PP, le groupe avec le traitement est au nombre de 121 mais le groupe témoin, lui, ne contient que 103 animaux. L'effet obtenu du traitement est supérieur à ce qui était attendu, ce qui nous permet donc d'avoir des résultats significatifs. C'est au niveau de l'analyse à 49 jours PP où le manque

d'animaux est plus conséquent. Il aurait aussi été intéressant de prévoir une étude en tenant compte des parités, afin d'avoir l'effet de l'endométrite et l'effet du traitement sur les primipares en comparaison aux pluripares. Enfin, étant donné l'impact négatif de la progestérone sur le système immunitaire, un examen entre la deuxième et la quatrième semaine PP aurait pu apporter des informations intéressantes avec notamment un dosage de la progestérone. Ce dosage pourrait peut-être encore mieux guider la décision ultérieure d'appliquer un traitement. La progestérone peut être évalué dans le lait, son dosage pourrait, s'il s'avère intéressant, devenir un indicateur sur la ferme dans le choix d'un protocole.

## **Conclusion**

Suite aux résultats de l'étude, au stade actuel de notre connaissance et des moyens disponibles pour les vétérinaires, il est recommandé de mettre en place un suivi systématique des écoulements vaginaux pour les vaches laitières aux environs de 30 jours PP. L'utilisation d'un vaginoscope permet de sélectionner les animaux dont un traitement de céfapirine améliorera significativement leurs performances en reproduction. Le seuil diagnostique pour appliquer le traitement de céfapirine intra-utérin est la présence d'un mucus trouble avec ou sans flocons de pus. L'absence de guérison clinique 2 semaines après l'application de céfapirine intra-utérine, ne signifie pas un manque d'efficacité sur les performances en reproduction ultérieures.

## Bibliographie

- Archbald, L. F., Schultz, R. H., Zemjanis, R., Kurtz, H. J. et Fahning, M. L. (1972). SEQUENTIAL HISTOLOGICAL STUDY OF POSTPARTUM BOVINE UTERUS. *Journal of Reproduction and Fertility*, 29(1), 133-&.
- Arlt, S., Padberg, W., Drillich, M. et Heuwieser, W. (2009). Efficacy of homeopathic remedies as prophylaxis of bovine endometritis. *Journal of dairy science*, 92(10), 4945-4953. doi: 10.3168/jds.2009-2142
- Barlund, C. S., Carruthers, T. D., Waldner, C. L. et Palmer, C. W. (2008). A comparison of diagnostic techniques for postpartum endometritis in dairy cattle. *Theriogenology*, 69(6), 714-723. doi: 10.1016/j.theriogenology.2007.12.005
- Barone, R. (1990). *Anatomie comparée des mammifères domestiques*. (2<sup>e</sup> éd.).
- Bartlett, P. C., Kirk, J. H., Wilke, M. A., Kaneene, J. B. et Mather, E. C. (1986). Metritis Complex in Michigan Holstein-Friesian Cattle - Incidence, Descriptive Epidemiology and Estimated Economic-Impact. *Preventive Veterinary Medicine*, 4(3), 235-248.
- Baumann, H. et Gauldie, J. (1994). The Acute-Phase Response. *Immunology Today*, 15(2), 74-80. doi: Doi 10.1016/0167-5699(94)90137-6
- Beutler, B. (2004). Innate immunity: an overview. *Mol Immunol*, 40(12), 845-859.
- Bittar, J. H., Pinedo, P. J., Risco, C. A., Santos, J. E., Thatcher, W. W., Hencken, K. E., . . . Galvao, K. N. (2014). Inducing ovulation early postpartum influences uterine health and fertility in dairy cows. *J Dairy Sci*, 97(6), 3558-3569. doi: 10.3168/jds.2013-7533
- Black, W. D., Mackay, A. L., Doig, P. A. et Claxton, M. J. (1979). Study of Drug Residues in Milk Following Intra-Uterine Infusion of Antibacterial Drugs in Lactating Cows. *Canadian Veterinary Journal-Revue Veterinaire Canadienne*, 20(12), 354-357.
- Bondurant, R. H. (1999). Inflammation in the bovine female reproductive tract. *J Anim Sci*, 77 Suppl 2, 101-110.
- Bonnett, B. N., Martin, S. W., Gannon, V. P., Miller, R. B. et Etherington, W. G. (1991). Endometrial biopsy in Holstein-Friesian dairy cows. III. Bacteriological analysis and correlations with histological findings. *Can J Vet Res*, 55(2), 168-173.
- Bonnett, B. N., Martin, S. W. et Meek, A. H. (1993). Associations of Clinical Findings, Bacteriological and Histological Results of Endometrial Biopsy with Reproductive-Performance of Postpartum Dairy-Cows. *Preventive Veterinary Medicine*, 15(2-3), 205-220. doi: Doi 10.1016/0167-5877(93)90114-9

