

Université de Montréal

**Effets d'un protocole de traite incomplète
en début de lactation sur la cétonémie,
la prévalence d'hypercétonémie, et
la variation de l'indice de l'état corporel**

par Pierre-Alexandre Morin

Département de pathologie et de microbiologie
Faculté de médecine vétérinaire

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

Avril 2017

© Pierre-Alexandre Morin, 2017

Résumé

L'hypercétionémie est une maladie métabolique réduisant la rentabilité des entreprises laitières. Restreindre la production lactée brièvement après le vêlage pourrait diminuer son incidence. Ce travail étudie l'impact d'un protocole de traite incomplète en début de lactation sur la cétionémie, l'hypercétionémie et la réduction d'indice de l'état corporel. Avant le vêlage, 838 vaches Holstein multipares provenant de 13 troupeaux laitiers à vocation commerciale ont été aléatoirement assignées à un protocole de traite complète ou incomplète (traite de 10 à 14 kg de lait par jour pour les cinq premiers jours en lait). Hebdomadairement, la concentration sanguine des β -hydroxybutyrates était mesurée durant les trois premières semaines de la lactation. Une concentration du β -hydroxybutyrate ≥ 1.4 mmol/L a été utilisée pour définir l'hypercétionémie. Puisque plusieurs évaluateurs ont noté les indices de l'état corporel et que l'accord inter-observateurs de son évolution dans le temps n'avait jamais été étudiée, une seconde étude a été réalisée pour l'estimer. Le protocole de traite incomplète a réduit la cétionémie pour la période 4-7 jours en lait et tend à la réduire pour la période 8-17 jours en lait. Ce même protocole a réduit significativement l'hypercétionémie pour les périodes 4-7 et 8-17 jours en lait. L'étude menée parallèlement à l'étude principale révélait un accord inter-observateurs acceptable pour la variation de l'indice de l'état corporel. Aucune différence au niveau de la variation de l'indice de l'état corporel en début de lactation n'a été notée entre les deux protocoles de traite. En conclusion, cette stratégie est efficace pour réduire la cétionémie et l'hypercétionémie en début de lactation.

Mots-clés : Vache laitière, cétonémie, hypercétonémie, indice de l'état corporel, accord inter-observateurs

Abstract

Hyperketonemia is a metabolic disorder reducing profitability of dairy cattle. Restricting milk production shortly after calving could reduce its incidence. This study assessed the impact of an incomplete milking protocol in early lactation on ketonemia, hyperketonemia and loss of body condition score. Prior to calving, 838 multiparous Holstein cows from 13 commercial herds were randomly assigned to a complete or an incomplete milking protocols (milking 10-14 kg of milk per day for the first 5 days in milk). Ketonemia was evaluated weekly by measuring blood concentration of β -hydroxybutyrate during the first three weeks of lactation. A concentration of β -hydroxybutyrate ≥ 1.4 mmol/L was used to define hyperketonemia. Since several evaluators did assessments of body condition scores and because inter-observer agreement of its variation over time had never been studied, a second study was carried out to quantify agreement for this measure. The incomplete milking protocol has reduced ketonemia for the 4-7 days in milk period and has tended to reduce it for the 8-17 days in milk period. This protocol has reduced hyperketonemia for the 4-7 and 8-17 days in milk periods. The study that managed to quantify inter-observers agreement revealed an acceptable inter-observer agreement for variation of body condition score. The incomplete milking protocol was not associated with loss of body condition score. In conclusion, this strategy is effective in reducing ketonemia and hyperketonemia in early lactation.

Keywords : Dairy cow, ketonemia, ketosis, body condition score, inter-observers agreement

Table des matières

Résumé.....	ii
Abstract.....	iv
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	vii
Liste des figures.....	viii
Liste des sigles et abréviations.....	ix
Remerciements.....	xii
Introduction.....	1
Chapitre 1. Revue de littérature.....	3
1. Apport énergétique.....	3
1.1 Consommation.....	3
1.2 Digestion.....	6
2. Dépense énergétique.....	8
3. Bilan énergétique négatif.....	9
3.1 Endocrinologie de la lipolyse.....	10
3.2 Devenir des acides gras libres.....	12
3.2.1 Stockage et exportation des acides gras libres.....	13
3.2.2 β -oxydation.....	13
3.2.3 Hypercétonémie.....	14
3.3 Évaluation de la mobilisation énergétique.....	15
3.3.1 Indice de l'état de chair.....	16
3.3.2 Concentration sérique d'acides gras libres.....	19
3.3.3 Concentration en β -hydroxybutyrate.....	20
4. Modification du bilan énergétique.....	21
4.1 Augmentation de l'apport énergétique.....	21
4.1.1 Monensin.....	21
4.1.2 Traite prépartum.....	22

4.2	Réduction de la dépense énergétique	23
4.2.1	Acide linoléique conjugué	23
4.2.2	Réduction de la fréquence de traite	25
4.2.3	Réduction du volume de lait prélevé	26
Chapitre 2. Objectifs et hypothèses		28
Chapitre 3. Short communication: an observational study investigating inter-observer agreement for variation in time of body condition score in dairy cows		30
	Abstract.....	31
	Manuscript.....	32
	References	40
Chapitre 4. A randomized controlled trial on the effect of incomplete milking during early lactation on ketonemia and body condition loss in Holstein dairy cows.....		45
	Abstract.....	46
	Introduction.....	47
	Materials and methods	49
	Results	59
	Discussion	64
	Conclusion.....	70
	Acknowledgements.....	70
	References	71
Chapitre 5. Discussion générale.....		91
	Retour sur les résultats	91
	Forces et limites de l'étude.....	97
	Perspectives de recherche	100
Conclusion.....		105
Bibliographie		106

Liste des tableaux

Tableau I. Charte décisionnelle de l'indice de l'état corporel basée sur les descripteurs anatomiques évalués par Ferguson et al. (1994).....	18
Table II. Descriptive statistics of body condition score measured by three different observers on a cohort of 73 cows from one commercial dairy	43
Table III. Unconditional estimates of association between milking protocol and the natural logarithm of blood BHB	78
Table IV. β -hydroxybutyrate (BHB) geometric mean blood concentrations (in mmol/L) and BHB concentrations ratio between incompletely and conventionally milked cows	80
Table V. Unconditional estimates of association between milking protocol and odds of hyperketonemia (defined as blood β -hydroxybutyrate ≥ 1.4 mmol/L).....	81
Table VI. Predicted probability of hyperketonemia in incompletely and conventionally milked cows. Probabilities were computed using estimates obtained from generalized linear mixed models, after using the inverse logit function.....	83
Table VII. Effect of an incomplete milking protocol on odds of hyperketonemia stratified by parity level during the 8-17 DIM period	84
Table VIII. Unconditional estimates of association between milking protocol and odds of losing ≥ 0.75 point of body condition during the first seven weeks of lactation.....	85

Liste des figures

Figure 1. Devenir des acides gras libres dans les hépatocytes.....	8
Figure 2. Scatter plots of body score condition (BCS) at Exam-1 (1-20 days in milk), Exam-2 (41-60 days in milk), and for difference in BCS between Exam-1 and Exam-2, for each pair of observers, with quadratic weighted kappa and its 95% confidence interval.....	44
Figure 3. Box-plot of milk weight/day as function of milking protocols and days in milk.....	87
Figure 4. Box-plot of blood β -hydroxybutyrate concentrations as function of milking protocols and days in milk periods	87
Figure 5. Histogram of prevalence of hyperketonemia (blood β -hydroxybutyrate concentration > 1.4 mmol/L) as function of milking protocols.....	87

Liste des sigles et abréviations

AG :	Acide gras
AGL :	Acide gras libres
AGV :	Acide gras volatile
BCAF :	Breed class average for fat
BCAM :	Breed class average for milk
BCAP :	Breed class average for protein
BCS :	Body condition score (voir IEC)
Δ BCS :	Indice de l'état corporel (voir Δ IEC)
BEN :	Bilan énergétique négatif
BHB :	β -hydroxybutyrate
CI :	Confidence interval
CLA :	Acide linoléique conjugué
CON :	Conventional milking protocol
CPT-1 :	Carnitine palmitoyltransférase-1
CRC :	Monensin controlled release capsule
CVMS :	Consommation volontaire de matière sèche
DIM:	Days in milk
JEL :	Jour en lactation
FADH :	Flavine adénine dinucléotide
GH :	Growth hormone (somatotropine)
HYK :	Hypercétonémie
HSL :	Lipase homono-sensible

IEC : Indice de l'état corporel
 Δ IEC : Variation de l'indice de l'état corporel
INC : Incomplete milking protocol
NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide
NEB: Negative energy balance
NDF : Fibre soluble au détergent neutre
PV : Poids vif
RCT: Randomized controlled trial
RERI: Relative excess risk due to interaction
 r^2 : Coefficient de détermination
VLDL : Very low density lipoprotein

Catherine,

Yohan,

Elsie,

Vous êtes l'expérience, la perche et le fil du funambule

Lui permettant de réussir la traversée

Remerciements

J'ai été solidement dirigé et soutenu dans ce projet par Simon Dufour. Ses connaissances, enthousiasme et disponibilité font de lui un excellent directeur. En espérant que de nombreux étudiants auront la chance que j'aie eu de l'avoir comme directeur.

Ce travail n'aurait jamais été aussi élaboré en absence des améliorations suggérées par les autres collaborateurs aux articles ou membres de mon comité conseil : Catarina Krug, Pierre Lacasse, Younes Chorfi, Jocelyn Dubuc, Jean-Philippe Roy, Débora Santschi et Julie Arsenault. Vous avez rendu ce travail collectif enrichissant.

Jean-Philippe Pelletier, Caroline Bergeron, Josée Lemay-Courchesne et Roxanne Mandeville, conduire une Toyota Corolla 1990 n'a jamais été aussi agréable qu'avec vous. Vous formiez une équipe de recherche du tonnerre !

Pas de feu sans étincelle. Pas de projet sans ferme. Je ne pourrai jamais assez remercier les 13 fermes qui se sont abandonnées à l'idée initiale et acceptées notre présence. Vos temps et observations ont nourri le projet.

Merci à toute l'équipe de l'ambulance qui m'a libéré pour faire ce projet. Je ne pourrais espérer travailler dans un plus beau climat de travail que celui offert par le groupe.

Heureusement que j'ai Catherine, Yohan et Elsie dans ma vie pour me ramener sur terre. Merci pour l'équilibre !

Ma mère, Diane Truchon qui m’inspire depuis que je suis jeune en la voyant lire constamment. Mon père, Jean-Vianney Morin, qui a forcé le goût de l’écriture en moi. Ceci m’a bien préparé aux nombreuses corrections qu’exige un travail de cette envergure.

Finalement, le soutien financier de *Novalait Inc*, des *Fonds de recherche du Québec – Nature et technologies* (FRQNT) et du *Ministère de l’Agriculture, des Pêcheries et de l’Alimentation du Québec* (MAPAQ).

La reconnaissance est la mémoire du cœur – Hans Christian Andersen

Introduction

La transition est une période critique dans le cycle de production d'une vache laitière. La littérature la définit comme l'intervalle entre le vêlage et les trois semaines le précédent (Wang, 2012). Couvrant la fin de la gestation, la parturition et le début de la lactation, d'importants changements hormonaux, métaboliques et nutritionnels s'y opèrent. D'une part, pour permettre les processus homéorhétiques soutenant la demande énergétique nécessaire à la croissance de l'animal lui-même, foetale, utérine, ainsi que le début de la production lactée (Bauman et Currie, 1980), et d'autre part, pour maintenir l'homéostasie de l'individu.

Paradoxalement, en début de lactation, l'importante demande énergétique engendrée par la production laitière surpasse l'apport énergétique alimentaire (Drackley et al., 2001). De ce débalancement naît un bilan énergétique négatif (**BEN**) (Grummer et al., 2004). Les réserves glucidiques étant rapidement épuisées, l'animal puise dans ses réserves lipidiques et protéiques (Frizzell et al., 1988). Lorsque surchargé en acides gras (**AG**), les mitochondries des cellules hépatiques les oxydent partiellement et produisent une autre source d'énergie : les corps cétoniques. Leur présence au-dessus de certains seuils, nommée hypercétonémie (**HYK**), est associée à une augmentation du risque de développement de certaines conditions pathologiques (Grummer et al., 2004, Lefebvre, 2009). Des pertes de 289 USD par cas d'HYK ont été estimées (McArt et al., 2015, Raboisson et al., 2015). Récemment, Santschi et al. (2016) ont évalué la prévalence moyenne d'HYK dans les troupeaux laitiers québécois à 22,6%, avec une prévalence plus importante pour les vaches en

3^e lactation et plus. Dubuc et Denis-Robichaud (2017) ont obtenu une prévalence médiane de 18,8%, avec des variations importantes d'un troupeau à l'autre (minimum 4,0%; maximum 75,0%). Par conséquent, diminuer la prévalence d'HYK dans les troupeaux laitiers québécois est une nécessité, mais représente aussi un défi de taille.

Limiter la dépense énergétique après le vêlage est chose possible. Cependant, les besoins liés à l'entretien et à la croissance de l'animal ne peuvent être réduits. Ainsi, la répartition énergétique des primipares doit être considérée différemment de celle des vaches adultes. Néanmoins, la dépense énergétique liée à la production de lait peut être restreinte. Carbonneau et al. (2012) ont obtenus des résultats prometteurs sur des marqueurs du bilan énergétique lorsqu'ils ont soumis des vaches à un protocole de traite incomplète en début de lactation. Novatrice, naturelle et à contre-courant, un protocole de traite incomplète similaire à celui proposé par cette étude mérite une investigation plus poussée afin de valider son applicabilité et son efficacité en contexte commercial avec les limites, les contraintes et les réalités du milieu.

Le présent mémoire expose les effets d'un protocole de traite incomplète sur la cétonémie, la prévalence d'hypercétonémie et la variation de l'indice de l'état corporel en période post-partum. Notre hypothèse est qu'un tel protocole en début de lactation, auquel sont soumises des vaches Holstein multipares évoluant en contexte commercial, diminuera leur cétonémie, la prévalence d'hypercétonémie ainsi que l'ampleur de la perte de l'indice de l'état corporel. Puisque nous avons utilisé la variation d'indice de l'état corporel et que l'accord inter-évaluateur pour cet indice n'a jamais été rapporté, un objectif secondaire a été de le mesurer.

Chapitre 1. Revue de littérature

Cette revue de littérature se veut une synthèse de l'origine du déséquilibre énergétique observé chez les vaches matures en début de lactation. D'abord, deux déterminants majeurs de l'équilibre énergétique pour les vaches laitières seront traités : 1) l'apport énergétique, constitué des aliments ingérés, et 2) la dépense énergétique engendrée par la production laitière. Par la suite, certaines pistes de solutions répertoriées et visant l'amélioration de l'équilibre énergétique en période post-partum seront abordées.

1. Apport énergétique

1.1 Consommation

Les aliments sont composés de nutriments : hydrates de carbone, protéines, lipides, vitamines, minéraux et eau. Ensemble, les hydrates de carbone, les protéines et les lipides correspondent à 90% de la matière sèche et à 100% de l'apport énergétique de la diète (Herdt, 1998). La consommation volontaire de matière sèche (CVMS) correspond à la capacité quotidienne de l'animal à ingérer des aliments en excluant leur apport en eau. Elle varie selon l'état physiologique. En période de transition prépartum, la CVMS se situe autour de 1,3% du poids vif (PV).

Du tarissement jusqu'à trois semaines pré-vêlage, la CVMS diminue progressivement, puis drastiquement dans les semaines suivantes : réduction de 25% pour le premier et le deuxième vêlage et 52% pour le troisième vêlage et les suivants (Marquardt et al., 1977, Grummer et al., 2004). La chute de CVMS entre le tarissement

et les deux semaines prépartum influence davantage la mobilisation énergétique pré- et post-partum que le niveau de CVMS lui-même (Bertics et al., 1992, Grummer et al., 2004, Chapinal et al., 2011). Durant les 3 premières semaines post-partum, Hayirli et al. (2003) et Grummer et al. (2004) rapportent une CVMS optimale d'environ 1,84% du PV. Par la suite, elle augmente graduellement de 1.0 à 1.5 kg de matière sèche par jour jusqu'à un maximum d'environ 23 kg par jour atteint entre les semaines 8 et 12 suivant le vêlage (NRC, 2001).

De nombreux facteurs influencent la CMVS. Le type d'aliment servi peut aggraver sa chute (Grant et Albright, 1995, Coffey et al., 2004). Par exemple, les rations conventionnelles dans lesquelles les aliments sont servis séparément, ou encore le pâturage, limitent l'ingestion de matière sèche comparativement aux rations totales mélangées (Gill, 1979, Washburn et al., 2002). La composition de la ration fait également varier la CVMS. Leur rumen étant encombré, les vaches nourries avec des rations riches en fibres solubles au détergeant neutre (NDF) souffrent d'une diminution de la CVMS une semaine avant le vêlage par rapport aux vaches nourries avec des rations concentrées en énergie (Hayirli et al., 2003, Rabelo et al., 2003). En contrepartie, servir des diètes concentrées en énergie dès le début du tarissement favorise un gain de poids (Wildman et al., 1982, Grummer et al., 2004). Une accumulation importante de tissus adipeux avant le vêlage augmente le risque qu'un écart important de CVMS soit observé en transition prépartum augmentant les risques d'une mobilisation graisseuse accrue (Hayirli et al., 2003, Grummer et al., 2004). Pour ces raisons et pour favoriser le développement des papilles du rumen et l'absorption d'acides gras volatiles (AGV), il est indiqué d'augmenter pour une courte période la

concentration énergétique de la ration au détriment de la fibre en période de transition prépartum (Sutton et al., 2003).