- Bonnett, B. N., Miller, R. B., Etherington, W. G., Martin, S. W. et Johnson, W. H. (1991). Endometrial biopsy in Holstein-Friesian dairy cows. I. Technique, histological criteria and results. *Can J Vet Res*, 55(2), 155-161.
- Bonnett, B. N., Miller, R. B., Martin, S. W., Etherington, W. G. et Buckrell, B. C. (1991). Endometrial biopsy in Holstein-Friesian dairy cows. II. Correlations between histological criteria. *Can J Vet Res*, 55(2), 162-167.
- Bretzlaff, K. (1987). Rationale for treatment of endometritis in the dairy cow. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 3(3), 593-607.
- Brick, T. A., Schuenemann, G. M., Bas, S., Daniels, J. B., Pinto, C. R., Rings, D. M. et Rajala-Schultz, P. J. (2012). Effect of intrauterine dextrose or antibiotic therapy on reproductive performance of lactating dairy cows diagnosed with clinical endometritis. *Journal of dairy science*, 95(4), 1894-1905. doi: 10.3168/jds.2011-4892
- Burton, N. R. et Lean, I. J. (1995). Investigation by meta-analysis of the effect of prostaglandin F2 alpha administered post partum on the reproductive performance of dairy cattle. *Vet Rec*, 136(4), 90-94.
- Cai, T. Q., Weston, P. G., Lund, L. A., Brodie, B., McKenna, D. J. et Wagner, W. C. (1994). Association between neutrophil functions and periparturient disorders in cows. *Am J Vet Res*, 55(7), 934-943.
- Cairolì, F., Battocchio, M., Veronesi, M. C., Brambilla, D., Conserva, F., Eberini, I., . . . Gianazza, E. (2006). Serum protein pattern during cow pregnancy: Acute-phase proteins increase in the peripartum period. *Electrophoresis*, 27(8), 1617-1625. doi: DOI 10.1002/elps.200500742
- Carleton, C. L., Threlfall, W. R. et Schwarze, R. A. (2008). Iodine in milk and serum following intrauterine infusion of Lugol's solution. *International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine*, 6(2), 121-129.
- Chapwanya, A., Meade, K. G., Doherty, M. L., Callanan, J. J., Mee, J. F. et O'Farrelly, C. (2009). Histopathological and molecular evaluation of Holstein-Friesian cows postpartum: Toward an improved understanding of uterine innate immunity. *Theriogenology*, 71(9), 1396-1407. doi: DOI 10.1016/j.theriogenology.2009.01.006
- Chapwanya, A., Meade, K. G., Narciandi, F., Stanley, P., Mee, J. F., Doherty, M. L., . . . O'Farrelly, C. (2010). Endometrial biopsy: a valuable clinical and research tool in bovine reproduction. *Theriogenology*, 73(7), 988-994. doi: DOI 10.1016/j.theriogenology.2009.11.015
- Chastant-Maillard, S. (2013). Impact of Bovine Herpesvirus 4 (BoHV-4) on Reproduction. *Transbound Emerg Dis*. doi: 10.1111/tbed.12155

- Cheong, S. H., Nydam, D. V., Galvao, K. N., Crosier, B. M., Ricci, A., Caixeta, L. S., . . . Gilbert, R. O. (2012). Use of reagent test strips for diagnosis of endometritis in dairy cows. *Theriogenology*, 77(5), 858-864. doi: 10.1016/j.theriogenology.2011.09.009
- Chirife, J., Herszage, L., Joseph, A. et Kohn, E. S. (1983). In vitro study of bacterial growth inhibition in concentrated sugar solutions: microbiological basis for the use of sugar in treating infected wounds. *Antimicrob Agents Chemother*, 23(5), 766-773.
- Christie, G. J. et Strom, P. W. (1976). Sodium cephalosporin: a new treatment for mastitis. *Veterinary medicine, small animal clinician : VM, SAC*, 71(4), 429-432.
- Cole, H. H. (1930). A study of the mucosa of the genital tract of the cow, with special reference to the cyclic changes. *American Journal of Anatomy*, 46(2), 261-301. doi: 10.1002/aja.1000460204
- Couto, G. B., Vaillancourt, D. H. et Lefebvre, R. C. (2012). Comparison of a leukocyte esterase test with endometrial cytology for diagnosis of subclinical endometritis in postpartum dairy cows. *Theriogenology*. doi: 10.1016/j.theriogenology.2012.09.014
- Dashow, E. E., Read, J. A. et Coleman, F. H. (1986). Randomized comparison of five irrigation solutions at cesarean section. *Obstetrics and gynecology*, 68(4), 473-478.
- Davies, D., Meade, K. G., Herath, S., Eckersall, P. D., Gonzalez, D., White, J. O., . . . Sheldon, I. M. (2008). Toll-like receptor and antimicrobial peptide expression in the bovine endometrium. *Reprod Biol Endocrinol*, 6, 53. doi: 10.1186/1477-7827-6-53
- Deguillaume, L. (2010). L'inflammation génitale post-partum de la vache. Veterinary medicine and animal Health. AgroParisTech, 2010. French. <NNT : 2010AGPT0081>. <pastel-00591104>. *Veterinary medicine and animal Health. AgroParisTech*.
- Deguillaume, L., Geffre, A., Desquilbet, L., Dizien, A., Thoumire, S., Vorniere, C., . . . Chastant-Maillard, S. (2012). Effect of endocervical inflammation on days to conception in dairy cows. *Journal of dairy science*, 95(4), 1776-1783. doi: 10.3168/jds.2011-4602
- Dhaliwal, G. S., Murray, R. D., Dobson, H., Montgomery, J. et Ellis, W. A. (1996). Presence of antigen and antibodies in serum and genital discharges of cows from dairy herds naturally infected with *Leptospira interrogans* serovar hardjo. *Res Vet Sci*, 60(2), 163-167.
- Dohmen, M. J. W., Lohuis, J. A. C. M., Huszenicza, G., Nagy, P. et Gacs, M. (1995). The Relationship between Bacteriological and Clinical Findings in Cows with Subacute Chronic Endometritis. *Theriogenology*, 43(8), 1379-1388. doi: Doi 10.1016/0093-691x(95)00123-P



- Donofrio, G., Herath, S., Sartori, C., Cavirani, S., Flammini, C. F. et Sheldon, I. M. (2007). Bovine herpesvirus 4 is tropic for bovine endometrial cells and modulates endocrine function. *Reproduction*, *134*(1), 183-197. doi: 10.1530/REP-07-0065
- Donofrio, G., Ravanetti, L., Cavirani, S., Herath, S., Capocefalo, A. et Sheldon, I. M. (2008). Bacterial infection of endometrial stromal cells influences bovine herpesvirus 4 immediate early gene activation: a new insight into bacterial and viral interaction for uterine disease. *Reproduction*, *136*(3), 361-366. doi: 10.1530/rep-08-0171
- Drillich, M., Beetz, O., Pfutzner, A., Sabin, M., Sabin, H. J., Kutzer, P., . . . Heuwieser, W. (2001). Evaluation of a systemic antibiotic treatment of toxic puerperal metritis in dairy cows. *J Dairy Sci*, *84*(9), 2010-2017. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(01)74644-9
- Drillich, M., Raab, D., Wittke, M. et Heuwieser, W. (2005). Treatment of chronic endometritis in dairy cows with an intrauterine application of enzymes. A field trial. *Theriogenology*, *63*(7), 1811-1823. doi: 10.1016/j.theriogenology.2004.05.031
- Dubuc, J., Duffield, T. F., Leslie, K. E., Walton, J. S. et LeBlanc, S. J. (2010a). Definitions and diagnosis of postpartum endometritis in dairy cows. *Journal of dairy science*, *93*(11), 5225-5233. doi: 10.3168/jds.2010-3428
- Dubuc, J., Duffield, T. F., Leslie, K. E., Walton, J. S. et LeBlanc, S. J. (2010b). Risk factors for postpartum uterine diseases in dairy cows. *Journal of dairy science*, *93*(12), 5764-5771. doi: 10.3168/jds.2010-3429
- Dubuc, J., Duffield, T. F., Leslie, K. E., Walton, J. S. et Leblanc, S. J. (2011). Randomized clinical trial of antibiotic and prostaglandin treatments for uterine health and reproductive performance in dairy cows. *Journal of dairy science*, *94*(3), 1325-1338. doi: 10.3168/jds.2010-3757
- Edqvist, L. E., Kindahl, H. et Stabenfeldt, G. (1978). Release of prostaglandin F 2alpha during the bovine peripartal period. *Prostaglandins*, *16*(1), 111-119.
- Faul, F., Erdfelder, E., Lang, A. G. et Buchner, A. (2007). G\*Power 3: A flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behavior Research Methods*, *39*(2), 175-191. doi: Doi 10.3758/Bf03193146
- Feldmann, M., Tenhagen genannt Emming, S. et Hoedemaker, M. (2005). [Treatment of chronic bovine endometritis and factors for treatment success]. *Dtsch Tierarztl Wochenschr*, *112*(1), 10-16.
- Foldi, J., Kulcsar, M., Pecs, A., Huyghe, B., de Sa, C., Lohuis, J. A., . . . Huszenicza, G. (2006). Bacterial complications of postpartum uterine involution in cattle. *Anim Reprod Sci*, *96*(3-4), 265-281. doi: 10.1016/j.anireprosci.2006.08.006
- Gabler, C., Fischer, C., Drillich, M., Einspanier, R. et Heuwieser, W. (2010). Time-dependent mRNA expression of selected pro-inflammatory factors in the endometrium of

primiparous cows postpartum. *Reprod Biol Endocrinol*, 8, 152. doi: 10.1186/1477-7827-8-152

Galvao, K. N., Flaminio, M. J. B. F., Brittin, S. B., Sper, R., Fraga, M., Caixeta, L., . . . Gilbert, R. O. (2010). Association between uterine disease and indicators of neutrophil and systemic energy status in lactating Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 93(7), 2926-2937. doi: DOI 10.3168/jds.2009-2551

Galvao, K. N., Frajblat, M., Brittin, S. B., Butler, W. R., Guard, C. L. et Gilbert, R. O. (2009). Effect of prostaglandin F2alpha on subclinical endometritis and fertility in dairy cows. *Journal of dairy science*, 92(10), 4906-4913. doi: 10.3168/jds.2008-1984

Galvao, K. N., Greco, L. F., Vilela, J. M., Sa, M. F. et Santos, J. E. P. (2009). Effect of intrauterine infusion of ceftiofur on uterine health and fertility in dairy cows. *Journal of dairy science*, 92(4), 1532-1542. doi: DOI 10.3168/jds.2008-1615

Gautam, G., Nakao, T., Koike, K., Long, S. T., Yusuf, M., Ranasinghe, R. M. et Hayashi, A. (2010). Spontaneous recovery or persistence of postpartum endometritis and risk factors for its persistence in Holstein cows. *Theriogenology*, 73(2), 168-179. doi: 10.1016/j.theriogenology.2009.08.010

Ghasemi, F. (2011). Characterization of endometritis in postpartum dairy cows.

Ghasemi, F., Gonzalez-Cano, P., Griebel, P. J. et Palmer, C. (2012). Proinflammatory cytokine gene expression in endometrial cytobrush samples harvested from cows with and without subclinical endometritis. *Theriogenology*, 78(7), 1538-1547. doi: DOI 10.1016/j.theriogenology.2012.06.022

Gier, H. T. et Marion, G. B. (1968). Uterus of Cow after Parturition - Involutional Changes. *American Journal of Veterinary Research*, 29(1), 83-&.

Gilbert, R. O. et Schwark, W. S. (1992). Pharmacological Considerations in the Management of Peripartum Conditions in the Cow. *Veterinary Clinics of North America-Food Animal Practice*, 8(1), 29-56.