Afin de pallier à la faible CVMS en début de lactation malgré l'importante demande énergétique, il est recommandé d'augmenter la concentration énergétique de la ration. Ceci permet un rétablissement plus rapide de la fonction de l'axe somatotropique, ainsi qu'une réduction de la résistance à l'insuline (Roche et al., 2009). Il en résulte une diminution de la période de temps durant laquelle les animaux utilisent leurs réserves énergétiques (Lucy et al., 2001, McCarthy et al., 2007). Toutefois, les hydrates de carbone non structuraux, la source d'énergie la plus utilisée afin d'augmenter la concentration énergétique de la ration, ne doivent pas excéder 40% de la ration sur base de matière sèche (NRC, 2001). Bien qu'à très court terme, un gain de production soit observé, davantage d'hydrates de carbone non structuraux dans la ration peut entraîner de l'acidose ruminale (Kleen et al., 2003). Cette condition réduit la CVMS et la production laitière, et augmente le risque de réforme prématurée (Oetzel, 2007, Enemark, 2008).

L'environnement dans lequel évolue les animaux et plusieurs autres facteurs de régie influencent la CVMS. Par exemple, un animal à son premier vêlage, les races de petit gabarit, les animaux très gras, la surpopulation dans les stabulations libres, ainsi que la présence de maladies sont associés à une diminution de la CVMS (Grant et Albright, 1995, Coffey et al., 2004, McCarthy et al., 2007, Schulz et al., 2014).

Bref, la CMVS observée à un moment donné résulte de nombreux facteurs intrinsèques et extrinsèques à l'animal. Une fois consommés, les aliments sont transformés pour que leurs nutriments soient assimilés.

1.2 Digestion

La physiologie du système digestif des herbivores est particulière de par sa capacité à décomposer et à rendre assimilable certains nutriments composant le bolus alimentaire. Lors de la digestion fermentaire, le bolus alimentaire subit l'action des microorganismes et de leurs enzymes dans les pré-estomacs : rumen, réticulum, omasum (Henderson et al., 2015). L'efficacité alimentaire est optimale lorsque les aliments disponibles aux micro-organismes sont adéquats en qualité et en quantité. De plus, l'ordre dans lequel ils sont consommés doit permettre une croissance microbienne maximale en fonction du temps de transit dans les pré-estomacs (Russell et Rychlik, 2001, Herdt, 2002b). La presque totalité du bolus alimentaire est transformée par la population microbienne, qui a son tour, deviendra la source de nutriments lors de la digestion non-fermentaire (Chesson et Forsberg, 1997). Ainsi, par l'action chimique des enzymes digestives d'origine glandulaire, et de moindre importance, par l'effet mécanique du brassage, ces nouveaux substrats alimentaires seront transformés en nutriments assimilables par l'hôte (Gill, 1979).

Les acides gras volatiles sont des sous-produits de la digestion fermentaire et sont d'une importance capitale dans le métabolisme énergétique des ruminants. En effet, ils leur fournissent de 60 à 80% de l'apport énergétique (Herdt, 2002b). Les principaux AGV produits sont l'acide propionique, l'acide acétique, l'acide butyrique, et

en quantités moindres, les acides gras volatiles ramifiés : valérique, isovalérique, isobutyrique et 2-méthylbutyrique (Bergman, 1990). Les changements alimentaires font varier les populations microbiennes du rumen et, conséquemment, la proportion relative d'AGV produits (Tajima et al., 2000). Ainsi, dans le rumen de vaches nourries avec des diètes riches en fourrage ou en grain, la proportion en acide acétique, propionique et butyrique sont respectivement 70:20:10 et 60:30:10 (Wang, 2012). Puisque les rations sont différentes, les populations bactériennes ruminales en périodes prépartum et post-partum sont donc différentes. Outre les aliments consommés qui changent l'environnement du rumen, l'âge et l'état de santé de l'hôte influencent la composition bactérienne du rumen et la production d'AGV (Chesson et Forsberg, 1997). Une fois absorbés par les capillaires de l'épithélium stratifié squameux des papilles ruminales, les AGV se dirigent vers le foie via le système porte. Les acides acétique et butyrique entrent dans le cycle de Krebs sous la forme d'acétyl coenzyme-A (acétyl Co-A) (Figure 1). Cette dernière molécule peut également servir de nouvelle source de carbone pour la formation du squelette des AG (Ingle et al., 1972). L'acide propionique sera transformé en succinate dans les mitochondries des hépatocytes. Cet intermédiaire du cycle de Krebs permet la formation d'oxaloacétate, qui à son tour, est la porte d'entrée de la néoglucogénèse.

En conclusion, puisque l'apport alimentaire des vaches est directement peu disponible, d'autres processus permettent de produire les nutriments essentiels à pour soutenir leur croissance, leur métabolisme basal, ainsi que leur production laitière (Herdt, 2002b). Malgré tout, il faut que les qualités et quantités des aliments composant la ration soient adéquates.

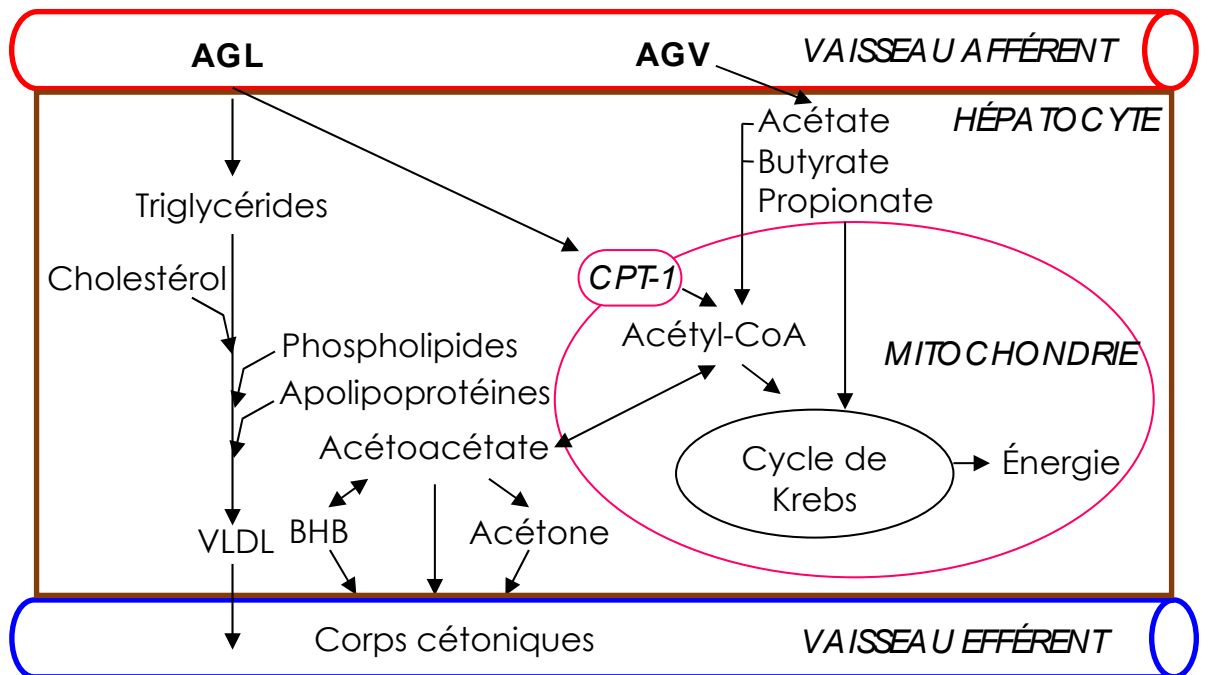


Figure 1. Devenir des acides gras libres dans les hépatocytes. Adapté de Suriyasathaporn et al. (2000).

2. Dépense énergétique

Suite à des sélections phénotypique et génotypique intenses pour une production laitière élevée en début de lactation, les vaches produisent maintenant près du tiers de leur production lactée totale dans les deux mois suivant le vêlage (Bauman et Currie, 1980, Dillon et al., 2003). Les cellules épithéliales spécialisées de la glande mammaire captent les substrats nécessaires à la synthèse du gras, des protéines et des hydrates de carbones du lait et les excrètent dans la lumière alvéolaire par extrusion pour le gras et par exocytose pour les protéines et les hydrates de carbone (Allen, 1990). Les lipides du lait se composent principalement de triglycérides. Il s'y retrouve également des monoglycérides, des diglycérides, des phospholipides, des AG

et des stéroïdes. La principale protéine produite par les cellules alvéolaires est la caséine. Il s'y retrouve également de l'albumine et des globulines. Quant à eux, les hydrates de carbones du lait se composent presque exclusivement de lactose, un dissaccharide formé de glucose et de galactose (Linn, 1988). Durant les 7 jours précédant le vêlage jusqu'au premier JEL, la demande en glucose par la glande mammaire augmente d'environ 400% (Bell, 1995). Au maximum de la production laitière, habituellement atteint entre la quatrième et la huitième semaine après le vêlage, plus de 80% du glucose sérique est utilisé par la glande mammaire (Bell et Bauman, 1997). Ainsi, l'initiation de la lactation cause une augmentation abrupte des besoins nutritionnels entraînant un stress métabolique considérable.

3. Bilan énergétique négatif

Puisque l'alimentation ne comble pas les besoins énergétiques engendrés par la production laitière en début de lactation, l'animal doit puiser dans ses réserves énergétiques (Baird, 1982). Bien que dépendant du moment auquel l'axe somatotropique se réactive, le catabolisme observé tôt en début de lactation tend vers l'anabolisme dès la 4^e semaine post-vêlage pour le métabolisme protéique, et la 8^e semaine post-vêlage pour le métabolisme lipidique (Tamminga et al., 1997, Lucy et al., 2009). Lors d'une dépense énergétique importante, bien que les acides aminés composant les muscles squelettiques soient une réserve d'énergie, l'organisme puise davantage dans les tissus adipeux (McNamara et Hillers, 1986, Tamminga et al., 1997). Les réservoirs majeurs de tissus adipeux chez la vache sont : le gras omental,

mésentérique, péri-rénal, sous-cutané, intra/intermusculaire et la moelle osseuse (Wright et Russel, 1984).

3.1 Endocrinologie de la lipolyse

Lors de demande énergétique importante, il y a une augmentation de la concentration sanguine d'hormone de croissance (GH) (Etherton et Bauman, 1998). Sécrétée par l'hypophyse antérieure (Mayo et al., 1995), elle a une action antagoniste à l'insuline et limite l'expression de la sous-unité p85 α de la phosphoinositide-3-kinase dans les tissus adipeux (Radcliff et al., 2003, Rhoads et al., 2004, Lucy et al., 2009). Cette enzyme joue un rôle essentiel dans la capture du glucose et le métabolisme des lipides induit par l'insuline (del Rincon et al., 2007). Sa sécrétion permet donc une augmentation du glucose sérique, et ce, même si l'insuline est à une concentration normale (Herdt, 2002b). Ce phénomène est responsable de la résistance à l'insuline des tissus périphériques dont les vaches hautes productrices sont fréquemment atteintes dans les quatre premières semaines post-vêlage (Roche et al., 2009). Une résistance à l'insuline est présente lorsque des niveaux d'insuline plus élevés que la normale sont nécessaires pour obtenir une réponse métabolique (Oikawa et Oetzel, 2006, Chagas et al., 2009). Par conséquent, de hautes concentrations de GH au vêlage facilitent la lipomobilisation (Liesman et al., 1995), inhibent la lipogénèse, et causent une augmentation du glucose sérique disponible pour les tissus pouvant capturer ce dernier indépendamment de l'insuline, notamment, la glande mammaire (Bell et Bauman, 1997, Vernon et Pond, 1997).

L'insuline est sécrétée par les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas. Sa relâche est stimulée lors d'hyperglycémie ou par le peptide inhibiteur gastrique, une entérogastrone libérée par les cellules glandulaires du duodénum et du jéjunum lors de l'absorption de saccharides chez les non-ruminants (Herdt, 2002a). Chez les ruminants, la relâche d'insuline et de glucagon est stimulée par la glycémie, puisque peu de saccharides proviennent du tractus intestinal (Sasaki, 2002). Le glucagon, quant à lui, est une hormone sécrétée par les cellules α des îlots de Langerhans du pancréas. De hautes concentrations sériques de glucose inhibent la sécrétion de glucagon alors que de hautes concentrations en acides aminés la stimulent. L'hypoglycémie stimule la sécrétion de glucagon et son action sur les hépatocytes consiste à y phosphoryler la lipase hormono-sensible (HSL). Cette dernière enzyme est déphosphorylée en présence d'insuline. Une augmentation sérique du glucagon stimule la néoglucogénèse et la glycogénolyse hépatique (De Boer et al., 1986). Pour les tissus adipeux, la levée de l'action de l'insuline suivant la phosphorylation de la HSL permet l'hydrolyse des triglycérides et la libération de leurs chaînes d'acide gras (Haemmerle et al., 2003).

En début de lactation, les concentrations de glucagon sont stables alors que les concentrations d'insuline sont inférieures à la normale (Sartin et al., 1988). Le ratio insuline/glucagon est alors plus faible qu'à l'habituel. Ce ratio détermine si le métabolisme tend vers l'anabolisme (i.e. ratio élevé) ou le catabolisme (i.e. ratio faible) davantage que la concentration respective des deux hormones individuelles. Le ratio insuline/glucagon influence non seulement le devenir du glucose et des tissus adipeux, mais également le devenir des acides aminés endogènes et exogènes en les dirigeants

vers la synthèse de glucose ou la synthèse de nouvelles protéines (Unger, 1972, De Boer et al., 1986).

L'insuline contrôle l'expression du gène codant pour la leptine chez la vache (Houseknecht et al., 2000, Cummings et Foster, 2003). Cette dernière est sécrétée presque exclusivement par les adipocytes et est responsable de la sensation de la faim en agissant sur le cerveau (Roche et al., 2008). Les faibles concentrations en insuline retrouvées en période post-partum entraîne une diminution de l'expression du gène codant pour la leptine ce qui peut expliquer une hausse progressive de la CVMS (Leury et al., 2003).

D'autre part, les catécholamines, épinéphrine et norépinéphrine, sécrétées par le système nerveux sympathique innervant les tissus adipeux, stimulent la HSL en la phosphorylant ainsi que la sécrétion de GH (Etherton et Bauman, 1998, Roche et al., 2009). De nombreux éléments stressants stimulent les signaux β -adrénergiques en période péripartum : vêlage, début de la lactation, changement de diète, ainsi qu'augmentation de la fréquence des déplacements et des manipulations par les humains.

3.2 Devenir des acides gras libres

Lors de la lipolyse, les AGL se lient à l'albumine qui les transporte dans la circulation sanguine. Plus la de lipolyse est élevée, plus le ratio AGL/albumine est élevé. Par conséquent, les AGL se lient à des sites sur l'albumine pour lesquels ils ont moins d'affinité, facilitant la liaison avec les tissus ayant besoin d'AGL, dont entre autres, la glande mammaire (Roche et al., 2009). Lors de lipomobilisation, l'albumine

saturée ne peut lier davantage d'AGL, qui sont alors capturés par le foie. Ce dernier capte de 7 à 25% des AGL circulants selon leur concentration et le flot sanguin (Bell, 1979, Reynolds et al., 1988, Emery et al., 1992). Selon l'état physiologique en cours, ces AGL peuvent être 1) estérifiés en triglycérides pour être stockés ou exportés vers les tissus périphériques ou 2) subir une oxydation totale ou partielle et servir de source d'énergie (Roche et al., 2009) (Figure 1).

3.2.1 Stockage et exportation des acides gras libres

La capacité d'exportation des triglycérides sous forme de *very low density lipoprotein* (VLDL) est limitée. Il semble que l'apoprotéine B est l'élément limitant la génération des VLDL puisque les bovins ont une capacité de synthèse limitée de cette dernière (Avramoglu et Adeli, 2004). Cette incapacité d'exporter les triglycérides vers la circulation sanguine en période importante et prolongée de lipomobilisation entraîne une accumulation de triglycérides dans le foie d'où les problèmes de lipidose hépatique (Kleppe et al., 1988, Bobe et al., 2004, Grummer et al., 2004, Roche et al., 2009).

3.2.2 β -oxydation

Le transport dans le cytoplasme des AG vers les mitochondries se fait par l'entremise de la carnitine palmitoyltransférase-1 (CPT-1) (McGarry et Brown, 1997). Lorsque le glucose est converti en AG sous l'influence de l'insuline, la concentration élevée de malonyl coenzyme-A, un composé intermédiaire de la formation des acides gras, inhibe la CPT-1. À l'inverse, lors d'une forte période de lipolyse, l'inhibition est levée et les AG disponibles sont alors transportés vers la mitochondrie pour y être oxydés. La β -oxydation des AG dans les mitochondries produit de l'acétyl-CoA et des

agents réducteurs ; le nicotinamide adénine dinucléotide (NADH) et la flavine adénine dinucléotide (FADH). Le NADH permet de produire de l'énergie via l'adénosine triphosphate par le cycle de Krebs, alors que la FADH le fait par la chaîne de transport d'électron. L'excès d'acétyl-CoA produit par la β -oxydation est converti en acétoacétate, un corps cétonique, qui peut quitter la mitochondrie sans restriction vers le cytosol, où une partie sera convertie en d'autres corps cétoniques ; l'acétone et le β -hydroxybutyrate (BHB). La production de corps cétoniques est directement proportionnelle au taux de β -oxydation des AG (Herdt, 2000). Bien qu'énergétiquement moins efficace qu'une β -oxydation complète, les corps cétoniques sont une source importante d'énergie pour les ruminants (Duffield, 2000).

3.2.3 Hypercétonémie

L'hypercétonémie se définit comme une augmentation des corps cétoniques circulant avec ou sans signes cliniques : apathie, anorexie, pertes de poids rapide, fèces sèches avec ou sans signes nerveux (Smith, 2002, Fleming, 2008, Gordon et al., 2013). La sévérité de l'expression clinique semble dépendre de la capacité de l'individu à métaboliser les corps cétoniques (Herdt, 2000).