Goldsby, R. A. (2003). *Immunologie : le cours de Janis Kuby : avec questions de révision*. Paris: Paris : Dunod.

Goshen, T., Galon, N., Arazi, A. et Shpigel, N. Y. (2012). The Effect of Uterine Biopsy on Reproductive Performance of Dairy Cattle: A Case-Control Study. *Israel Journal of Veterinary Medicine*, 67(1), 34-38.

Griffin, J. F. T., Hartigan, P. J. et Nunn, W. R. (1974). Non-specific uterine infection and bovine fertility: I. Infection patterns and endometritis during the first seven weeks post-partum. *Theriogenology*, 1(3), 91-106.

- Guidry, A. J., Paape, M. J. et Pearson, R. E. (1976). Effects of parturition and lactation on blood and milk cell concentrations, corticosteroids, and neutrophil phagocytosis in the cow. *Am J Vet Res*, 37(10), 1195-1200.
- Haimerl, P., Arlt, S. et Heuwieser, W. (2012). Evidence-based medicine: quality and comparability of clinical trials investigating the efficacy of prostaglandin F(2alpha) for the treatment of bovine endometritis. *J Dairy Res*, 79(3), 287-296. doi: 10.1017/S002202991200012X
- Hammon, D. S., Evjen, I. M., Dhiman, T. R., Goff, J. P. et Walters, J. L. (2006). Neutrophil function and energy status in Holstein cows with uterine health disorders. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 113(1-2), 21-29. doi: DOI 10.1016/j.vetimm.2006.03.022
- Hendricks, K. E., Bartolome, J. A., Melendez, P., Risco, C. et Archbald, L. F. (2006). Effect of repeated administration of PGF2alpha in the early post partum period on the prevalence of clinical endometritis and probability of pregnancy at first insemination in lactating dairy cows. *Theriogenology*, 65(8), 1454-1464. doi: 10.1016/j.theriogenology.2005.08.018
- Hepplmann, M., Brömming, A., Weinert, M., Piechotta, M., Wrenzycki, C. et Bollwein, H. (2013). Effect of postpartum suppression of ovulation on uterine involution in dairy cows. *Theriogenology*, 80(5), 519-525.
- Herath, S., Dobson, H., Bryant, C. E. et Sheldon, I. M. (2006). Use of the cow as a large animal model of uterine infection and immunity. *J Reprod Immunol*, 69(1), 13-22. doi: 10.1016/j.jri.2005.09.007
- Herath, S., Lilly, S. T., Santos, N. R., Gilbert, R. O., Goetze, L., Bryant, C. E., . . . Sheldon, I. M. (2009). Expression of genes associated with immunity in the endometrium of cattle with disparate postpartum uterine disease and fertility. *Reprod Biol Endocrinol*, 7, 55. doi: 10.1186/1477-7827-7-55
- Hibbs, M. S., Mainardi, C. L. et Kang, A. H. (1982). Type-specific collagen degradation by eosinophils. *Biochem J*, 207(3), 621-624.
- Hill, J. et Gilbert, R. (2008). Reduced quality of bovine embryos cultured in media conditioned by exposure to an inflamed endometrium. *Aust Vet J*, 86(8), 312-316. doi: 10.1111/j.1751-0813.2008.00326.x
- Hirsbrunner, G., Kupfer, U., Burkhardt, H. et Steiner, A. (1998). Effect of different prostaglandins on intrauterine pressure and uterine motility during diestrus in experimental cows. *Theriogenology*, 50(3), 445-455.
- Hoedemaker, M. (1998). Postpartal pathological vaginal discharge: To treat or not to treat? *Reproduction in Domestic Animals*, 33(3-4), 141-146.

- Hussain, A. M. (1989). Bovine uterine defense mechanisms: a review. *Zentralbl Veterinarmed B*, 36(9), 641-651.
- Hussain, A. M., Daniel, R. C. W. et O'Boyle, D. (1990). Postpartum uterine flora following normal and abnormal puerperium in cows. *Theriogenology*, 34(2), 291-302.
- Husted, J. R. (2003). Bacterial and fungal organisms in the vagina of normal cows and cows with vaginitis. Master's thesis, Texas A&M University. *Texas A&M University*.
- Jeremejeva, J., Orro, T., Valdmann, M. et Kask, K. (2010). Bacteriological and cytological findings during the late puerperal period after two different treatments of retained placenta followed by acute puerperal metritis. *Acta Vet Scand*, 52, 41.
- Kasimanickam, R., Duffield, T. F., Foster, R. A., Gartley, C. J., Leslie, K. E., Walton, J. S. et Johnson, W. H. (2004). Endometrial cytology and ultrasonography for the detection of subclinical endometritis in postpartum dairy cows. *Theriogenology*, 62(1-2), 9-23.
- Kasimanickam, R., Duffield, T. F., Foster, R. A., Gartley, C. J., Leslie, K. E., Walton, J. S. et Johnson, W. H. (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., Duffield, T. F., Foster, R. A., Gartley, C. J., Leslie, K. E., Walton, J. S. et Johnson, W. H. (2005b). 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.
- Kaufmann, T. B., Drillich, M., Tenhagen, B. A., Forderung, D. et Heuwieser, W. (2009). Prevalence of bovine subclinical endometritis 4 h after insemination and its effects on first service conception rate. *Theriogenology*, 71(2), 385-391.
- Kaufmann, T. B., Westermann, S., Drillich, M. et Heuwieser, W. (2009). Treatment of chronic endometritis with a systemic application of ceftiofur or prostaglandin F-2 alpha. *Reproduction in Domestic Animals*, 44, 18-19.
- Kaufmann, T. B., Westermann, S., Drillich, M., Plontzke, J. et Heuwieser, W. (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., Leslie, K. E., Etherington, W. G., Bonnett, B. N. et Walton, J. S. (1991). Accuracy of rectal palpation and of a rapid milk progesterone enzyme-immunoassay for determining the presence of a functional corpus luteum in subestrus dairy cows. *Can Vet J*, 32(5), 286-291.
- Kim, I. H., Na, K. J. et Yang, M. P. (2005). Immune responses during the peripartum period in dairy cows with postpartum endometritis. *J Reprod Dev*, 51(6), 757-764.

- Kimura, K., Goff, J. P., Kehrli, M. E., Jr. et Reinhardt, T. A. (2002). Decreased neutrophil function as a cause of retained placenta in dairy cattle. *Journal of dairy science*, 85(3), 544-550.
- King, S. S., Young, D. A., Nequin, L. G. et Carnevale, E. M. (2000). Use of specific sugars to inhibit bacterial adherence to equine endometrium in vitro. *Am J Vet Res*, 61(4), 446-449.
- Klucinski, W., Targowski, S. P., Winnicka, A. et Miernik-Degorska, E. (1990). Immunological induction of endometritis-model investigations in cows. *Zentralbl Veterinarmed A*, 37(2), 148-153.
- Klucinski, W., Targowski, S. P., Winnicka, A. et Miernikdegorska, E. (1990). Immunological Induction of Endometritis-Model Investigations in Cows. *Journal of Veterinary Medicine Series a-Zentralblatt Fur Veterinarmedizin Reihe a-Physiology Pathology Clinical Medicine*, 37(2), 148-153.
- Knutti, B., Kupfer, U. et Busato, A. (2000). Reproductive efficiency of cows with endometritis after treatment with intrauterine infusions or prostaglandin injections, or no treatment. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med*, 47(10), 609-615.
- LeBlanc, S. J. (2008). Postpartum uterine disease and dairy herd reproductive performance: a review. *Vet J*, 176(1), 102-114. doi: 10.1016/j.tvjl.2007.12.019
- LeBlanc, S. J., Duffield, T. F., Leslie, K. E., Bateman, K. G., Keefe, G. P., Walton, J. S. et Johnson, W. H. (2002a). Defining and diagnosing postpartum clinical endometritis and its impact on reproductive performance in dairy cows. *Journal of dairy science*, 85(9), 2223-2236.
- LeBlanc, S. J., Duffield, T. F., Leslie, K. E., Bateman, K. G., Keefe, G. P., Walton, J. S. et Johnson, W. H. (2002b). The effect of treatment of clinical endometritis on reproductive performance in dairy cows. *Journal of dairy science*, 85(9), 2237-2249.
- LeBlanc, S. J., Osawa, T. et Dubuc, J. (2011). Reproductive tract defense and disease in postpartum dairy cows. *Theriogenology*, 76(9), 1610-1618.
- Lefebvre, R. C. et Stock, A. E. (2012). Therapeutic efficiency of antibiotics and prostaglandin F2alpha in postpartum dairy cows with clinical endometritis: an evidence-based evaluation. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 28(1), 79-96, ix.
- Leutert, C., Suthar, V. et Heuwieser, W. (2013). Evaluation of transrectal examination of cervical diameter by palpation in dairy cows. *J Dairy Sci*, 96(2), 1063-1070.
- Leutert, C., von Krueger, X., Plontzke, J. et Heuwieser, W. (2012). Evaluation of vaginoscopy for the diagnosis of clinical endometritis in dairy cows. *J Dairy Sci*, 95(1), 206-212.

- Levin, D. K., Gorchels, C. et Andersen, R. (1983). Reduction of post-cesarean section infectious morbidity by means of antibiotic irrigation. *American journal of obstetrics and gynecology*, 147(3), 273-277.
- Lewis, G. S. (2003). Steroidal regulation of uterine resistance to bacterial infection in livestock. *Reprod Biol Endocrinol*, 1, 117.
- Lindell, J. O. et Kindahl, H. (1983). Exogenous prostaglandin F2 alpha promotes uterine involution in the cow. *Acta Vet Scand*, 24(3), 269-274.
- Machado, V. S., Bicalho, M. L., Gilbert, R. O. et Bicalho, R. C. (2014). Short communication: Relationship between natural antibodies and postpartum uterine health in dairy cows. *J Dairy Sci*, 97(12), 7674-7678.
- Malinowski, E., Lassa, H., Markiewicz, H., Kaptur, M., Nadolny, M., Niewitecki, W. et Zietara, J. (2011). Sensitivity to antibiotics of *Arcanobacterium pyogenes* and *Escherichia coli* from the uteri of cows with metritis/endometritis. *Vet J*, 187(2), 234-238.
- Mari, G., Iacono, E., Toni, F., Predieri, P. G. et Merlo, B. (2012). Evaluation of the effectiveness of intrauterine treatment with formosulphathiazole of clinical endometritis in postpartum dairy cows. *Theriogenology*, 78(1), 189-200.
- Mateus, L., da Costa, L. L., Bernardo, F. et Silva, J. R. (2002a). Influence of puerperal uterine infection on uterine involution and postpartum ovarian activity in dairy cows. *Reproduction in Domestic Animals*, 37(1), 31-35.
- Mateus, L., da Costa, L. L., Bernardo, F. et Silva, J. R. (2002b). Influence of puerperal uterine infection on uterine involution and postpartum ovarian activity in dairy cows. *Reprod Domest Anim*, 37(1), 31-35.
- McCaughan, C. J., Laurie, K. W., Martin, M. C. et Hooper, M. W. (1984). Iodine in milk of cows after intrauterine infusion of Lugol's solution. *Aust Vet J*, 61(6), 200-201.
- McDougall, S. (2001). Effect of intrauterine antibiotic treatment on reproductive performance of dairy cows following periparturient disease. *New Zealand veterinary journal*, 49(4), 150-158.
- McDougall, S., de Boer, M., Compton, C. et LeBlanc, S. J. (2013). Clinical trial of treatment programs for purulent vaginal discharge in lactating dairy cattle in New Zealand. *Theriogenology*, 79(8), 1139-1145.
- McDougall, S., Hussein, H., Aberdein, D., Buckle, K., Roche, J., Burke, C., . . . Meier, S. (2011). Relationships between cytology, bacteriology and vaginal discharge scores and reproductive performance in dairy cattle. *Theriogenology*, 76(2), 229-240.