Plusieurs études observationnelles rapportent des associations entre l'HYK et certaines conditions. Chapinal et al. (2011) rapportent une diminution de la CVMS associée à l'HYK se traduisant par une diminution de la production laitière de 1,0 à 2,2 kg/j durant les 30 premiers jours en lait (Dohoo et Martin, 1984, McArt et al., 2012a). De plus, une vache souffrant d'HYK est 4,5 fois plus à risque d'être réformée durant la même période (McArt et al., 2012b). Ospina et al. (2010), McArt et al. (2012a)

rapportent que les vaches atteintes d'HYK sont respectivement 6,1 et 6,9 plus à risque de souffrir d'un déplacement de l'abomasum. Duffield et al. (2009) rapportent que les vaches hypercétionémiques sont 3,4 fois plus à risque d'être atteintes de métrite. La littérature se contredit en regard des effets de l'HYK sur les performances en reproduction (Oetzel, 2013). Une cause probable de ces résultats variables est que les études observationnelles ne peuvent qu'établir l'existence d'associations entre des prédicteurs et une issue. Ce type d'étude ne permet pas d'établir si les associations identifiées représentent des relations causales (Andrade, 2014). Cependant, McArt et al. (2012a) ont observé que le moment auquel apparaît le premier épisode d'HYK a davantage d'impact sur la fertilité future que la valeur de BHB elle-même. Dans cette étude, les vaches diagnostiquées hypercétionémiques entre 3 et 7 JEL avaient un succès à la première saillie estimé à 0.7 fois celui des vaches dont le premier épisode se situait entre 8 et 17 JEL. Les coûts liés à un épisode d'HYK sont estimés à USD289 (McArt et al., 2015, Raboisson et al., 2015). Récemment au Québec, Santschi et al. (2016) ont évalué la prévalence moyenne d'HYK à 22,6% avec une prévalence plus importante pour les vaches en troisième lactation ou plus. Les proportions de troupeaux avec des prévalences $\leq 20\%$, 21-39%, 40-50% et $\geq 50\%$ étaient respectivement de 45%, 47%, 6% et 2%. Bref, puisque l'HYK a une forte prévalence dans les troupeaux laitiers, elle entraîne des pertes économiques considérables.

3.3 Évaluation de la mobilisation énergétique

Les pertes financières associées à la mobilisation graisseuse excessive en période post-partum font qu'une détection précoce est nécessaire afin d'agir

rapidement. Différentes méthodes diagnostiques directes et indirectes, ainsi que des méthodes de prévention ont été développées.

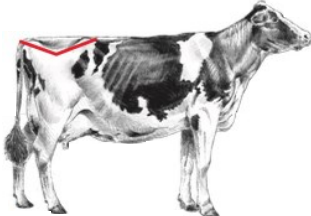
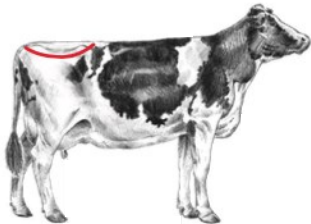
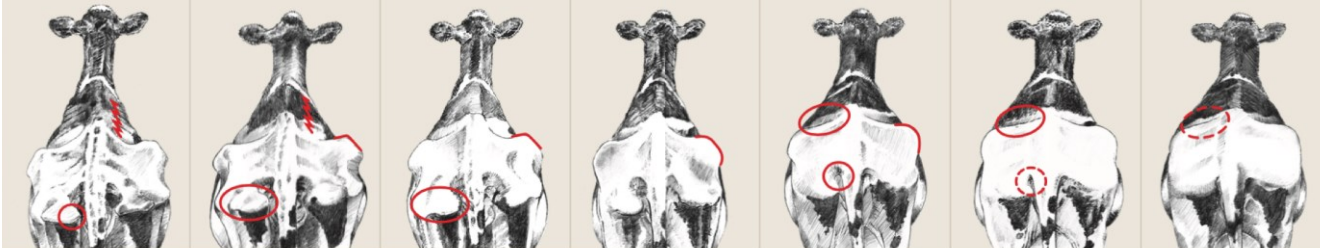
3.3.1 Indice de l'état de chair

L'indice de l'état corporel (IEC) ne permet pas d'évaluer l'HYK directement. Il permet d'apprécier l'état des réserves énergétiques de façons statique ou dynamique (une seule mesure *versus* la différence entre deux notes de l'IEC). L'échelle de l'IEC est une classification se rapportant à des observations visuelles, rapides, non invasives et relativement objectives permettant d'évaluer l'état corporel des bovins laitiers à n'importe quel stade de leur lactation et indépendamment de leur poids vif ou de leur taille. Au début des années 80, Wildman et al. (1982) a développé une échelle de 1 à 5 (1 : émaciée 2 : mince 3 : moyenne 4 : grasse 5 : obèse) corrélée à la quantité de gras sous-cutané ($r^2=0,90$) et de muscles ($r^2=0,72$) recouvrant les régions pelvienne et lombaire (Wildman et al., 1982, Wright et Russel, 1984, Gillund et al., 2001). Chez la vache, le gras sous-cutané représente près de 40-45% du gras corporel (Wright et Russel, 1984). Parallèlement à l'échelle de Wildman et al. (1982), d'autres méthodes d'évaluation de l'état corporel se sont développées dans différents pays (Earle, 1976, Mulvaney, 1981, Nicholson et Sayers, 1987, Macdonald, 2008). Au milieu des années 90, Ferguson et al. (1994) ont raffiné la première échelle et ont établi que les principaux descripteurs de l'IEC étaient le grand trochanter fémoral, les tubérosités ischiale et iléale, les ligaments ilio-sacral et ischio-coccygial ainsi que les apophyses transverses et épineuses des vertèbres lombaires (Tableau I).

Plusieurs études traitent de l'accord inter-observateur pour une observation de l'IEC. Bien que l'échelle rapportant l'IEC soit subjective, des valeurs de la statistique kappa très élevées (0,86) ont été rapportées pour des observateurs expérimentés (Ferguson et al., 1994, Kristensen et al., 2006).

L'indice de l'état de corporel évolue en fonction du stade de lactation. Au vêlage, l'IEC optimal se situe entre 3,0 et 3,25. Individuellement, il ne devrait pas diminuer de plus d'un point dans les premiers 30 JEL (Roche et al., 2009) et de 0,5 point au niveau du troupeau (Ferguson, 2002). Son nadir s'observe entre 40 et 100 JEL (McNamara, 1991, Pedron et al., 1993b, Gillund et al., 2001). Par la suite, l'apport énergétique est suffisant pour combler la dépense énergétique et l'IEC augmente progressivement jusqu'au tarissement. À partir de ce moment, il doit demeurer stable jusqu'à la parturition (Wildman et al., 1982, Gearhart et al., 1990, Ferguson, 2002). L'indice de l'état corporel observé en fonction du stade de production semble différent pour les primipares dont le nadir arrive plus tardivement par rapport aux multipares (Gallo et al., 1996, Dechow et al., 2004). De plus, le rythme auquel les taures regagnent du poids après le nadir est inférieure. Ce phénomène peut s'expliquer par la partition des nutriments vers la croissance (Berry et al., 2006). Cependant, la courbe de production laitière des vaches primipares dans laquelle le pic est inférieur et la persistance supérieure aux vaches multipares explique davantage cette variation de l'IEC (Friggens et Badsberg, 2007).

Tableau I. Charte décisionnelle de l'indice de l'état corporel basée sur les descripteurs anatomiques évalués par Ferguson et al. (1994). Adapté de *Body condition scoring in dairy cattle* – Elanco Animal Health.

Formes des marqueurs anatomiques	Indices de l'état corporel						
	2,25	2,50	2,75	3,00	3,25	3,50	3,75
Entre le trochanter fémoral et les tubérosités iléale et ischiale							
Tubérosité iléale	Angulaire			Ronde			
Tubérosité ischiale	Angulaire			Ronde			
Apophyses des vertèbres lombaires (% visible)	≥ 50			49-25			10 à 24
Ligament coccygien				Visible			Peu visible Non visible
Ligament sacral				Visible			Peu visible
							

Une accumulation importante de tissus adipeux augmente le risque qu'un écart important de CVMS soit observé en transition prépartum (Hayirli et al., 2003, Grummer et al., 2004). Les dernières études rapportent une CVMS de seulement 1,63% durant les trois premières semaines post-partum pour des animaux avec un IEC ≥ 4 au vêlage. Cependant, la CVMS maximale d'un animal gras survient environ cinq semaines plus tard que celui d'une vache ayant un IEC normal au vêlage (Garnsworthy et Topps, 1982). Il en découle un retour à l'équilibre énergétique plus tardif (Schulz et al., 2014) puisque dans les deux cas, les valeurs de CVMS maximales atteintes plus tard en lactation seront similaires. En médecine de population, l'IEC donne de l'information utile facilement perceptible sur l'état des réserves énergétiques des vaches ainsi que sur leur variation dans le temps. Durant les huit premières semaines après le vêlage, une vache peut cataboliser 8 à 57 kg de tissus adipeux et jusqu' à 6 kg de muscles (Tamminga et al., 1997). Conséquemment, les IEC évalués au vêlage et huit semaines plus tard sont normalement différents. Cette variation de l'IEC (Δ IEC) permet d'apprécier grossièrement la mobilisation des réserves énergétiques s'étant produite durant cette période.

3.3.2 Concentration sérique d'acides gras libres

Comme pour l'indice de l'état corporel, la concentration plasmatique d'AGL reflète le degré de mobilisation lipidique. Par conséquent, il ne s'agit pas d'une mesure directe de l'HYK, mais d'une mesure objective de la mobilisation graisseuse. Certains seuils sont associés à un accroissement du risque d'HYK. Une concentration supérieure à 0,3-0,5 mEq/L entre les jours 14 et 2 avant la parturition est un signe de BEN, tout comme une valeur supérieure à 0,7-1,0 mEq/L entre 2 et 14 jours post-partum (Oetzel, 2004). Du point de vue du troupeau, la proportion d'animaux ayant une valeur supérieure à ces

seuils ne doit pas dépasser 15-25%. Les valeurs supérieures à ces seuils d'alarme sont associées à une production inférieure de 3 kg/j/vache ($P=0,04$) au premier contrôle laitier, un rapport de cotes réduit du succès à la première saillie à 0,5 ($P=0,03$) (Cameron et al., 1998, Ospina et al., 2013).

3.3.3 Concentration en β -hydroxybutyrate

La quantité de BHB retrouvée dans le sang et dans le lait reflète la capacité hépatique à oxyder les AG. Les concentrations qui s'y retrouvent permettent d'évaluer directement la cétonémie. Bien que majoritaire produit par le foie, une autre source de BHB est l'acide butyrique produite dans le rumen. Lorsqu'il passe au travers des différentes cellules de l'épithélium des papilles du rumen, presque tout cet AGV est transformé en BHB. La glande mammaire peut également synthétiser des de corps cétoniques (Herdt, 1998). Une concentration supérieure à 0.6-0.8 mmol/L en période prépartum est signe d'un BEN, tout comme une concentration supérieure à 1,0-1,4 mmol/L en période post-partum (Duffield, 2000, Oetzel, 2004, Ospina et al., 2013). Du point de vue du troupeau, la proportion d'animaux ayant une valeur supérieure à ces seuils ne doit pas dépasser 10-12%. Les valeurs supérieures à ces seuils d'alarme sont des facteurs de risque pour un succès à la première saillie inférieur à 40%, une prévalence de mortalité embryonnaire $\geq 6,3\%$, ainsi qu'une prévalence de réforme précoce suivant le vêlage $\geq 13,3\%$ (Oetzel, 2004, Dubuc et Denis-Robichaud, 2017).

4. Modification du bilan énergétique

Rééquilibrer totalement le bilan énergétique en début de lactation est chose presque impossible. Il est cependant envisageable de l'améliorer en jouant sur deux plans : augmenter l'apport énergétique ou diminuer la dépense énergétique.

4.1 Augmentation de l'apport énergétique

Tenant d'augmenter l'apport énergétique, plusieurs recherches ont investigués les facteurs affectant la CVMS. Ces éléments ont été abordés à la section 1.1. La CVMS étant limitée en début de lactation, il est difficile de l'augmenter d'une quelconque façon. Pour cette raison, peu d'avancées majeures récentes ont été observées à ce sujet. Une fois la CVMS maximisée, il faut optimiser le rendement énergétique de la ration. Une stratégie largement utilisée à cet effet est la supplémentation alimentaire avec du monensin. La traite prépartum a également été évaluée dans le but de prévenir la diminution de la CVMS avant le vêlage.

4.1.1 Monensin

Le monensin est un antibiotique/coccidiostatique polyéther carboxylique monovalent de la classe des ionophores isolé de la bactérie *Streptomyces cinnamonensis* (Haney et Hoehn, 1967). Il permet le mouvement de cations métalliques mono ou divalents à travers la membrane cellulaire (Huczynski et al., 2008). L'importante dépense énergétique entraînée par ce déséquilibre ionique mène à la mort de la cellule/micro-organisme. Dû à des différences dans la membrane cellulaire, le monensin inhibe la croissance des bactéries gram-positives et favorise celle des bactéries gram-négatives (Duffield et al., 2008a). Cette transformation de la flore du rumen entraîne un

changement dans les ratio d'AGV produits dans le rumen: réduction des acides acétique et butyrique et augmentation de la production d'acide propionique (Schelling, 1984).

Par l'augmentation de la production de ce dernier AGV, les effets du monensin sur la production de glucose sont bénéfiques pour les vaches en début de lactation souffrant du BEN et plus à risque d'être atteintes par l'HYK (Green et al., 1999). Son utilisation sous forme de capsule à relâchement continu administrée quelques semaines avant le vêlage ou en pré-mélange servi de la période de transition prépartum jusqu'à la fin de la lactation, est répandue afin d'optimiser le rendement de la ration par la flore ruminale qu'il sélectionne (Green, 1997, Duffield et al., 1998, Petersson-Wolfe et al., 2007, Dubuc et al., 2009, Mullins et al., 2012). Ainsi, lorsqu'elles consomment du monensin, les vaches ont des concentrations sanguines en BHB réduites de 13 %, en AGL réduites de 7% et en glucose augmentées de 3% (Duffield et al., 2008a).

Malgré ces avantages, l'utilisation de cette molécule n'est pas sans risque. Une réduction de la matière grasse du lait peut être observée dans les troupeaux servant des rations riches en acides gras insaturés (Duffield et al., 2008b). De plus, sa capacité à transporter des ions à travers les membranes cellulaires ne discrimine pas entre les bactéries et les cellules des mammifères. Par conséquent, un risque de toxicité pouvant entraîner la mort est inhérent lors de surdose. Ce risque est encore plus important chez les non ruminants (Butaye et al., 2003).

4.1.2 Traite prépartum

Les objectifs de cette approche sont de prévenir en période prépartum: 1) la diminution de la CVMS et 2) l'accumulation d'AG au foie en les détournant vers la synthèse du lait (Greene et al., 1988). Grummer et al. (2000) ont répartis 20 vaches

Holstein multipares en deux groupes : vaches traitent pour un minimum de 0,5 kg durant les 10 jours précédant le vêlage, vaches traitent uniquement après le vêlage. Les vaches traitent avant le vêlage avaient tendance ($P=0,13$) à consommer davantage que celles de l'autre groupe en période prépartum. En post-partum, leurs productions laitières étaient similaires, et il n'y avait pas d'effet sur les concentrations de glucose sanguin et d'AGL, ni sur les concentrations en triglycérides hépatiques. Vu l'absence d'effet significatif sur la CVMS et sur certains marqueurs du BEN, cette stratégie n'a pas suscité davantage de recherche.

4.2 Réduction de la dépense énergétique

Limiter la dépense énergétique après le vêlage représente un défi. Les besoins liés à l'entretien et à la croissance sont prioritaires et ne peuvent être réduits. À cette fin, il ne reste que la production laitière qui peut être modifiée, soit via les composantes ou le volume de lait produit.

4.2.1 Acide linoléique conjugué

L'acide linoléique conjugué (CLA) est un sous-produit d'une biohydrogénation incomplète des lipides par les bactéries ruminales (Chouinard et al., 2001). Il se retrouve naturellement dans le lait des bovins. Plusieurs études chez les humains associent sa consommation à la prévention du cancer, de l'athérosclérose et une meilleure réponse immunitaire (Whigham et al., 2000, Belury, 2002, Palmquist et al., 2005). Afin de valoriser la qualité des produits dérivés des bovins, l'industrie a tenté d'augmenter sa concentration dans le lait et dans la viande (Jenkins et al., 2008). Pour permettre à la vache d'en produire davantage dans le lait, il est possible d'augmenter la concentration

en acides gras insaturés de la diète, principalement l'acide linoléique, en ajoutant des grains qui en sont riches : soya, coton et tournesol (Gomez-Cortes et al., 2008). Donner de grandes concentrations de gras insaturés dans la ration altère l'activité de la biomasse du rumen. Un effet secondaire observé de l'ajout d'acide linoléique conjugué sous forme protégée dans la ration a été la diminution du taux de gras du lait (Baumgard et al., 2001, Jenkins et al., 2008).

Ainsi, il a été supposé qu'induire et contrôler une diminution du taux de gras du lait en ajoutant de la CLA s'avérerait utile pour limiter le BEN en début de lactation. Pourtant, autant sur le taux de gras du lait que sur certains marqueurs du BEN, la littérature n'atteint pas de consensus sur les effets de l'ajout de CLA protégé à la ration. Moore et al. (2004) ont évalué l'augmentation de la concentration de CLA à la ration du 10^e jour prépartum au 21^e JEL. Sans affecter la CVMS, la concentration en gras du lait des vaches allait en décroissant selon que la concentration en CLA était croissante. Pappritz et al. (2011) n'ont pas été en mesure de répéter les résultats de Moore et al. (2004) en période post-partum et ont observé uniquement une réduction d'environ 0.7% du taux de gras pour les animaux avancés en lactation. De plus, la CVMS était diminuée en post-partum. Dans ces deux études, aucun effet sur les marqueurs (AGL et BHB) du BEN n'a été démontré. En ajoutant du CLA à la ration de vaches avant et après la parturition, Bernal-Santos et al. (2003) n'ont pas observé de modification sur la CVMS. De plus, ils n'ont noté aucun changement des concentrations de glucose, AGL et BHB en pré et post-partum. Cependant, son apport réduisait le taux de gras et augmentait la production laitière de 3 kg/j durant les 20 premières semaines de lactation. Leur conclusion était que le CLA n'améliorait pas le BEN, mais permettait une meilleure répartition des nutriments vers la production laitière. Bref, la littérature ne supporte pas l'utilisation de CLA pour prévenir le

BEN, et par conséquent, l'HYK. Cependant, il pourrait être avantageux de l'utiliser pour améliorer d'autres paramètres dont la reproduction (Castaneda-Gutierrez et al., 2007).