- McDougall, S., Macaulay, R. et Compton, C. (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., Henriques, L. C., Sa, L. R. et Gregory, L. (2012). Comparison of ultrasonography and histopathology for the diagnosis of endometritis in Holstein-Friesian cows. *Journal of dairy science*, 95(12), 6969-6973.
- Messier, S., Higgins, R., Couture, Y. et Morin, M. (1984). Comparison of swabbing and biopsy for studying the flora of the bovine uterus. *Can Vet J*, 25(7), 283-288.
- Miroud, K. et Noakes, D. E. (1991). Histological changes in the vaginal mucosa of the cow during the oestrous cycle, after ovariectomy and following exogenous oestradiol benzoate and progesterone treatment. *British Veterinary Journal*, 147(5), 469-477.
- Moller, K. (1970). A review of uterine involution and ovarian activity during the postparturient period in the cow. *NZ Vet J*, 18(5), 83-90.
- Monge, A., Elvira, L., Gonzalez, J. V., Astiz, S. et Wellenberg, G. J. (2006). Bovine herpesvirus 4-associated postpartum metritis in a Spanish dairy herd. *Research in Veterinary Science*, 80(1), 120-125.
- Moraitis, S., Taitzoglou, I. A., Tsantarliotou, M. P., Boscós, C. M., Kaldrimidou, E. et Saratsis, P. (2004). Involvement of the plasminogen activation system in cow endometritis. *Theriogenology*, 61(2-3), 337-349.
- Nakao, T., Moriyoshi, M. et Kawata, K. (1988). Effect of postpartum intrauterine treatment with 2 % polyvinyl-pyrrolidone-iodine solution on reproductive efficiency in cows. *Theriogenology*, 30(6), 1033-1043.
- Oliveira, L. J., Barreto, R. S. N., Perecin, F., Mansouri-Attia, N., Pereira, F. T. V. et Meirelles, F. V. (2012). Modulation of Maternal Immune System During Pregnancy in the Cow. *Reproduction in Domestic Animals*, 47, 384-393.
- Oltenucu, P. A., Britt, J. H., Braun, R. K. et Mellenberger, R. W. (1983). Relationships among Type of Parturition, Type of Discharge from Genital-Tract, Involution of Cervix, and Subsequent Reproductive-Performance in Holstein Cows. *Journal of Dairy Science*, 66(3), 612-619.
- Overton, M. et Fetrow, J. ( 2008 ). Economics of postpartum uterine health. *Dairy Cattle Reprod Council Conv. Omaha NE*, 2008, 39-43.
- Peter, A. T., Jarratt, G. M. et Hanlon, D. W. (2011). Accuracy of diagnosis of clinical endometritis with Metrichheck<sup>TM</sup> in postpartum dairy cows. *Clinical Theriogenology*, 3(4), 461-465.

- Petit, T., Spergser, J., Rosengarten, R. et Aurich, J. (2009). Prevalence of potentially pathogenic bacteria as genital pathogens in dairy cattle. *Reprod Domest Anim*, 44(1), 88-91.
- Potter, T. J., Guitian, J., Fishwick, J., Gordon, P. J. et Sheldon, I. M. (2010). Risk factors for clinical endometritis in postpartum dairy cattle. *Theriogenology*, 74(1), 127-134.
- Poyser, N. L. (1995). The control of prostaglandin production by the endometrium in relation to luteolysis and menstruation. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 53(3), 147-195.
- Preisler, M. T., Weber, P. S., Tempelman, R. J., Erskine, R. J., Hunt, H. et Burton, J. L. (2000). Glucocorticoid receptor down-regulation in neutrophils of periparturient cows. *Am J Vet Res*, 61(1), 14-19.
- Prunner, I., Pothmann, H., Wagener, K., Giuliadori, M., Huber, J., Ehling-Schulz, M. et Drillich, M. (2014). Dynamics of bacteriologic and cytologic changes in the uterus of postpartum dairy cows. *Theriogenology*.
- Prunner, I., Wagener, K., Pothmann, H., Ehling-Schulz, M. et Drillich, M. (2014). Risk factors for uterine diseases on small- and medium-sized dairy farms determined by clinical, bacteriological, and cytological examinations. *Theriogenology*, 82(6), 857-865.
- Putro, P. P. (1988). Effects of intrauterine dilute iodine solution infusion on the incidence of retained placenta and endometritis in dairy cows. *Acta Vet Scand Suppl*, 83, 58-65.
- Runciman, D. J., Anderson, G. A. et Malmo, J. (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., Anderson, G. A., Malmo, J. et Davis, G. M. (2008a). 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., Anderson, G. A., Malmo, J. et Davis, G. M. (2008b). Use of postpartum vaginoscopic (visual vaginal) examination of dairy cows for the diagnosis of endometritis and the association of endometritis with reduced reproductive performance. *Aust Vet J*, 86(6), 205-213.
- Santos, N. R., Roman, H. B. et Gilbert, R. O. (2006). The use of leukocyte esterase reagent strips for diagnosis of subclinical endometritis in dairy cows. *Theriogenology*, 66(3), 666-667.
- Santos, T. M., Caixeta, L. S., Machado, V. S., Rauf, A. K., Gilbert, R. O. et Bicalho, R. C. (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.

- Senosy, W. S., Uchiza, M., Tameoka, N., Izaïke, Y. et Osawa, T. (2009). Association between evaluation of the reproductive tract by various diagnostic tests and restoration of ovarian cyclicity in high-producing dairy cows. *Theriogenology*, 72(9), 1153-1162.
- Sheldon, I. M., Bushnell, M., Montgomery, J. et Rycroft, A. N. (2004). Minimum inhibitory concentrations of some antimicrobial drugs against bacteria causing uterine infections in cattle. *The Veterinary record*, 155(13), 383-387.
- Sheldon, I. M., Cronin, J., Goetze, L., Donofrio, G. et Schuberth, H. J. (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 Dobson, H. (2004). Postpartum uterine health in cattle. *Anim Reprod Sci*, 82-83, 295-306.
- Sheldon, I. M., Lewis, G. S., LeBlanc, S. et Gilbert, R. O. (2006). Defining postpartum uterine disease in cattle. *Theriogenology*, 65(8), 1516-1530.
- Sheldon, I. M., Noakes, D. E., Bayliss, M. et Dobson, H. (2003). The effect of oestradiol on postpartum uterine involution in sheep. *Animal Reproduction Science*, 78(1-2), 57-70.
- Sheldon, I. M., Noakes, D. E., Rycroft, A. et Dobson, H. (2001). Acute phase protein responses to uterine bacterial contamination in cattle after calving. *Vet Rec*, 148(6), 172-175.
- Sheldon, I. M., Noakes, D. E., Rycroft, A. N. et Dobson, H. (2003). The effect of intrauterine administration of estradiol on postpartum uterine involution in cattle. *Theriogenology*, 59(5-6), 1357-1371.
- Sheldon, I. M., Noakes, D. E., Rycroft, A. N. et Dobson, H. (2004). Effect of intrauterine administration of oestradiol on postpartum uterine bacterial infection in cattle. *Anim Reprod Sci*, 81(1-2), 13-23.
- Sheldon, I. M., Noakes, D. E., Rycroft, A. N., Pfeiffer, D. U. et Dobson, H. (2002). Influence of uterine bacterial contamination after parturition on ovarian dominant follicle selection and follicle growth and function in cattle. *Reproduction*, 123(6), 837-845.
- Sheldon, I. M., Price, S. B., Cronin, J., Gilbert, R. O. et Gadsby, J. E. (2009). Mechanisms of infertility associated with clinical and subclinical endometritis in high producing dairy cattle. *Reprod Domest Anim*, 44 Suppl 3, 1-9.
- Sheldon, I. M., Rycroft, A. N., Dogan, B., Craven, M., Bromfield, J. J., Chandler, A., . . . Simpson, K. W. (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.

- Shirasuna, K., Shimizu, T., Matsui, M. et Miyamoto, A. (2013). Emerging roles of immune cells in luteal angiogenesis. *Reprod Fertil Dev*, 25(2), 351-361.
- Silva, E., Gaivao, M., Leitao, S., Jost, B. H., Carneiro, C., Vilela, C. L., . . . Mateus, L. (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.
- Silva, E., Leitao, S., Tenreiro, T., Pomba, C., Nunes, T., da Costa, L. L. et Mateus, L. (2009). Genomic and phenotypic characterization of *Escherichia coli* isolates recovered from the uterus of puerperal dairy cows. *Journal of dairy science*, 92(12), 6000-6010.
- Skinner, J. G., Brown, R. A. L. et Roberts, L. (1991). Bovine Haptoglobin Response in Clinically Defined Field Conditions. *Veterinary Record*, 128(7), 147-149.
- Slama, H., Tainturier, D., Bencharif, D., Chemli, J. et Zaiem, I. (2002). *Cinétique des prostaglandines F2 $\alpha$ , E2 et I2 en période postpartum chez la vache : données endocrinologiques et perspectives thérapeutiques*. Toulouse, FRANCE: Ecole nationale vétérinaire de Toulouse.
- Slama, H., Vaillancourt, D. et Goff, A. K. (1993). Leukotriene-B(4) in Cows with Normal Calving, and in Cows with Retained Fetal Membranes and or Uterine Subinvolution. *Canadian Journal of Veterinary Research-Revue Canadienne De Recherche Veterinaire*, 57(4), 293-299.
- Srikrishna, S. et Cardozo, L. (2013). The vagina as a route for drug delivery: a review. *Int Urogynecol J*, 24(4), 537-543.
- Stephens, L. R., Slee, K. J., Poulton, P., Larcombe, M. et Kosior, E. (1986). Investigation of purulent vaginal discharge in cows, with particular reference to *Haemophilus somnus*. *Aust Vet J*, 63(6), 182-185.
- Stossel, T. P. (1975). Phagocytosis - Recognition and Ingestion. *Seminars in Hematology*, 12(1), 83-116.
- Sutton, D., Watson, C. L., Lohuis, J. A. C. M. et Dohmen, M. J. W. (1996). Comparative clinical cure of subacute/chronic endometritis in dairy cows after intra-uterine infusion of Metrijet super or Metrijet 1500Reg., or after non-treatment. *Cattle Practice*, 4(3).
- Tekin, S. et Hansen, P. J. (2003). Lymphocyte-mediated lysis of sheep chorion: susceptibility of chorionic cells to third-party and maternal cytotoxic lymphocytes and presence of cells in the endometrium exhibiting cytotoxicity toward natural-killer cell targets. *Theriogenology*, 59(3-4), 787-800.