4.2.2 Réduction de la fréquence de traite

Durant la première semaine de lactation, Loiseau et al. (2009) ont traité une seule fois par jour 11 vaches multipares de race Holstein qu'ils ont comparées à 11 multipares de même race traitées deux fois par jour. Bien que certains marqueurs (glucose, AGL et BHB) de la balance énergétique aient été améliorés, ce type de régime a entraîné une diminution de 8,1% de la production laitière durant les 13 semaines suivant le traitement. Phyn et al. (2014) ont obtenu des résultats similaires avec 150 animaux alimentés au pâturage. À l'inverse, augmenter la fréquence de traite à six fois par jour comparativement à trois fois par jour durant les trois premières semaines permettait un gain de production de 1118 kg sur une lactation corrigée de 305 jours (Dahl et al., 2004). Pour qu'il y ait augmentation et maintien de la lactogénèse, une stimulation mammaire biquotidienne ou plus semble préférable afin de permettre la sécrétion de prolactine. Appuyant ce dernier énoncé, Lacasse et al. (2011) ont démontré qu'il était possible de diminuer la production laitière en administrant un produit inhibant la sécrétion de prolactine. Un mécanisme suggéré du relâchement de prolactine est qu'une fois la glande mammaire stimulée physiquement (nettoyage, tétée, traite), les neurones du noyau paraventriculaire de l'hypothalamus produisent le peptide vasoactif intestinal, stimulant la relâche de prolactine par l'hypophyse postérieure (Herdt, 2002b). Lors de ce stimulus, les neurones de la voie tubéro-infundibulaire allant de l'hypothalamus à l'hypophyse cessent de sécréter la dopamine, un inhibiteur majeur de la prolactine (Herdt, 2002b). Bref, bien qu'efficace pour limiter le BEN, réduire la fréquence de traite n'a pas suscité

beaucoup d'intérêt de la part de l'industrie laitière vu la perte considérable de lait engendrée.

4.2.3 Réduction du volume de lait prélevé

Comme pour la réduction de la fréquence de traite, la réduction du volume de lait prélevé a été peu étudiée puisqu'une production laitière élevée dès le début de la lactation est habituellement visée par les intervenants œuvrant dans l'industrie laitière. Malgré tout, cette technique pourrait être utilisée sur une courte période en début de lactation, avec peu d'effets négatifs sur la production laitière totale (Carbonneau et al., 2012). Par ailleurs, bien qu'empirique, cette stratégie est déjà utilisée dans le but de prévenir l'hypocalcémie survenant après le vêlage (Thilsing-Hansen et al., 2002).

Sans altérer la fréquence de traite, sur une ferme expérimentale, Carbonneau et al. (2012) ont réparti 47 vaches Holstein multipares dans trois groupes correspondants à trois types de traites : une traite complète deux fois par jour pendant les cinq premiers jours en lait (JEL), une traite complète une fois par jour pour les JEL 3, 4 et 5 combinée à l'allaitement d'un veau, et finalement, une traite incomplète dans laquelle le volume de lait prélevé augmentait progressivement en fonction du nombre de JEL (JEL 1 : 6L ; JEL 2 : 8L ; JEL 3 : 10L, JEL 4 : 12L et JEL 5 : 14L). Dès le 6^e JEL, les animaux des trois groupes étaient traités deux fois par jour. Certains marqueurs du bilan énergétique étaient améliorés pour la traite incomplète et la traite combinée à l'allaitement d'un veau dans les JEL 3, 4 et 5 : concentration sanguine de glucose augmentée, concentrations sériques en AGL et BHB diminuées. De plus, contrairement à l'étude de Loisel et al. (2009) traitant de la réduction de la fréquence de traite et dans laquelle une réduction de la production laitière à long terme avait été notée, la production laitière observée dans les

trois protocoles de traite de Carbonneau et al. (2012) était similaire entre les semaines 2 et 9, soit jusqu'à la fin de l'étude.

Chapitre 2. Objectifs et hypothèses

Comme l'a introduit Carbonneau et al. (2012), réduire le volume de lait est une stratégie de prévention du BEN digne d'intérêt puisqu'il semble y avoir que des avantages. Maintenant, une étude à grande échelle s'impose afin de vérifier ses résultats sur le BEN et la production laitière en contexte commercial, et aussi pour évaluer ses effets sur l'incidence de maladies post-partum, les performances en reproduction, la santé mammaire, la réforme précoce et le bien-être animal. À l'exception de la BEN, tous ces aspects seront traités dans le cadre de la thèse de la docteure Catarina Krug. Comme présenté au quatrième chapitre du présent ouvrage, le sujet principal de ce mémoire est d'évaluer l'effet de la traite incomplète sur la cétonémie, la prévalence d'HYK et la variation de l'indice de l'état corporel en période post-partum. Nous avons formulé l'hypothèse qu'un protocole de traite incomplète en début de lactation auquel seront soumises des vaches Holstein multipares évoluant en contexte commercial diminuerait leur cétonémie, la prévalence d'HYK ainsi que l'ampleur de la perte de l'IEC en début de lactation associées au BEN.

Bien qu'il s'agisse d'une méthode subjective, nous avons utilisé la Δ IEC dans le temps afin d'avoir une information dynamique de la quantité des réserves énergétiques utilisées ou gagnées en période post-partum. Étonnement, aucune étude publiée ne traite de l'accord inter-observateur pour la Δ IEC. Puisque nous avons besoin de le connaître pour avoir une idée de la validité des résultats que nous devons interpréter dans l'étude présentée au quatrième chapitre, une deuxième étude a été menée parallèlement. Pour cette étude présentée au troisième chapitre de ce mémoire, nous avons émis l'hypothèse que si un écart aléatoire est présent entre les mesures de l'IEC obtenues par deux

évaluateurs, l'accord inter-évaluateur des Δ IEC (i.e.: différence entre deux IEC obtenus à des moments différents par un même évaluateur) serait inférieur à l'accord inter-évaluateur obtenu pour une seule mesure. Cependant, dans le cas d'un écart systématique des mesures de l'IEC obtenues par deux évaluateurs (ex.: un évaluateur surévalue toujours de 0,25 l'IEC comparativement à un autre), l'accord inter-évaluateur des Δ IEC serait supérieur à l'accord inter-évaluateur obtenu pour une seule mesure d'IEC.

Chapitre 3. Short communication: an observational study investigating inter-observer agreement for variation in time of body condition score in dairy cows

Article modifié de sa version dans le *Journal of Dairy Science*, Avril 2017, Volume 100(4), pages 3086-3090.

P.-A. Morin,^{*1} Y. Chorfi,[†] J. Dubuc,^{*} J.-P. Roy,^{*} D. Santschi,[‡] and S. Dufour[§]

^{*} Faculté de médecine vétérinaire, Département des sciences cliniques, Université de Montréal, 3200 rue Sicotte, CP 5000, Saint-Hyacinthe, QC, Canada, J2S 7C6

[†] Faculté de médecine vétérinaire, Département de biomédecine vétérinaire, Université de Montréal, 3200 rue Sicotte, CP 5000, Saint-Hyacinthe, QC, Canada, J2S 7C6

[‡] Valacta, Ste-Anne-de-Bellevue, QC, Canada, H9X 3R4

[§] Faculté de médecine vétérinaire, Département de pathologie et de microbiologie, Université de Montréal, 3200 rue Sicotte, CP 5000, Saint-Hyacinthe, QC, Canada, J2S 7C6

¹ Corresponding author: Pierre-Alexandre Morin, 3130, a.morin@umontreal.ca

Abstract

Body condition score (BCS) is strongly correlated with energy reserves. The ease, rapidity of scoring and the high intra- and inter-observer repeatability make it a widely-used herd management tool in bovine practice and in scientific studies. Loss or gain of BCS, rather than a single BCS measurement, is frequently used to monitor energy balance in dairy cows. It is unknown if the difference between two BCS measures taken at different moments (Δ BCS) would demonstrate inter-observer agreement like that of single BCS measurement. The objective of this study was to compare inter-observer agreement of BCS and Δ BCS in dairy cows when multiple observers perform data collection. An observational study was conducted between April and September 2015; three observers independently assessed BCS of 73 Holstein cows from one commercial dairy herd. Body condition score assessments of the animals were performed between 1 and 20 days in milk (early lactation; Exam-1) and again between 41 and 60 days in milk (peak of milk production; Exam-2). Quadratic weighted kappa (κ_w) were computed to quantify agreement between observers for single BCS measurements and for Δ BCS. For single BCS measurements, κ_w of 0.79 (95% CI: 0.69, 0.85) and 0.84 (95% CI: 0.77, 0.89) were obtained for Exam-1 and Exam-2, respectively. Such values would be interpreted as strong agreements and are consistent with the available literature on BCS repeatability. When computing agreement for Δ BCS, a κ_w value of 0.49 (95% CI: 0.32, 0.63) was obtained suggesting moderate agreement between observers. These findings suggest that studies investigating single BCS measures could use many observers with a high degree of accuracy in the results. When Δ BCS is the parameter of interest, more reliable results would be obtained if one observer conducts all assessments.

Key words: Dairy cow, body condition score, inter-observer agreement, kappa

Manuscript

In the early 80s, Wildman et al. (1982) developed a scale from 1 to 5 to evaluate body condition of dairy cattle at any stage of lactation regardless of body weight and size. The strong association between body condition score of dairy cows (**BCS**) and body energy reserves (Wright et Russel, 1984) and its ease of implementation as a herd management tool, led to its adoption in dairy herd management, as well as in scientific studies (Roche et al., 2009). To optimize data uniformity, most professionals prefer to have only one evaluator conducting all the BCS measurements (Kristensen et al., 2006). In large field trials conducted over long period of time, it is not always possible to have only one observer assessing all BCS. The relatively high intra/inter-observer agreement reported among experienced observers in previous studies could suggest that the use of more than one observer would have little impact on the accuracy of BCS measures (Ferguson et al., 1994, Kristensen et al., 2006). Measurement of BCS is usually performed during the peri-partum transition period to qualify loss or gain of energy reserves. For that purpose, difference of BCS (**ΔBCS**) is used and calculated by subtracting the most recent BCS value to its previous measurement for the same cow. Despite the wide use of ΔBCS for monitoring energy balance, no studies have reported the inter-observer repeatability of this measurement. The hypothesis is that, if disagreement between observers is systematic when conducting single BCS measurement, then ΔBCS could yield higher agreement than single BCS. On the other hand, if the difference between observers is random instead of systematic, then the ΔBCS, requiring two BCS measurements for computation, could potentially yield lower agreement. The objective of the current study is to evaluate inter-observer agreement of

Δ BCS computed by subtracting a BCS measure observed at the peak of milk production from another BCS measure observed during the early lactation, and to compare it with inter-observer agreement of single BCS measures.

The study protocol was presented to the Research Ethical Committee of the Université de Montréal (Saint-Hyacinthe, Qc, Canada). Since animals were only observed, the committee approved the current research without need for a certificate. An observational repeatability study was conducted from April to September 2015 in a single commercial dairy herd of 240 lactating Holstein cows conveniently selected and located near the Bovine Ambulatory Clinic of the Faculté de Médecine Vétérinaire of the Université de Montréal (St-Hyacinthe, QC, Canada). Cows in this herd were housed in a free stall barn, fed a total mixed ration, and milked by milking robots. Mean annual herd milk production was 11,000 kg per cow per year.

Sample size calculation was based on Rotondi et Donner (2012) using the package kappaSize developed for the R software 3.2.3 (The R Project for Statistical Computing, Vienna, Austria). For this analysis, the following parameters were used: an expected quadratic weighted kappa statistic (κ_w) value of 0.86 (Kristensen et al., 2006); a lower bound of 0.7 corresponding to the median of κ_w in the strong agreement category (Landis et Koch, 1977b); a higher bound set to “Not Available” allowing the procedure to generate the number of required subjects for a one-sided confidence interval; three observers; a desired type 1 error rate of 0.05; a normal distribution of BCS and Δ BCS in the population; and, finally, five possible categories of BCS (Wildman et al., 1982) with respective prevalence of 0.01, 0.3, 0.38, 0.3 and 0.01. With those settings, a total of 38 cows was estimated. The R package used for the current sample size estimation can only accommodate measurements in less or equal to five categories. Authors were aware that

the BCS scale they used include 9 categories (Ferguson et al., 1994). The power of a study generally increases as the number of categories for the variable evaluated increases, thus requiring a smaller sample size (Cohen, 1983). The sample size estimated for the current study was higher than the sample size truly needed. Nevertheless, the estimate of 38 cows was considered a minimum sample size due to the ease of collecting BCS measurements.

Before farm sampling begun, the observers, one veterinarian (observer 3) and two animal health technicians (observers 1 and 2), reviewed the BCS chart of Elanco™ based on the works of Wildman (1982) and Ferguson et al. (1994). Observers 1, 2 and 3 had, respectively, 15 years, 2 years and 9 years of experience at BCS scoring of dairy cows. Furthermore, observer 3 initially trained observer 2 at BCS scoring. Cows were systematically enrolled as they calved and examined simultaneously and independently by the three observers at two different moments. A first evaluation (**Exam-1**) was conducted in the first three weeks of lactation, and a second evaluation (**Exam-2**) was performed between sixth to eighth weeks of lactation. Observers were blinded to BCS values reported at first observation, and to the current and previous values from other observers. A minimum interval of 28 days between evaluations was enforced. Sampling cows in early lactation was chosen because this period is critical in term of energy deficiency, lipolysis, and weight loss (Smith et McNamara, 1990, Renaville et al., 2002, Lucy et al., 2009). Measures of BCS, and consequently subcutaneous fat, are generally at their nadir between 40 and 100 DIM (McNamara, 1991, Pedron et al., 1993a, Gillund et al., 2001) which generally reflects equality in energy inputs and outputs.

For each cow, the difference between BCS measurements obtained at Exam-1 and Exam-2 (Δ BCS) was computed for each observer using the two collected measurements.

Descriptive statistics (number of cows observed, minimum, maximum, median, lower, and upper quartiles) classified by observers were computed for BCS measures obtained at Exam-1, at Exam-2, and for Δ BCS using the MEANS procedure of SAS (version 9.4, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Scatter plots (SGPLOT procedure in SAS) comparing results across observers were built for single BCS measures observed at Exam-1 and Exam-2, as well as for Δ BCS, to visually compare agreement between all possible pairs of observers and with the equality line corresponding to perfect agreement (Dohoo et al., 2009c).

Body condition score is a qualitative ordinal measurement (Wildman et al., 1982, Ferguson et al., 1994). The κ_w statistic (Sim et Wright, 2005) was chosen to report agreement beyond chance so that more weight is attributed to large measurement differences than to small ones. For each pair of observers, agreements at Exam-1, at Exam-2, and for Δ BCS, were estimated using κ_w from the FREQ procedure of the SAS software (version 9.4, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). The Bowker's test of symmetry (Bowker, 1948), testing for equal κ_w coefficients for multiple strata with multiple categories, was used to assess heterogeneity between pairs. When this test was statistically non-significant, an overall κ_w was produced (Kristensen et al., 2006). Based on Fleiss (1971) and Landis et Koch (1977a), a κ_w value aggregating the three observers together is equivalent to the weighted average of the individual pairs. These overall κ_w values (Barnhart et al., 2002) were calculated using a macro created by Carrasco et al. (2013) and developed for the SAS software (version 9.4, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). This macro can be used to calculate the concordance correlation coefficient, which has been shown to be equivalent to the quadratic κ_w when applied to ordinal categorical data (King et Chinchilli, 2001). Unfortunately, this macro does not calculate the descriptive

parameters of the concordance correlation coefficient: the location-shift, the scale shift and the Pearson correlation coefficient. The interpretations of κ and κ_w values suggested by (Landis et Koch, 1977b) were used for interpretation.

A total of 73 cows were initially enrolled in the study. Nine cows could not be observed by one of the observer at the first exam and were excluded from the single BCS measurement Exam-1 and from the Δ BCS analyses. These cows were not excluded from the single BCS Exam-2 analyses. Eight cows were culled after their first exam and were excluded from the single BCS Exam-2 and Δ BCS analyses. Therefore, a total of 64, 65, and 57 cows were included in the single BCS Exam-1, single BCS Exam-2, and Δ BCS analyses, respectively.

Descriptive statistics for single BCS measurements and for Δ BCS are presented in Table II while their distributions can be visualized in Figure 2. Inter-observer agreements for Exam-1, Exam-2 and Δ BCS are also presented in Figure 2. Examination of the scatter plots suggests a slightly larger disagreement between observers 1 and 2 and between observers 1 and 3 when evaluating single BCS and Δ BCS compared to observers 2 and 3. When visually appraising agreements between observers for single BCS measures compared to agreements for Δ BCS measures, Δ BCS measures seemed to produce larger disagreement as indicated by the larger shift in slope observed on the scatter plots. The maximum difference between observers for single BCS measures was 0.75 point. Disagreements ≤ 0.50 and 0.25 point were observed in 99% and 93% of observations, respectively. Perfect agreement was observed in 48% of observations.

Regarding Δ BCS measures, the maximum difference between observers was 0.75 point. Disagreements ≤ 0.5 and 0.25 point were observed for 97.7% and 83.6% of observations, respectively. Perfect agreement was observed in 33.3% of observations.

P-values from the Bowker's test of symmetry for Exam-1, Exam 2 and Δ BCS were all greater or equal to 0.96 indicating that heterogeneity was not a problem. Overall quadratic κ_w values of 0.79 (95%CI: 0.69, 0.85) for single BCS measures at Exam-1 and of 0.84 (95%CI: 0.77, 0.89) at Exam-2 were obtained. These results suggest strong to almost perfect agreement between observers for single BCS measurements. For Δ BCS, this parameter was 0.49 (95%CI: 0.32, 0.63) suggesting moderate agreement between observers.

Results suggest that multiple experienced observers could be used to collect single BCS measures for monitoring or epidemiological studies with almost perfect consistency. When evaluating Δ BCS, moderate agreement between observers would be obtained. Depending on the objective pursued, the number of observers, and the inter-observer homogeneity between BCS ratings, the Δ BCS data obtained using different observers may still be acceptable. The authors also evaluated agreement of Δ BCS between pair of observers when Exam-1 was conducted by one observer and Exam-2 by another observer. In such case, a quadratic κ_w value of 0.52 (95%CI: 0.40, 0.63) was observed. This value is within the confidence interval of the overall quadratic κ_w value obtained from the Δ BCS assessed by the same observer at different time. In the situation where more than one observer cannot be avoided for data collection, the agreement between observers would not necessarily be affected if cows were to be rated by different observers on the two different occasions. Because the intra-observer agreement is usually higher than the inter-observer agreement, the authors would suggest, therefore, that Δ BCS values should be computed, whenever possible, using readings collected by one observer. In this study, however, an important homogeneity between the ratings from the three observers was noted. Observer 3 scored much more 3.00 (Exam-1: 31 and

Exam-2: 31) values compared to Observer 1 (Exam-1: 15 and Exam-2: 15) and Observer 2 (Exam-1: 21 and Exam-2: 19), and few 2.75 (Exam-1: 0 and Exam-2: 1) compared to Observer 1 (Exam-1: 13 and Exam-2: 12) and Observer 2 (Exam-1: 7 and Exam-2: 5) All the other categories had similar numbers of observations. When a low homogeneity between observers is expected, quality of Δ BCS measurements could possibly suffer from using different observers at first and second exams. In the current study, no extreme BCS values (i.e. BCS of 1 or 5) were observed and practically all values ranged between 2.5 and 3.5. This could be explained by the good management of the farm selected for this study, which may not be representative of less well managed herds. The three observers who rated the cows worked together daily as part of their veterinary clinical appointments. Their BCS assessments were, therefore, possibly more homogenous than what would be expected when comparing various independent observers. In the current study, errors between observers when conducting single BCS measurement appears to have been generated by a random, rather than a systematic process. A systematic error would have been detected by observing the descriptive values shown in Table II. really small difference between observers In the authors' opinion, this observation is probably representative of the reality and systematic error in single BCS measurement between observers is unlikely to occur. Because BCS is scaled in many categories, it would be unlikely that an observer shifted all his classifications on the lean side or on the fat side. However, if it happened a new training could calibrate the observer in fault to suppress this systematic error.

For practical reasons, and because the aim of the current study was on inter-observer agreement, repeated BCS measurements within the same observers were not collected and intra-observer agreement could not be computed. As suggested by Garcia

et al. (2015), before computing inter-observer agreement, the first step in a validation process should be the assessment of the intra-observer agreement to evaluate if observers agree at least with themselves. The latter study gave an example where two observers using a categorical scale have intra-observer agreement of 0.80. In such case, the expected inter-observer agreement would be 0.64 (0.80 times 0.80) illustrating the fact that a low intra-observer agreement for even just one rater would inevitably lead to a lower inter-observer agreement. Although intra-observer agreement could not be estimated in the current study, Garcia et al. (2015) findings suggest that it would be greater than the observed inter-observers agreement value. The high inter-observer agreements observed in both exams of the present study suggest higher intra-observer agreements.

To conclude, when Δ BCS is the parameter of interest, more reliable results would be obtained if one observer conducts all assessments. When single BCS measurements are of interest, more than one observer could be used with a high degree of accuracy in the results.

This research was funded by the senior author (Dufour) National Sciences and Engineering Research Council of Canada Discovery Grant (Grant number RGPIN/435637-2013).

References

- Barnhart, H. X., M. Haber, and J. Song. 2002. Overall concordance correlation coefficient for evaluating agreement among multiple observers. *Biometrics*. 58:1020-1027.
- Bowker, A. H. 1948. A test for symmetry in contingency tables. *J Am Stat Assoc*. 43:572-574.
- Carrasco, J. L., B. R. Phillips, J. Puig-Martinez, T. S. King, and V. M. Chinchilli. 2013. Estimation of the concordance correlation coefficient for repeated measures using SAS and R. *Comput Methods Programs Biomed*. 109:293-304. 10.1016/j.cmpb.2012.09.002.
- Cohen, J. 1983. The cost of dichotomization. *Appl Psychol Meas*. 7:249-253.
- Dohoo, I. R., S. W. Martin, and H. Stryhn. 2003. *Veterinary epidemiologic research*. 1st ed. AVC Inc., Charlottetown, P.E.I., Canada.
- Ferguson, J. D., D. T. Galligan, and N. Thomsen. 1994. Principal descriptors of body condition score in Holstein cows. *J. Dairy Sci*. 77:2695-2703. 10.3168/jds.S0022-0302(94)77212-X.
- Fleiss, J. L. 1971. Measuring nominal scale agreement among many raters. *Psychol Bull*. 76(5):378-382.
- Garcia, E., K. Konig, B. H. Allesen-Holm, I. C. Klaas, J. M. Amigo, R. Bro, and C. Enevoldsen. 2015. Experienced and inexperienced observers achieved relatively high within-observer agreement on video mobility scoring of dairy cows. *J. Dairy Sci*. 98:4560-4571. 10.3168/jds.2014-9266.

- Gillund, P., O. Reksen, Y. T. Grohn, and K. Karlberg. 2001. Body condition related to ketosis and reproductive performance in Norwegian dairy cows. *J. Dairy Sci.* 84:1390-1396. 10.3168/jds.S0022-0302(01)70170-1.
- King, T. S. and V. M. Chinchilli. 2001. A generalized concordance correlation coefficient for continuous and categorical data. *Stat Med.* 20:2131-2147. 10.1002/sim.845.
- Kristensen, E., L. Dueholm, D. Vink, J. E. Andersen, E. B. Jakobsen, S. Illum-Nielsen, F. A. Petersen, and C. Enevoldsen. 2006. Within- and across-person uniformity of body condition scoring in Danish Holstein cattle. *J. Dairy Sci.* 89:3721-3728. 10.3168/jds.S0022-0302(06)72413-4.
- Landis, J. R. and G. G. Koch. 1977a. An application of hierarchical kappa-type statistics in the assessment of majority agreement among multiple observers. *Biometrics.* 33:363-374.
- Landis, J. R. and G. G. Koch. 1977b. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics.* 33:159-174.
- Lucy, M. C., G. A. Verkerk, B. E. Whyte, K. A. Macdonald, L. Burton, R. T. Cursons, J. R. Roche, and C. W. Holmes. 2009. Somatotropic axis components and nutrient partitioning in genetically diverse dairy cows managed under different feed allowances in a pasture system. *J. Dairy Sci.* 92:526-539. 10.3168/jds.2008-1421.
- McNamara, J. P. 1991. Regulation of adipose tissue metabolism in support of lactation. *J. Dairy Sci.* 74:706-719. 10.3168/jds.S0022-0302(91)78217-9.
- Pedron, O., F. Cheli, E. Senatore, D. Baroli, and R. Rizzi. 1993. Effect of body condition score at calving on performance, some blood parameters, and milk fatty acid

- composition in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 76:2528-2535. 10.3168/jds.S0022-0302(93)77588-8.
- Renaville, R., M. Hammadi, and D. Portetelle. 2002. Role of the somatotropic axis in the mammalian metabolism. *Domest. Anim. Endocrinol.* 23:351-360.
- Roche, J. R., N. C. Friggens, J. K. Kay, M. W. Fisher, K. J. Stafford, and D. P. Berry. 2009. Invited review: Body condition score and its association with dairy cow productivity, health, and welfare. *J. Dairy Sci.* 92:5769-5801. 10.3168/Jds.2009-2431.
- Rotondi, M. A. and A. Donner. 2012. A confidence interval approach to sample size estimation for interobserver agreement studies with multiple raters and outcomes. *J Clin Epidemiol.* 65:778-784. 10.1016/j.jclinepi.2011.10.019.
- Sim, J. and C. C. Wright. 2005. The kappa statistic in reliability studies: use, interpretation, and sample size requirements. *Phys Ther.* 85:257-268.
- Smith, T. R. and J. P. McNamara. 1990. Regulation of bovine adipose tissue metabolism during lactation. 6. Cellularity and hormone-sensitive lipase activity as affected by genetic merit and energy intake. *J. Dairy Sci.* 73:772-783.
- Wildman, E. E. J., G.M.; Wagner, P.E.; Boman, R.L.; Troutt H.F.; Lesch T.N. . 1982. A dairy cow body condition scoring system and its relationship to selected production characteristics. *J. Dairy Sci.* 65:495-497.
- Wright, I. A. and A. J. F. Russel. 1984. Partition of fat, body-composition and body condition score in mature cows. *Anim Prod.* 38:23-32.

Table II. Descriptive statistics of body condition score measured by three different observers on a cohort of 73 cows from one commercial dairy.

Time	Observer	N ¹	Minimum	Lower quartile	Median	Upper quartile	Maximum
Exam-1 ²	1	64	2.00	2.75	3.25	3.25	4.00
Exam-1 ²	2	64	2.25	3.00	3.25	3.25	4.00
Exam-1 ²	3	64	2.00	3.00	3.00	3.25	4.00
Exam-2 ³	1	65	2.00	2.75	3.00	3.25	4.00
Exam-2 ³	2	65	2.25	2.75	3.00	3.00	3.75
Exam-2 ³	3	65	2.25	2.75	3.00	3.25	3.75
Δ BCS ⁴	1	57	-0.75	0.00	0.25	0.50	1.00
Δ BCS ⁴	2	57	-0.75	0.00	0.25	0.50	0.75
Δ BCS ⁴	3	57	-0.75	0.00	0.25	0.50	1.00

¹ Number of cows

² Evaluation between 1-20 days in milk

³ Evaluation between 41-60 days in milk

⁴ Difference in body condition score (BCS at Exam-1 minus BCS at Exam-2)

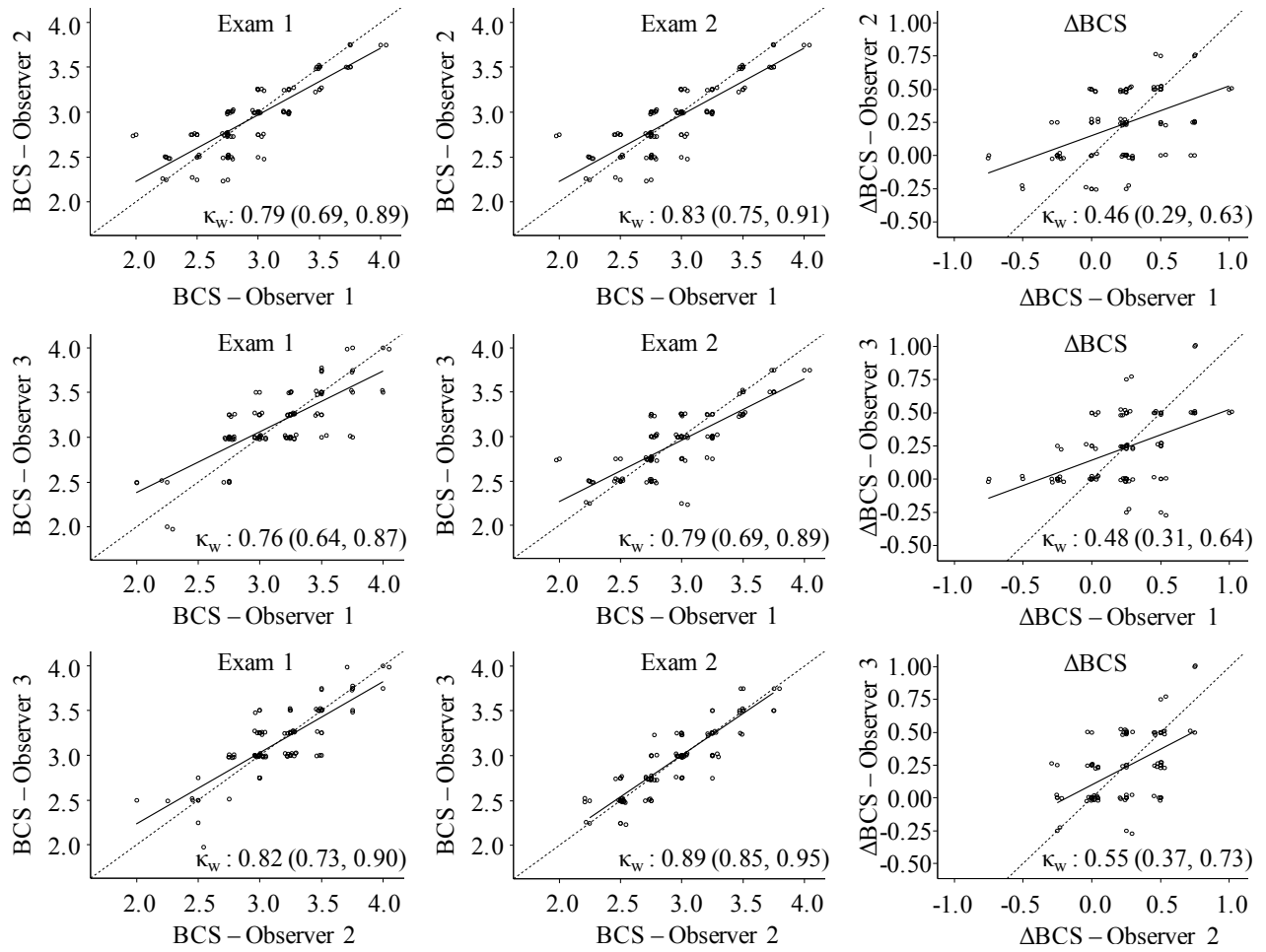


Figure 2. Scatter plots of body score condition (BCS) at Exam-1 (1-20 days in milk), Exam-2 (41-60 days in milk), and for difference in BCS between Exam-1 and Exam-2 (Δ BCS), for each pair of observers, with quadratic weighted kappa (κ_w) and its 95% confidence interval (95%CI); BCS were measured by three different observers on a cohort of 73 cows from one commercial dairy.

Chapitre 4. A randomized controlled trial on the effect of incomplete milking during early lactation on ketonemia and body condition loss in Holstein dairy COWS

Article modifié de sa version acceptée dans le *Journal of Dairy Science*. Janvier 2018.

P.-A. Morin,* C. Krug,† Y. Chorfi,‡ J. Dubuc,* P. Lacasse,§ J.-P. Roy,* D. E. Santschi,# and S. Dufour†¹

* Département des sciences cliniques, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, 3200 rue Sicotte, Saint-Hyacinthe, QC, Canada, J2S 2M2

† Département de pathologie et de microbiologie, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, 3200 rue Sicotte, Saint-Hyacinthe, QC, Canada, J2S 2M2

‡ Département de Biomédecine vétérinaire, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, 3200 rue Sicotte, Saint-Hyacinthe, QC, Canada, J2S 2M2

§ Sherbrooke research and development center, Agriculture and Agri-food Canada, 2000 College, Sherbrooke, QC, J1M 0C8, Canada

Valacta, Ste-Anne-de-Bellevue, QC, Canada, H9X 3R4

Abstract

Limiting milk production for a short period of time in early lactation could be a relevant strategy to prevent hyperketonemia (HYK). From December 2013 to March 2015, 838 multiparous Holstein cows from 13 herds were enrolled in a randomized controlled trial evaluating the impact of incomplete milking in early lactation on ketonemia and its effect on body condition score (BCS) loss. Cows were randomly assigned four weeks before expected calving date to one of two treatment groups: 1- a conventional milking protocol (CON) for which cows were completely milked or 2- an incomplete milking protocol (INC) for which a maximum of 10-14 kg of milk per day were withdrawn during the first 5 DIM. β -hydroxybutyrate (BHB) concentrations were measured from blood samples collected on each cow three times at weekly intervals. Hyperketonemia was defined as BHB \geq 1.4 mmol/L. Body condition score variation, in the post-calving period, was calculated by subtracting BCS assessed at week seven from BCS assessed at first week after calving. Effect of treatment on ketonemia and prevalence of HYK were evaluated for four specific time periods: 1-3 DIM, 4-7 DIM, 8-17 DIM, and 18-26 DIM. Effect of treatment on ketonemia was investigated using linear mixed models with natural logarithm of BHB measurements as outcome, and treatment groups as fixed effect. Generalized linear mixed models with HYK as outcome, using logit link, and treatment groups as fixed effect, were used to investigate effect of treatment on odds of HYK. A logistic regression model with BCS loss (< 0.75 or ≥ 0.75) as outcome and treatment groups and herd as fixed effects, was used to study effect of INC on odds of having BCS loss ≥ 0.75 . A total of 813 lactations had complete data and were used for statistical analysis of ketonemia and HYK. A total of 709 lactations

had complete data and were used for analysis of BCS loss. Geometric means of blood BHB concentrations during the 1-3, 4-7, 8-17, and 18-26 DIM periods were, respectively, 0.72 (95% CI: 0.66, 0.80), 0.66 (95% CI: 0.60, 0.73), 0.90 (95% CI: 0.80, 1.01), and 0.93 (95% CI: 0.83, 1.05) mmol/L for INC, and 0.65 (95% CI: 0.59, 0.72), 0.79 (95% CI: 0.72, 0.87), 0.94 (95% CI: 0.84, 1.06), and 0.92 (95% CI: 0.82, 1.04) mmol/L for CON. Cows in INC group had lower ketonemia during the 4-7 DIM period. Predicted prevalence of HYK during the 1-3, 4-7, 8-17, and 18-26 DIM periods were, respectively 2.8 (95% CI: 3.2, 15.1), 4.6 (95% CI: 2.0, 10.0), 13.4 (95% CI: 8.4, 20.0), and 23.0 (95% CI: 17.4, 29.7) for INC, and 2.6 (95% CI: 2.5, 13.8), 10.7 (95% CI: 5.6, 19.3), 19.4 (95% CI: 13.0, 27.9), and 21.3 (95% CI: 16.0, 27.8) for CON. The INC treatment reduced the prevalence of HYK during the 4-7 DIM and 8-17 DIM periods. No association was observed between INC and BCS loss in post-calving period. Overall, the incomplete milking protocol was effective for reducing ketonemia and prevalence of HYK during the early post-partum period.