- Tenhagen, B. A. et Heuwieser, W. (1999). Comparison of a conventional reproductive management programme based on rectal palpation and uterine treatment of endometritis with a strategic prostaglandin F2 alpha programme. Zentralbl Veterinarmed A, 46(3), 167-176.
- Thatcher, W. W. et Wilcox, C. J. (1973). Postpartum estrus as an indicator of reproductive status in the dairy cow. J Dairy Sci, 56(5), 608-610.
- Thurmond, M. C., Jameson, C. M. et Picanso, J. P. (1993). Effect of Intrauterine Antimicrobial Treatment in Reducing Calving-to-Conception Interval in Cows with Endometritis. Journal of the American Veterinary Medical Association, 203(11), 1576-1578.
- Vaillancourt, D. (1987). Physiopathology and Therapeutics of the Puerperal Uterus in Dairy-Cows - Survey of Basic and Clinical Research. Canadian Veterinary Journal-Revue Veterinaire Canadienne, 28(6), 330-337.
- van Engelen, E., de Groot, M. W., Breeveld-Dwarkasing, V. N., Everts, M. E., van der Weyden, G. C., Taverne, M. A. et Rutten, V. P. (2009). Cervical ripening and parturition in cows are driven by a cascade of pro-inflammatory cytokines. Reprod Domest Anim, 44(5), 834-841.
- Violas, J. (2012). Effet d'un traitement intra-urérin à base de céfapirine sur l'inflammation cervicale chez la vache laitière.
- Wagener, K., Grunert, T., Prunner, I., Ehling-Schulz, M. et Drillich, M. (2014). Dynamics of uterine infections with *Escherichia coli*, *Streptococcus uberis* and *Trueperella pyogenes* in post-partum dairy cows and their association with clinical endometritis. Vet J.
- Wagner, W. C. et Hansel, W. (1969). Reproductive physiology of the post partum cow. I. Clinical and histological findings. J Reprod Fertil, 18(3), 493-500.
- Walsh, S. W., Williams, E. J. et Evans, A. C. O. (2011). A review of the causes of poor fertility in high milk producing dairy cows. Animal Reproduction Science, 123(3-4), 127-138.
- Watson, E. D., Diehl, N. K. et Evans, J. F. (1990). Antibody response in the bovine genital tract to intrauterine infusion of *Actinomyces pyogenes*. Res Vet Sci, 48(1), 70-75.
- Wehrend, A. et Bostedt, H. (2003). [The incidence of cervical dystocia and disorders of cervical involution in the post partum cow]. Dtsch Tierarztl Wochenschr, 110(12), 483-486.
- Wehrend, A., Failing, K. et Bostedt, H. (2003). Cervimetry and ultrasonographic observations of the cervix regression in dairy cows during the first 10 days post partum. J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med, 50(9), 470-473.

- Wehrend, A., Gumbel, B., Leiser, R., Failing, K. et Bostedt, H. (2004). Vaginal and cervical dilatation intrapartum is associated with eosinophilic infiltration in the cow but not in the sheep. *Reprod Domest Anim*, 39(6), 442-446.
- Werner, A., Suthar, V., Plontzke, J. et Heuwieser, W. (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.
- Westermann, S., Drillich, M., Kaufmann, T. B., Madoz, L. V. et Heuwieser, W. (2010). A clinical approach to determine false positive findings of clinical endometritis by vaginoscopy by the use of uterine bacteriology and cytology in dairy cows. *Theriogenology*, 74(7), 1248-1255.
- Williams, E. J., Fischer, D. P., Noakes, D. E., England, G. C., Rycroft, A., Dobson, H. et Sheldon, I. M. (2007). The relationship between uterine pathogen growth density and ovarian function in the postpartum dairy cow. *Theriogenology*, 68(4), 549-559.
- Williams, E. J., Fischer, D. P., Pfeiffer, D. U., England, G. C., Noakes, D. E., Dobson, H. et Sheldon, I. M. (2005). Clinical evaluation of postpartum vaginal mucus reflects uterine bacterial infection and the immune response in cattle. *Theriogenology*, 63(1), 102-117.
- Witte, T. S., Iwersen, M., Kaufmann, T., Scherpenisse, P., Bergwerff, A. A. et Heuwieser, W. (2011). Determination of ceftiofur derivatives in serum, endometrial tissue, and lochia in puerperal dairy cows after subcutaneous administration of ceftiofur crystalline free acid. *J Dairy Sci*, 94(1), 284-290.
- Wright, P. J. et Malmo, J. (1992). Pharmacologic manipulation of fertility. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 8(1), 57-89.
- Wrobel, K. H., Laun, G., Hees, H. et Zwack, M. (1986). [Histologic and ultrastructural studies of the vaginal epithelium of the cow]. *Anat Histol Embryol*, 15(4), 303-328.
- Zhang, J., Deng, L. X., Zhang, H. L., Hua, G. H., Han, L., Zhu, Y., . . . Yang, L. G. (2010). Effects of parity on uterine involution and resumption of ovarian activities in postpartum Chinese Holstein dairy cows. *Journal of dairy science*, 93(5), 1979-1986.