Key words: Dairy cow, ketosis, body condition score, incomplete milking, randomized controlled trial

Introduction

The peri-partum transition period is generally defined as the interval from three weeks before to three weeks after calving (Wang, 2012). This period covers the end of pregnancy, parturition, and early lactation. Major hormonal, metabolic and nutritional changes occur during this period while the animal aims to maintain homeostasis, to

start lactogenesis, and to allow growth of the fetus and the cow itself (Bauman et Currie, 1980). In parallel to these changes, the cow's DMI increases from its nadir, at calving, to peak between the 10th and 14th weeks of lactation (NRC, 2001). Unfortunately, this peak of DMI is not synchronized with milk peak yield, which is usually observed between the fourth and eighth week of lactation (Keown et al., 1986). Because of the gap between DMI and milk peaks, an unavoidable period of negative energy balance (**NEB**) occurs (Holtenius et Holtenius, 1996). Carbohydrates are depleted quickly and cows have to use fat and protein reserves as source of energy (Tamminga et al., 1997, Herdt, 2000). This fat mobilization usually leads to ketone bodies production, an important source of energy for ruminants (Herdt, 2000). When excessive ketone bodies accumulate in blood, hyperketonemia (**HYK**) can occur and is associated with various health issues (Suthar et al., 2013, McArt et al., 2015). Thresholds of blood BHB values from ≥ 1.0 mmol/L to ≥ 1.4 mmol/L have been suggested to define HYK (Geishauser et al., 2000, Duffield et al., 2009, Ospina et al., 2010). Using milk BHB values, Santschi et al. (2016) showed that the overall prevalence of HYK in dairy herds in Québec (Canada) was 22.6%, with a higher prevalence for older cows (27.6%). Using blood BHB values from 126 commercial dairy herds in Québec (Canada), Dubuc et Denis-Robichaud (2017) observed a similar median herd prevalence (18%) with important variation (range: 4.0 to 75.0%). Average cost per case of HYK was estimated at CAD203 (Gohary et al., 2016) in Canada, €257 (Raboison et al., 2015) in Europe, and USD289 (McArt et al., 2015) in the United States.

To modulate NEB, most research focused on optimizing energy input during the transition period. Nonetheless, it is also possible to improve energy balance by

reducing energy demand. The latter could be achieved by limiting the amount of milk harvested for a few days at the beginning of lactation. In a previous study, this was achieved by milking cows once a day during the first week of lactation (Loiselle et al., 2009). In another study, the volume of milk harvested was restricted during the first five DIM without altering milking frequency (Carbonneau et al., 2012). While both strategies showed to be efficient for limiting NEB, milking cows once a day during the first week of lactation resulted in a reduction of 8.1% of the daily milk production over the first 13 weeks of lactation compared to cows milked twice a day. This important milk yield reduction makes this approach less applicable in a commercial dairy context. When limiting milk extracted without altering milking frequency, however, no negative residual effect of treatment on subsequent milk production was observed (Carbonneau et al., 2012). The strategy proposed by Carbonneau et al. (2012) shows great potential, but needs to be evaluated in a commercial farm environment. Therefore, the main objectives of this study were to evaluate the effect of an incomplete milking protocol (**INC**) on ketonemia and prevalence of HYK in early lactation. A secondary objective was to evaluate its effect on body condition loss from calving to milk peak. Our hypotheses were that those NEB markers would be improved by the proposed strategy.

Materials and methods

A randomized controlled trial (**RCT**) was conducted to achieve study objectives. Research protocol was approved by Animal Ethics Committee of the Université de Montréal (13-Rech-1701). The reporting guidelines for Randomized Control Trials in

Livestock and Food Safety statement (REFLECT) was used for planning the study and for preparing this manuscript (O'Connor et al., 2010).

Participants

A convenient sample of 13 commercial dairy herds located within 50 kilometres of Saint-Hyacinthe (Québec, Canada) were selected for this RCT. To be eligible, dairy producers had to accept: 1- to milk multiparous cows ($\geq 2^{\text{nd}}$ lactation) as indicated by the research team following the randomization process; 2- to record specific health events occurring on enrolled cows (dystocia, clinical hypocalcaemia, and retained placenta) ; 3- to allow minimally invasive sampling on their animals by the research team such as venipuncture of coccygeal vessels; 4- to share DHI records; and 5- to manually or electronically record milk production of each enrolled cow at least twice a week for the first three weeks of lactation. Results from ketonemia measurements were made available to dairy producers since many of them already used these measurements as part of their monitoring program. No recommendation was made, however, regarding the decision to treat an animal.

Sample Size Estimation

Sample size calculations were conducted *a priori* for each of the outcomes studied in this RCT using the POWER procedure of the SAS 9.4 software (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). The outcome requiring the largest sample size was odds of HYK. Assuming a prevalence of HYK of 12% in the CON group (Chapinal et al., 2011) and of 6% in the INC group (Carbonneau et al., 2012); a type I error rate of 0.05; and using a two-tail Fisher's exact test (Fisher, 1935); we estimated that a sample size of 386 animals per treatment group was required to achieve a power of 90%. Since these

calculations did not consider clustering of measurements by cows and herds, we aimed for 400 cows per group to hopefully achieve a study power > 80%.

Intervention

The INC treatment consisted of extracting no more than 10 kg of milk/d on DIMs 1 to 3, 12 kg of milk/d on DIM 4, and 14 kg of milk/d on DIM 5 without altering the milking frequency used on farm. This procedure was a modified version of the one applied by Carbonneau et al. (2012) where 6, 8, 10, 12, and 14L of milk were withdrawn, respectively, on DIM 1, 2, 3, 4, and 5 post-partum. This modification was made to facilitate the implementation of INC by milking employees on commercial dairies. Milk weights were estimated based on milking unit measurement or were read from a transparent graduated milking jar. For comparison, a group of cows conventionally milked (**CON**) was followed. Cows in this group were milked until milking unit was automatically removed based on farm usual procedures. Milking cows incompletely similarly to cows on the INC was part of the conventional milking routine of six herds for the first and second milkings after calving.

Treatment implementation was performed by dairy producers and/or trained employees. Depending on the herds, the number of employees involved in treatment implementation ranged from one to eight. The research team visited each farm once a week to enroll and allocate cows to treatment group 4 weeks before the expected calving date and to sample cows already enrolled.

Treatment allocation

For each herd, a list of expected calving dates was obtained and multiparous cows were allocated to CON or INC groups using series of random numbers generated

with the ALEA function of the Excel 2013 software (Microsoft, Redmond, Washington, USA). Approximately three to four weeks before the expected calving date, cows in the INC group were identified with a colored leg band. Since dairy producers had to apply treatment, they were not blinded to treatment allocation. Similarly, members of the team could not be blinded to group allocation when collecting samples on recruited cows.

Milk Production and Composition Data

In six of the thirteen participating farms, daily milk production was recorded by the milking system software from which they were directly retrieved. In the remaining herds, daily milk production was manually recorded by producers at least once a week for the first month of lactation and through monthly DHIA testing.

Outcomes and Effect Modifiers

Two primary outcomes and one secondary outcome were investigated to describe impact of treatment on NEB: ketonemia, prevalence of HYK, and BCS loss in early lactation.

Ketonemia and Hyperketonemia. Cows were sampled for blood BHB measurement once a week during the first three weeks in milk beginning at least 36 hours after calving. A dry 10 mL BD vacutainer (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA) was filled using venipuncture of the coccygeal vessels and immediately analyzed on farm with a Precision Xtra handheld device (Abbott Diabetes Care, Alameda, USA). Cows presenting blood BHB values ≥ 1.4 mmol/L were considered to have HYK (Duffield et al., 2009, Iwersen et al., 2009).

Variation in Body Condition Score in Early Lactation. Body condition scores (Wildman et al., 1982) were assessed for each cow at different time points by three

members of the research team: two veterinarians and one trained animal health technician. The five categories BCS scale was used with subcategories between the second and fourth categories : 1 (emaciated), 2 (thin), 3 (average), 4 (fat), 5 (obese) (Ferguson et al., 1994). Time points for BCS assessments were: 1-three to four weeks before expected calving date, 2-during the first week post-partum, 3- during the seventh week in milk. Body condition score variation in the post-calving period (**ΔBCS**) was computed by subtracting BCS assessed at the seventh week post-partum from BCS assessed at first week post-partum. It was divided in two categories: losses ≥ 0.75 point or < 0.75 point.

Periods of Interest. Based on Carbonneau et al. (2012) and McArt et al. (2012a) results, DIM at sampling were divided into four categories of importance: 1-3 DIM, 4-7 DIM, 8-17 DIM and 18-26 DIM. Effects of treatment on ketonemia and HYK were studied independently for each of these periods.

Potential Measure of Effect Modifiers. Putative effect modifiers were investigated to identify specific cow's characteristics that could improve the effect of the INC (Dohoo et al., 2009b). As potential variables that could modify the effect of the milking protocol on ketonemia, HYK, and Δ BCS, we considered: pre-calving BCS, parity, dry period length, previous lactation relative milk, fat, and protein production, use of a monensin controlled release capsule (**CRC**, Elanco, Guelph, ON, Canada), health issues occurring in early lactation, and finally, the herd itself (e.g. herd and feed management). Body condition score in the pre-calving period was dichotomized as < 3.75 or ≥ 3.75 (Pedron et al., 1993a). Because a certain amount of energy is still needed for growth in 2nd lactation cows, parity was dichotomized into parity 2 and parity ≥ 3 . Dry period

length was divided into three categories: short (≤ 45 days), usual (46-64 days) and long (≥ 65 days). Previous lactation relative milk, fat and protein productions were represented using breed class average for milk (**BCAM**), fat (**BCAF**), and protein (**BCAP**), respectively. Breed class average for milk, fat, and protein, are indices used by milk recording programs across Canada to compare milk, fat, and protein productions of cows from different breeds, ages, and calving season (Mason, 1997). These three variables were divided in two categories: low to average (< 250) and high (≥ 250). Cows receiving a CRC were compared to the ones not receiving such a device. Health events investigated for their potential role as measure of effect modifier were: dystocia, clinical hypocalcaemia, and retained fetal membranes. Dystocia was defined, as suggested by Djemali et al. (1987), as a calving necessitating one of these criteria : pull with two people, use of the fetal extractor, or veterinary procedures. Clinical hypocalcaemia was defined, as proposed by Horst et al. (1997), as the incapacity of a cow to rise within 36 hours after calving and resolved with calcium administration. Finally, retained placenta was defined, as suggested by Stevenson et Call (1988), as retention of fetal membranes more than 24 hours after calving.

Statistical Analyses

Three statistical models were computed: 1- a linear mixed model to evaluate effect of treatment (INC or CON) on ketonemia; 2- a generalized linear mixed model, using a logit link, to estimate the effect of treatment on odds of HYK; and 3- a logistic model to estimate the effect of treatment on odds of having a loss of BCS ≥ 0.75 point. An alpha threshold of 0.05 was used to conclude on significance.

Ketonemia. Due to lack of normality, blood BHB values were transformed using the natural logarithm transformation. Linear mixed models were computed with the MIXED procedure of the SAS software (version 9.4, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) for each period of interest to quantify the effect of treatment on the natural logarithm of blood BHB. With the sampling scheme used, a maximum of one ketonemia observation per cow was available during the 1-3, 4-7, and 18-26 DIM periods. For the 8-17 DIM period, cows could have two ketonemia measurements. For this reason, cow and herd random intercepts were used for this period, to account for clustering of observation by cows and herds. Only a herd random intercept was used for the 1-3, 4-7, and 18-26 DIM models. General model used for the 8-17 DIM period is presented at Equation 1. For the three other periods, the cow random intercept was removed from Equation 1.

Equation 1

$$\ln(\text{BHB})_{ijk} = \beta_0 + \beta_1 \text{Treatment}_{ijk} + v_{0k} + u_{0jk} + e_{0ijk}$$

where $\ln(\text{BHB})$ is the predicted natural logarithm of blood BHB for the i^{th} ketonemia measure, of the j^{th} cow, from the k^{th} herd; β_0 is the intercept; β_1 is the regression coefficient for treatment group; v_{0k} is the herd random intercept; u_{0jk} is the cow random intercept; and e_{0ijk} is the measurement error term. These last three terms are assumed to follow approximately normal distributions with homogenous variance across predicted values.

Statistical models were built following these steps: 1- for each period, models were computed with only treatment as predictor; 2- for each of potential effect modifiers

previously described, effect modification was evaluated by adding one effect modifier variable and a treatment by effect modifier interaction term to the model presented in Equation 1. Effect modifier variables were retained when the interaction term yielded a P -value < 0.05 to the F -test (Dohoo et al., 2009e). Potential effect modifiers were tested one by one to simplify interpretation. Regarding effect modification by herd, a random herd slope was added to Equation 1 (Dohoo et al., 2009d). Since significance of a random slope cannot be formally tested, regression lines representing the effect of treatment on blood BHB natural logarithm were plotted for each herd for a random intercept only model and for a random intercept and random slope model. This allowed visual comparison of the models to evaluate whether effect of treatment was similar among herds.

In linear regression, when the natural logarithm transformation is used, estimates and 95% confidence intervals (CI) can be back-transformed, but results are then interpreted on a multiplicative scale (i.e. BHB are multiplied by a factor of x for every one unit increase of the predictor) rather than on an additive scale (i.e. BHB increases by x for every one unit increase of the predictor) (Dohoo et al., 2009b). Estimates and 95% CI obtained were, therefore, back transformed and interpreted on the multiplicative scale.

Assumption of homoscedasticity was evaluated visually using the plot of standardised residuals against predicted values, and assumption of normality of residuals was evaluated using the Q-Q plot using the observation level residual. Because all variable tested were categorical, assumption of linearity was not investigated. Observations with leverage ≥ 0.005 or Cook's distance ≥ 1.0 were

investigated to detect pattern of observations not well explained by the models or having important influence (Cook et Weisberg, 1982, Dohoo et al., 2009b)

Hyperketonemia. A generalized linear mixed model using a logit link was computed with the GLIMMIX procedure of the SAS software (version 9.4, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) for each of the four DIM periods to evaluate effect of milking protocols on odds of HYK. Structure of the model for each period was like the ketonemia model (Equation 1) with clustering of observations by cows and herds for the 8-17 DIM period, and by herds for the 1-3, 4-7, and 18-26 DIM periods. Model used is presented in Equation 2.

Equation 2

$$Y_{ijk} \sim \text{Bernoulli}(P_{ijk})$$

$$\text{Logit}(P_{ijk}) = \beta_0 + \beta_1 \text{Treatment}_{jk} + v_{0k} + u_{0jk}$$

$$\text{Var}(Y_{ij} | P_{ijk}) = P_{ijk} (1 - P_{ijk})$$

where Y_{ijk} is a Bernoulli variable indicating whether the i^{th} blood sample, of the j^{th} cow, from the k^{th} herd yielded blood BHB $\geq 1.4\text{mmol/L}$, and this event is observed with probability P_{ijk} ; this probability is function of β_0 , the intercept, and of β_1 , the regression coefficient for treatment group; v_{0k} is the herd random intercept; u_{0jk} is the cow random intercept. These last two terms are assumed to follow approximately normal distributions with homogenous variance. Model construction was conducted similarly to ketonemia models. To facilitate interpretation, estimates were also transformed on a probabilistic scale using the invert logit function. If significant, interaction terms were

presented using the layout proposed by Knol et VanderWeele (2012), and relative excess risk due to interaction (**RERI**) was computed as described by Knol et al. (2007) with 95% CI estimated using bootstrapping. Assumptions of normality and homoscedasticity of cow and herds levels residuals were not verified. Linearity assumptions were always met because only categorical variables were used.

Body Condition Loss in the Post-Partum Period. For this analysis, only one observation per cow was available and, therefore, observations were only clustered by herds. However, due to an estimation problem, a generalized mixed model with a herd random intercept could not be used to fit this model. Instead, herd was treated as a fixed effect and a conventional logistic model was used with the LOGISTIC procedure of the SAS software (version 9.4, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) to evaluate effect of the milking protocol on odds of $\Delta\text{BCS} \geq 0.75$ point in early lactation. Model is presented in Equation 3.

Equation 3

$$Y_i \sim \text{Bernoulli}(P_i)$$

$$\text{Logit}(P_i) = \beta_0 + \beta_1 \text{Treatment}_i + \beta_2 \text{Herd}_i$$

$$\text{Var}(Y_i | P_i) = P_i (1 - P_i)$$

where Y_i is a Bernoulli variable indicating whether the i^{th} cow, experienced a loss of $\text{BCS} \geq 0.75$, and this event is observed with probability P_i ; this probability is function of the intercept (β_0), the regression coefficient for treatment group (β_1) and of the herd effect (β_2). Due to the low number of cows experiencing $\Delta\text{BCS} \geq 0.75$ point, effect

modification of treatment- Δ BCS relationship by other variables was not investigated to avoid complete data separation. Linearity assumptions were met because only categorical variables were used.

Results

Descriptive statistics

Flow of Animals. Of the thirteen herds enrolled, nine used free-stalls housing and four used tie-stalls. Number of lactating cows per herd ranged from 35 to 250. One farm used milking robots, five used rotary parlours, three used parallel parlours, and all tie-stalls herds used mobile milking units. Eleven farms fed a total mixed ration, one a partially mixed ration, and one components feeding ration. Only one herd milked fresh cows three times per day. All other herds, including the herd using a milking robot, milked fresh cows twice a day. From December 2013 through March 2015, 838 mature cows were enrolled in these herds for a total of 846 lactations (eight cows calved twice and started two different lactations during the RCT). Twenty-four lactations were not enrolled because cows calved before the randomization (n=10) or because producers applied the wrong milking protocol (n=14). Four cows allocated to INC group had less than five days on INC; these were still considered as having completed INC (i.e. intention to treat analysis) since those types of deviations are likely to occur in routine practice and should be included to correctly estimate effect of treatments (Hollis et Campbell, 1999).

Daily milk weight for the first 14 DIM for INC and CON cows are presented in Figure 3. On the first DIM, limiting milk output in INC cows to a maximum of 10kg/d had

little impact on their actual production since most cows in the CON group also produced less than 10kg/d. However, between DIM 2 and 5, cows in the CON group produced between 2.0 and 2.5 times more milk/d than the maximum output allowed in the INC group. On DIM 6, when the incomplete milking protocol was ended, cows from the INC group increased their daily milk production to a level close to that of CON cows (mean milk production of 31.0 kg/d in INC cows on DIM 6 compared to 33.1 kg/d in CON cows). On DIM 14, difference in production between groups were relatively small (mean milk production of 38.7 kg/d in INC cows on DIM 14 compared to 39.8 kg/d in CON cows). Difference in daily milk yield between groups at DIM 14 were not statistically significant (P -value=0.43; using a mixed linear regression model with a herd intercept).

Measure of Effect Modifiers. Minimum, median and maximum values for BCS pre-calving were respectively 2.25, 3.5 and 4.5. Following categorisation of effect modifiers as described in the materials and methods section, number of lactations with pre-calving BCS ≥ 3.75 points was 234 (CON: 110 and INC: 124), 538 (CON: 274 and INC: 264) had pre-calving BCS < 3.75 points and we had 41 lactations (CON: 28 and INC: 13) with missing values because the BCS measurement was not collected by the research team. Minimum, median and maximum values for parity were respectively 2, 3 and 11. There were 343 (CON: 175 and INC: 168) cows of second lactation and 470 (CON: 237 and INC:233) ≥ 3 lactations. Minimum, median and maximum number of days for dry-period were respectively 7, 54 and 212 days. We observed 117 (CON: 55 and INC: 62) short dry periods, 286 (CON: 157 and INC: 129) normal dry periods, 110 (CON: 58 and INC: 52) long dry periods and 300 (CON: 142 and INC: 158) missing values because the exact dry-off date was missing from herds records. Minimum,

median and maximum values for BCAM were respectively 118, 239 and 381. We observed 289 (CON: 145 and INC: 144) lactations with low to normal BCAM, 203 (CON: 97 and INC: 106) with high BCAM and 321 (CON: 170 and INC: 151) missing values because data were missing from the DHI records. Minimum, median and maximum values for BCAF were respectively 115, 249 and 393. We observed 239 (CON: 121 and INC: 118) lactations with low to normal BCAF, 244 (CON: 119 and INC: 125) with high BCAF and 330 (CON: 172 and INC: 158) missing values because data were missing from the DHI records. Minimum, median and maximum values for BCAP were respectively 116, 240 and 363. We observed 277 (CON: 138 and INC: 139) lactations with low to normal BCAP, 206 (CON: 102 and INC: 104) with high BCAP and 330 (CON: 172 and INC: 158) missing values because data were missing from the DHI records. There were 359 cow lactations who received CRC prior calving (CON: 191 and INC: 168). In 10 out of 13 herds, CRC were administered systematically to multiparous cows. Among herds enrolled, 2/13 gave no monensin supplementation, and 5/13 fed monensin as premix. Regarding health events, only three cows all in INC had dystocia for an incidence of 0.4%; 17 cows suffered from clinical hypocalcaemia after calving for a cumulative incidence of 2% (10 in CON and 7 in INC) and 29 experienced retained foetal membranes for a cumulative incidence of 4% (12 in CON and 17 in INC).

Statistical Analyses

Ketonemia. Ketonemia measurements were missing for nine lactations because of errors from the research team (n=6 lactations), or because cows were culled before first sample (n=3 lactations). Finally, a total of 412 lactations were analysed for CON, while 401 lactations were included in INC for blood BHB and HYK modelling. During

the 8-17 DIM period, 333 cows had two blood BHB observations available for analysis while only one observation was available for 462 cows during that period.

Blood BHB distributions categorised by milking protocol and DIM periods, are illustrated in Figure 4. Distributions of ketonemia values were right skewed for all DIM periods. Distributions were approximately normal after natural logarithm transformation. Estimates of linear mixed models evaluating effect of treatments on natural logarithm of BHB are presented in Table III, while BHB geometric means estimates and BHB ratio between groups showing this association on the multiplicative scale are presented in Table IV. No difference was observed between groups during the 1-3 DIM period ($P=0.15$). A difference between treatments was observed in the 4-7 DIM period ($P<0.01$). When back-transformed, the BHB geometric mean concentrations predicted by the model for this period were 0.66 mmol/L (95% CI: 0.60, 0.73) for cows in the INC group and 0.79 mmol/L (95% CI: 0.72, 0.87) for cows in the CON group. In other words, cows in the INC group had BHB values 0.83 (95% CI: 0.77, 0.90) times those of cows in the CON group. A tendency for a lower natural logarithm of BHB in INC cows was observed for the 8-17 DIM period. When back-transformed, BHB geometric mean concentrations predicted by the model for this period were 0.90 (95% CI: 0.80, 1.01) mmol/L for cows in the INC group and 0.94 mmol/L (95% CI: 0.84, 1.06) for cows in the CON group. No significant differences could be observed during the 18-26 DIM period.

None of the variables hypothesised to modify the effect of the treatment on blood BHB concentrations demonstrated a significant interaction with milking protocols. When evaluating whether the effect of the treatment on the natural logarithm of blood BHB

varied from one herd to another using the model without and with a random treatment slope, little differences were observed between models assuming a similar treatment effect for all herds and models assuming treatment effects varying by herds. In one herd (herd 6), a stronger preventive effect of treatment on blood BHB natural logarithm was observed during the 4-7 and 8-17 DIM periods. This herd was the only one milking cows three times per day.

Hyperketonemia. Among cows testing positive at least once for HYK between 1 and 26 DIM, 145 were in CON group and 124 in INC group. Prevalence of HYK for CON and INC groups are presented in Figure 5. Estimates of models evaluating the effect of milking protocols on odds of HYK are presented in Table V. Significant differences between treatment groups were observed during the 4-7 DIM ($P=0.02$) and 8-17 DIM ($P=0.03$) periods. Odds of HYK for cows in the INC group were 0.40 (95% CI: 0.18, 0.87) and 0.65 (95% CI: 0.43, 0.96) times those of cows in the CON group, during the 4-7 and 8-17 DIM period, respectively. Predicted probabilities of HYK for each milking protocol are presented in Table VI. During the 4-7 DIM period, predicted prevalence of 4.6 and 10.7% were observed for the INC and CON groups ($P=0.02$). These prevalences were respectively 13.4 and 19.4% during the 8-17 DIM period ($P=0.03$).

For the 8-17 DIM period, an interaction between parity and treatment was observed ($P=0.04$). This interaction term is presented in Table VII. During that period, the ratio of ORs across parity strata was 2.4 (95% CI 1.5–3.7), meaning that the estimated effect of the milking protocol was 2.4 times larger in 2nd parity cows (OR: 2.7) than in cows of $\geq 3^{\text{rd}}$ parity (OR: 1.2). The RERI was estimated at 0.16 (95% CI: -0.92, 0.97), meaning that the estimated treatment effect on the additive scale in 2nd parity

cows was slightly larger than that of ≥ 3 rd parity cows; thus, indicating a positive, but non-significant, effect modification when assessed on the additive scale. For this specific DIM period, the predicted prevalence of HYK for a 2nd parity cow in the CON group was 16% (95% CI: 0.11, 0.24) compared to 7% (95% CI: 0.04, 0.11) for INC cows. Predicted prevalence of HYK for cows ≥ 3 parity were 31% (95% CI: 0.23, 0.40) in CON compared to 27% (95% CI: 0.20, 0.36) in INC cows.

Body Condition Loss in the Post-Partum Period. For Δ BCS, observations were missing at random for 104 lactations because one of the BCS values used to calculate this parameter was not collected (n=101 lactations), or because cows were culled before the last BCS measurement (n=3 lactations). A total of 351 lactations in CON group and 358 lactations in INC group were, therefore, available for analysis of Δ BCS in early lactation. Time between BCS assessments ranged from 35 to 78 days. Number of lactations with a Δ BCS ≥ 0.75 point was 120 (67 lactations in CON group and 53 in INC group), and 589 had a Δ BCS < 0.75 point (284 in CON group and 305 in INC group). Effect of treatment on odds of having a Δ BCS ≥ 0.75 point was not significant ($P=0.12$), odds of Δ BCS ≥ 0.75 point were 0.73 (95% CI: 0.49, 1.1) times lower for cows following INC, compared to those following CON (Table VIII).

Discussion

The objectives of this study were to evaluate, in Holstein dairy herds, the impact of an incomplete milking protocol in early lactation on markers of NEB: ketonemia, HYK, and loss of BCS ≥ 0.75 point. Previous studies, investigating energy output modulation in early lactation by reducing milking frequency and/or the amount of milk harvested,

were all conducted on small numbers of cows in research herds (Loiselle et al., 2009, Carbonneau et al., 2012). A larger research was needed to evaluate the relevance of this strategy in a practical situation to investigate subsequent effects on fertility, control of infectious diseases, culling, udder pain and lying time. Based on the results of Carbonneau et al. (2012), our initial hypothesis was that the three markers of NEB would be improved by the milking strategy used.

For the current study, a RCT design was chosen. This study design is one of the most valid design for demonstrating a causal effect (Dohoo et al., 2009a). However, some potential biases should still be considered. Firstly, farms selected were a convenience sample. Our research protocol required an important investment of time by participating producers and an important change in mentality, which may have led to recruitment of highly innovative and thorough producers. The relatively low prevalence of HYK observed in participating herds, despite the high production level, possibly reflects a better control of the transition period. Nevertheless, a variety of management systems and herd sizes were represented, thus making results generalizable to various production systems. Furthermore, it could be hypothesized that the impact of INC would simply be greater in herds where NEB is less well controlled.

Another potential source of bias is that neither research team nor milking employees could be blinded to cow's allocation. Measurement of BHB, however, is a very objective measure and knowing group allocation could hardly interfere with the assessment. On the other hand, BCS assessment is more subjective and knowing treatment allocation could have influenced its measure. Finally, because milking

employees were aware of treatment allocation, it is possible that better care was provided to cows in the INC group than to cows in the CON group (or the opposite). In the future, a trial conducted using herds with robotic milking solely could be designed to avoid such bias.

In our study, since many producers harvested milk from cows in the INC group using a transparent milking jar to evaluate the amount of milk extracted in real time, the exact amount of milk collected was not automatically recorded by milking system softwares. Furthermore, many of the computerized milking systems used by participating herds did not record harvested milk when the milking unit was manually stopped before the end of the milking. For this reason, it was impossible to objectively evaluate the compliance of participants when applying the INC protocol. From our discussions with producers involved, and using answers provided by a qualitative end-of-study questionnaire (unpublished results), it appears that many cows in the INC group had higher amount of milk harvested than the established study protocol, especially during the last two days of INC, or were sometimes completely milked by mistake on a given milking. These mistakes, however, are likely to occur if INC is implanted in the future, hence supporting use of intention to treat analysis.

Periods of interest were evaluated that way due to milk production physiology, little difference on ketonemia was expected between treatment groups for the 1-3 DIM period. Larger differences in milk production, and consequently on NEB, were expected on day 4 and 5. Most of the treatment effect on the NEB was, therefore, expected to occur during the 4-7 DIM. A short-term and, possibly, a long-term residual effect of treatment was expected during the 8-17 DIM and 18-26 DIM periods, respectively.

The ketonemia reduction in cows exposed to INC was of small magnitude in the 4-7 DIM period. Carbonneau et al. (2012) found a reduction of blood BHB concentrations until 21 DIM for partially milked cows. The milking protocol tested in our study was slightly different than the incomplete milking protocol investigated by Carbonneau et al. (2012). This difference could explain the shorter effect of INC between studies. When evaluating the effect of INC on the natural logarithm of blood BHB with a random slope at herd level, regression lines from almost all herds were parallel, supposing similar treatment effects. In one herd, the only one milking fresh cows three times per day, a more important effect of the INC could be observed. Increasing milking frequency in early lactation increases milk production (Bar-Peled et al., 1995, Hale et al., 2003, Wall et al., 2006) and has been reported to accentuate NEB (Andersen et al., 2004). We could hypothesise that cows milked three times per day could possibly benefit more from the INC than cows milked twice a day. This hypothesis will have to be validated in future studies. None of the other putative effect modifiers hypothesised to modify the effect of the treatment on the natural logarithm of blood BHB concentrations demonstrated significant interaction with milking protocols. Because sample size of the RCT was computed to demonstrate differences between treatments on odds of HYK, the power of the study was not sufficient to further expose difference of treatment effect across levels of effect modifier. Furthermore, for some effect modifiers (e.g. dystocia), very few events were recorded and results regarding absence of effect modification should be interpreted cautiously. In future, if this milking strategy is implemented by dairy producers, larger observational studies could be

conducted to identify types of cows (or herds) that could benefit from this management strategy.

The incomplete milking protocol was effective for reducing the HYK prevalence. Consequences of HYK are numerous. A blood BHB concentration ≥ 1.4 mmol/L was associated with a daily milk yield reduction of 6.9% during the first month of lactation (Chapinal et al., 2012, McArt et al., 2012a). Ospina et al. (2010), McArt et al. (2012a) reported that HYK cows had 6.9 times greater odds of experiencing a displaced abomasum. Duffield et al. (2009) reported 3.4 times higher odds of metritis in HYK cows than in normoketonemic cows. Finally, cows with HYK were 4.5 times more likely to be removed from the herd during the first 30 days in milk (McArt et al., 2012a). Additional analyses will, however, be needed to determine whether the INC will lead to additional positive effects on these subsequent health events. Nevertheless, the observed reduction in HYK prevalence is encouraging, especially because HYK could be controlled during the first 17 days in milk, a period of critical importance. Indeed, McArt et al. (2012a) observed that cows first testing positive to HYK between 3 to 7 DIM were 4.5 (95% CI 1.7, 11.7) times more likely to be removed from the herd, 6.1 (95% CI 2.3, 16.0) times more likely to develop a displaced abomasum, 0.7 (95% CI 0.6 to 0.8) times as likely to conceive on first service, and produced 2.2 kg less milk per day for the first 30 DIM than cows testing positive at 8 DIM or later.

Regarding effect modification by parity during the 8-17 DIM period, second parity seemed to benefit more from the INC treatment than older cows. We hypothesized that second parity cows are still partitioning energy for growing, and that limiting energy output would, therefore, be even more important for these cows (NRC, 2001). The

higher prevalence of HYK for cows $\geq 3^{\text{rd}}$ parity in this study is in accordance with values obtained by Santschi et al. (2016) and Tatone et al. (2017).

No significant effect of milking protocols on fat mobilisation in the early lactation period was observed despite the lower odds of $\Delta\text{BCS} \geq 0.75$ point in the INC group. Literature is incoherent when trying to link BCS to metabolic disorders (Ruegg et Milton, 1995, Rasmussen, 1999). One possible reason for this is the imprecision associated with ΔBCS , potentially leading to type II error in addition to the information loss when grouping categories (Morin et al., 2017). The cut-off value of $\Delta\text{BCS} \geq 0.75$ point was chosen because it was more likely to reflect a real loss in BCS instead of simple discordances within or between raters. Small differences between two observations in time (e.g. a BCS loss of 0.5 or 0.25) could be simply due to intra or inter-rater discordance. A disadvantage of grouping data is loss of information.

The effects of the INC protocol on subsequent milk yield and composition, incidence of post-partum diseases, reproductive performances, and culling, will have to be analyzed before this procedure can be recommended on dairies. Results on the impact of an incomplete milking on animal behaviours have been published by Krug et al. (2017), and these results suggested that an incomplete milking had very little effect on cows behaviours, and thus, possibly caused little discomfort. If there are no negative impact of the INC protocol on milk production and composition, we could then already imagine the implementation of this protocol in commercial dairies, particularly those using robotic milking systems where it could be automatized. Furthermore, incomplete milking of dairy cows in the early lactation is a very natural approach, that can be applied at very low costs. It also has the potential to be very well received by the general

public and by consumers, who are more and more looking for buying products produced in a more “natural” fashion, while answering dairy producers’ needs for productivity.

Conclusion

The investigated treatment was an effective way to reduce the severity of NEB during early post-partum period. More specifically, it reduced ketonemia during the 4-7 DIM period and odds of HYK during the 4-7 and 8-17 DIM periods.

Acknowledgements

This project was funded by *Novalait Inc*, *Fonds de recherche du Québec – Nature et technologies* (FRQNT) and *Ministère de l’Agriculture, des Pêcheries et de l’Alimentation du Québec* (MAPAQ). Caroline Bergeron, Josée Lemay-Courchesne and Jean-Philippe Pelletier (Université de Montréal, St-Hyacinthe, QC) are also acknowledged for their technical help as well as dairy farmers for their willingness to participate in the study. No conflict of interest was declared for this paper.

References

- Andersen, J. B., N. C. Friggens, T. Larsen, M. Vestergaard, and K. L. Ingvarsten. 2004. Effect of energy density in the diet and milking frequency on plasma metabolites and hormones in early lactation dairy cows. *J Vet Med A*. 51:52-57. Doi 10.1111/J.1439-0442.2004.00605.X.
- Bar-Peled, U., E. Maltz, I. Bruckental, Y. Folman, Y. Kali, H. Gacitua, A. R. Lehrer, C. H. Knight, B. Robinzon, H. Voet, and et al. 1995. Relationship between frequent milking or suckling in early lactation and milk production of high producing dairy cows. *J Dairy Sci*. 78:2726-2736.
- Bauman, D. E. and W. B. Currie. 1980. Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation: a review of mechanisms involving homeostasis and homeorhesis. *J Dairy Sci*. 63:1514-1529.
- Carbonneau, E., A. M. de Passille, J. Rushen, B. G. Talbot, and P. Lacasse. 2012. The effect of incomplete milking or nursing on milk production, blood metabolites, and immune functions of dairy cows. *J Dairy Sci*. 95:6503-6512. 10.3168/jds.2012-5643.
- Chapinal, N., M. Carson, T. F. Duffield, M. Capel, S. Godden, M. Overton, J. E. Santos, and S. J. LeBlanc. 2011. The association of serum metabolites with clinical disease during the transition period. *J Dairy Sci*. 94:4897-4903. 10.3168/jds.2010-4075.
- Chapinal, N., M. E. Carson, S. J. LeBlanc, K. E. Leslie, S. Godden, M. Capel, J. E. Santos, M. W. Overton, and T. F. Duffield. 2012. The association of serum metabolites in the transition period with milk production and early-lactation reproductive performance. *J Dairy Sci*. 95:1301-1309. 10.3168/jds.2011-4724.

- Cook, R. D. and S. Weisberg. 1982. Residuals and influence in regression. New York: Chapman and Hall.
- Djemali, M., A. E. Freeman, and P. J. Berger. 1987. Reporting of dystocia scores and effects of dystocia on production, days open, and days dry from dairy herd improvement data. *J Dairy Sci.* 70:2127-2131. 10.3168/jds.S0022-0302(87)80263-1.
- Dohoo, I. R., S. W. Martin, and H. Stryhn. 2009a. Introduction to observational studies. Pages 139-146 in *Veterinary epidemiologic research*. 2 ed. VER Inc., Charlottetown, P.E.I., Canada.
- Dohoo, I. R., S. W. Martin, and H. Stryhn. 2009b. Linear regression. Pages 323-360 in *Veterinary epidemiologic research*. 2 ed. VER Inc., Charlottetown, P.E.I., Canada.
- Dohoo, I. R., S. W. Martin, and H. Stryhn. 2009c. Mixed models for continuous data. Pages 553-565 in *Veterinary epidemiologic research*. 2 ed. VER Inc., Charlottetown, P.E.I., Canada.
- Dohoo, I. R., S. W. Martin, and H. Stryhn. 2009d. Model-building strategies. Pages 365-390 in *Veterinary epidemiologic research*. 2 ed. VER Inc., Charlottetown, P.E.I., Canada.
- Dubuc, J. and J. Denis-Robichaud. 2017. A dairy herd-level study of postpartum diseases and their association with reproductive performance and culling. *J Dairy Sci.* 100:3068-3078. 10.3168/jds.2016-12144.
- Duffield, T. F., K. D. Lissemore, B. W. McBride, and K. E. Leslie. 2009. Impact of hyperketonemia in early lactation dairy cows on health and production. *J Dairy Sci.* 92:571-580. 10.3168/jds.2008-1507.

- Ferguson, J. D., D. T. Galligan, and N. Thomsen. 1994. Principal descriptors of body condition score in Holstein cows. *J Dairy Sci.* 77:2695-2703. 10.3168/jds.S0022-0302(94)77212-X.
- Fisher, R. A. 1935. The logic of inductive inference. *Journal of Royal Statistical Society.* 98:39-82.
- Geishauser, T., K. Leslie, J. Tenhag, and A. Bashiri. 2000. Evaluation of eight cow-side ketone tests in milk for detection of subclinical ketosis in dairy cows. *J Dairy Sci.* 83:296-299. 10.3168/jds.S0022-0302(00)74877-6.
- Gohary, K., M. W. Overton, M. Von Massow, S. J. LeBlanc, K. D. Lissemore, and T. F. Duffield. 2016. The cost of a case of subclinical ketosis in Canadian dairy herds. *Can Vet J.* 57:728-732.
- Hale, S. A., A. V. Capuco, and R. A. Erdman. 2003. Milk yield and mammary growth effects due to increased milking frequency during early lactation. *J Dairy Sci.* 86:2061-2071. 10.3168/jds.S0022-0302(03)73795-3.
- Herdt, T. H. 2000. Ruminant adaptation to negative energy balance. Influences on the etiology of ketosis and fatty liver. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 16:215-230, v.
- Hollis, S. and F. Campbell. 1999. What is meant by intention to treat analysis? Survey of published randomised controlled trials. *BMJ.* 319:670-674.
- Holtenius, P. and K. Holtenius. 1996. New aspects of ketone bodies in energy metabolism of dairy cows: a review. *J Vet Med A.* 43:579-587.

- Horst, R. L., J. P. Goff, T. A. Reinhardt, and D. R. Buxton. 1997. Strategies for preventing milk fever in dairy cattle. *J Dairy Sci.* 80:1269-1280. 10.3168/jds.S0022-0302(97)76056-9.
- Iwersen, M., U. Falkenberg, R. Voigtsberger, D. Forderung, and W. Heuwieser. 2009. Evaluation of an electronic cowside test to detect subclinical ketosis in dairy cows. *J Dairy Sci.* 92:2618-2624. 10.3168/jds.2008-1795.
- Keown, J. F., R. W. Everett, N. B. Empet, and L. H. Wadell. 1986. Lactation curves. *J Dairy Sci.* 69:769-781.
- Knol, M. J., I. van der Tweel, D. E. Grobbee, M. E. Numans, and M. I. Geerlings. 2007. Estimating interaction on an additive scale between continuous determinants in a logistic regression model. *Int J Epidemiol.* 36:1111-1118. 10.1093/ije/dym157.
- Knol, M. J. and T. J. VanderWeele. 2012. Recommendations for presenting analyses of effect modification and interaction. *Int J Epidemiol.* 41:514-520. 10.1093/ije/dyr218.
- Krug, C., T. J. DeVries, J. P. Roy, J. Dubuc, and S. Dufour. 2017. Incomplete milking in early lactation does not affect dairy cows resting behaviors: results from a randomized controlled trial. *Front Vet Sci.* 4 10.3389/fvets.2017.00066.
- Loiselle, M. C., C. Ster, B. G. Talbot, X. Zhao, G. F. Wagner, Y. R. Boisclair, and P. Lacasse. 2009. Impact of postpartum milking frequency on the immune system and the blood metabolite concentration of dairy cows. *J Dairy Sci.* 92:1900-1912. 10.3168/jds.2008-1399.
- Mason, S. 1997. Breed class average. in DairyNote. agromedia.ca.

- McArt, J. A., D. V. Nydam, and G. R. Oetzel. 2012. Epidemiology of subclinical ketosis in early lactation dairy cattle. *J Dairy Sci.* 95:5056-5066. 10.3168/jds.2012-5443.
- McArt, J. A., D. V. Nydam, and M. W. Overton. 2015. Hyperketonemia in early lactation dairy cattle: a deterministic estimate of component and total cost per case. *J Dairy Sci.* 98:2043-2054. 10.3168/jds.2014-8740.
- Morin, P. A., Y. Chorfi, J. Dubuc, J. P. Roy, D. Santschi, and S. Dufour. 2017. Short communication: An observational study investigating inter-observer agreement for variation over time of body condition score in dairy cows. *J Dairy Sci.* 10.3168/jds.2016-11872.
- NRC. 2001. Nutrient requirements of dairy cattle. Seventh revised edition ed. Nutrient requirements of domestic animals. No. Seventh revised edition. National Academy Press, Washington, D.C.
- O'Connor, A. M., J. M. Sargeant, I. A. Gardner, J. S. Dickson, M. E. Torrence, C. E. Dewey, I. R. Dohoo, R. B. Evans, J. T. Gray, M. Greiner, G. Keefe, S. L. Lefebvre, P. S. Morley, A. Ramirez, W. Sisco, D. R. Smith, K. Snedeker, J. Sofos, M. P. Ward, R. Wills, and C. Steering. 2010. The REFLECT statement: methods and processes of creating reporting guidelines for randomized controlled trials for livestock and food safety. *J Vet Intern Med.* 24:57-64. 10.1111/j.1939-1676.2009.0441.x.
- Ospina, P. A., D. V. Nydam, T. Stokol, and T. R. Overton. 2010. Evaluation of nonesterified fatty acids and beta-hydroxybutyrate in transition dairy cattle in the northeastern United States: Critical thresholds for prediction of clinical diseases. *J Dairy Sci.* 93:546-554. 10.3168/jds.2009-2277.

- Pedron, O., F. Cheli, E. Senatore, D. Baroli, and R. Rizzi. 1993. Effect of body condition score at calving on performance, some blood parameters, and milk fatty acid composition in dairy cows. *J Dairy Sci.* 76:2528-2535. 10.3168/jds.S0022-0302(93)77588-8.
- Raboisson, D., M. Mounie, E. Khenifar, and E. Maigne. 2015. The economic impact of subclinical ketosis at the farm level: Tackling the challenge of over-estimation due to multiple interactions. *Prev Vet Med.* 122:417-425. 10.1016/j.prevetmed.2015.07.010.
- Rasmussen, L. K. N., B.L.; Pryce, J.E. Mottram, T.T. Veerkamp, R.F. 1999. Risk factors associated with the incidence of ketosis in dairy cows. *J Anim Sci* 68:8.
- Ruegg, P. L. and R. L. Milton. 1995. Body condition scores of Holstein cows on Prince Edward Island, Canada: relationships with yield, reproductive performance, and disease. *J Dairy Sci.* 78:552-564. 10.3168/jds.S0022-0302(95)76666-8.
- Santschi, D. E., R. Lacroix, J. Durocher, M. Duplessis, R. K. Moore, and D. M. Lefebvre. 2016. Prevalence of elevated milk beta-hydroxybutyrate concentrations in Holstein cows measured by Fourier-transform infrared analysis in Dairy Herd Improvement milk samples and association with milk yield and components. *J Dairy Sci.* 99:9263-9270. 10.3168/jds.2016-11128.
- Stevenson, J. S. and E. P. Call. 1988. Reproductive disorders in the periparturient dairy cow. *J Dairy Sci.* 71:2572-2583. 10.3168/jds.S0022-0302(88)79846-X.
- Suthar, V. S., J. Canelas-Raposo, A. Deniz, and W. Heuwieser. 2013. Prevalence of subclinical ketosis and relationships with postpartum diseases in European dairy cows. *J Dairy Sci.* 96:2925-2938. 10.3168/jds.2012-6035.

- Tamminga, S., P. A. Luteijn, and R. G. M. Meijer. 1997. Changes in composition and energy content of liveweight loss in dairy cows with time after parturition. *Livest Prod Sci.* 52:31-38. Doi 10.1016/S0301-6226(97)00115-2.
- Tatone, E. H., T. F. Duffield, S. J. LeBlanc, T. J. DeVries, and J. L. Gordon. 2017. Investigating the within-herd prevalence and risk factors for ketosis in dairy cattle in Ontario as diagnosed by the test-day concentration of beta-hydroxybutyrate in milk. *J Dairy Sci.* 100:1308-1318. 10.3168/jds.2016-11453.
- Wall, E. H., H. M. Crawford, S. E. Ellis, G. E. Dahl, and T. B. McFadden. 2006. Mammary response to exogenous prolactin or frequent milking during early lactation in dairy cows. *J Dairy Sci.* 89:4640-4648. 10.3168/jds.S0022-0302(06)72514-0.
- Wildman, E. E., G. M. Jones, P. E. Wagner, R. L. Boman, T. H. F., and L. T. N. 1982. A dairy cow body condition scoring system and its relationship to selected production characteristics. *J Dairy Sci.* 65:495-497.

Table III. Unconditional estimates of association between milking protocol and the natural logarithm of blood BHB. Estimates were obtained using four linear mixed models using data from 813 multiparous Holstein cow's lactations from 13 herds participating in a randomized controlled trial evaluating the effect of an incomplete milking protocol during the first five days in milk compared to a conventional milking protocol.

Models and parameters	Estimates	SE ^a	95%CI ^b	P-Value
1) Model 1-3 DIM (n ^c =167)				
Intercept	-0.424	0.050		<0.01
Treatment groups				
Conventional milking (CON)	Reference			
Incomplete milking (INC)	0.100	0.069	-0.037, 0.237	0.15
Variance				
Herd	0.001			
Observation	0.199			
2) Model 4-7 DIM (n ^c =430)				
Intercept	-0.232	0.048		<0.01
Treatment groups				
Conventional milking (CON)	Reference			
Incomplete milking (INC)	-0.185	0.042	-0.268, -0.102	<0.01
Variance				
Herd	0.016			
Observation	0.189			
3) Model 8-17 DIM (n ^c =1,106)				
Intercept	-0.052	0.062		0.41
Treatment groups				

Conventional milking (CON)	Reference			
Incomplete milking (INC)	-0.065	0.040	-0.143, 0.013	0.10
Variance				
Herd	0.036			
Cow	0.176			
Observation	0.174			

4) Model 18-27 DIM (n^c=610)

Intercept	-0.081	0.061		0.19
Treatment groups				
Conventional milking (CON)	Reference			
Incomplete milking (INC)	0.010	0.050	-0.087, 0.108	0.83
Variance				
Herd	0.029			
Observation	0.370			

^a Standard error

^b Confidence interval

^c Number of observations used

Table IV. β -hydroxybutyrate (BHB) geometric mean blood concentrations (in mmol/L) and BHB concentrations ratio between incompletely and conventionally milked cows. Values were computed using least square mean estimates obtained from linear mixed models using data from 813 multiparous Holstein cow's lactations from 13 herds participating in a randomized controlled trial evaluating the effect of an incomplete milking protocol (INC) during the first five days in milk compared to a conventional milking protocol (CON).

Days in milk categories	Geometric mean (in mmol/L)				BHB ratio ^a	
	CON	95% CI ^b	INC	95% CI ^b	Least square mean	95% CI ^b
1-3	0.65	0.59, 0.72	0.72	0.66, 0.80	1.1	0.97, 1.3
4-7	0.79	0.72, 0.87	0.66	0.60, 0.73	0.83	0.77, 0.90*
8-17	0.94	0.84, 1.06	0.90	0.80, 1.01	0.94	0.87, 1.0
18-27	0.92	0.82, 1.04	0.93	0.83, 1.06	1.0	0.92, 1.1

^a BHB blood concentrations ratio between intervention and conventional groups (incompletely milked cows:conventionally milk cows)

^b Confidence intervals

* Indicate statistically significant difference (i.e. *P*-value < 0.05)

Table V. Unconditional estimates of association between milking protocol and odds of hyperketonemia (defined as blood β -hydroxybutyrate ≥ 1.4 mmol/L). Estimates were obtained using generalized linear mixed models, using a logit link and data from 813 multiparous Holstein cow's lactations from 13 herds participating in a randomized controlled trial evaluating the effect of an incomplete milking protocol during the first five days in milk compared to a conventional milking protocol.

Models and parameters	Estimates		Odds ratio ^a		P-value
	Mean	SE ^b	Mean	95%CI ^c	
1) Model 1-3 DIM (n ^d =167)					
Intercept	-2.747	0.461			<0.01
Treatment groups					
Conventional milking (CON)	Reference				
Incomplete milking (INC)	0.182	0.262	1.20	0.35, 4.10	0.77
Variance					
Herd	NE ^e				
2) Model 4-7 DIM (n ^d =430)					
Intercept	-2.124	0.353			<0.01
Treatment groups					
Conventional milking (CON)	Reference				
Incomplete milking (INC)	-0.918	0.398	0.40	0.18, 0.87	0.02
Variance					
Herd	0.762	0.570			
3) Model 8-17 DIM (n ^d =1,106)					
Intercept	-1.424	0.241			<0.01
Treatment groups					
Conventional milking (CON)	Reference				

Incomplete milking (INC)	-0.438	0.202	0.65	0.43, 0.96	0.03
Variance					
Herd	0.300	0.186			
Cow	1.473	0.607			

4) Model 18-27 DIM (n^d=610)

Intercept	-1.306				<0.01
Treatment groups					
Conventional milking (CON)	Reference				
Incomplete milking (INC)	0.095	0.197	1.10	1.75, 1.60	0.63
Variance					
Herd	0.194	0.101			

^a Odds ratio comparing odds of hyperketonemia in cows milked incompletely compared to cows milked conventionally.

^b Standard error

^c Confidence intervals

^d Number of observations

^e Not estimated

Table VI. Predicted probability of hyperketonemia in incompletely and conventionally milked cows. Probabilities were computed using estimates obtained from generalized linear mixed models, after using the inverse logit function. Estimates were obtained with generalized linear mixed models, using a logit link and data from 813 multiparous Holstein cow's lactations from 13 herds participating in a randomized controlled trial evaluating the effect of an incomplete milking protocol during the first five days in milk compared to a conventional milking protocol.

Days in milk categories	Probability of hyperketonemia in % (95% CI ^a)	
	Conventional milking	Incomplete milking
1-3	2.6 (2.5, 13.8)	2.8 (3.2, 15.1)
4-7	10.7 (5.6, 19.3)	4.6 (2.0, 10.0)*
8-17	19.4 (13.0, 27.9)	13.4 (8.4, 20.9)
18-26	21.3 (16.0, 27.8)	23.0 (17.4, 29.7)

^a Confidence intervals

* Indicate statistically significant difference (i.e. *P*-value < 0.05 on the probabilistic scale)

Table VII. Effect of an incomplete milking protocol on odds of hyperketonemia (defined as blood β -hydroxybutyrate ≥ 1.4 mmol/L) stratified by parity level during the 8-17 DIM period. Values were obtained using a generalized linear mixed model, using a logit link and data from 813 multiparous Holstein cow's lactations from 13 herds participating in a randomized controlled trial evaluating the effect of an incomplete milking protocol during the first five days in milk compared to a conventional milking protocol. During the 8-17 DIM period, 333 cows had two observations available for analysis, while only one observation was available for 462 cows.

	Incomplete milking		Complete milking		OR ^b (95% CI ^c) Effect of milking protocols by parity
	N+/N ^{-a}	OR ^b (95% CI ^c)	N+/N ^{-a}	OR ^b (95% CI ^c)	
Parity 2	13/201	Reference	37/196	2.7 (1.4, 5.3)	2.7 (1.4, 5.3)
Parity ≥ 3	91/248	5.3 (2.9, 9.8)	95/225	6.5 (3.5, 12.1)	1.2 (0.9, 1.7)

Measure of effect modification on the multiplicative scale: OR (95% CI): 2.4 (1.5, 3.7)

Measure of effect modification on the additive scale: Relative excess risk due to interaction (95% CI): 0.16 (-0.92, 0.97)

Odds ratio are adjusted for herd effect

^a Number of observations positive (N+) and negative (N-) for hyperketonemia

^b Odds ratio

^c 95% Confidence interval

Table VIII. Unconditional estimates of association between milking protocol and odds of losing ≥ 0.75 point of body condition during the first seven weeks of lactation. Estimates were obtained using a logistic model. Data from 709 multiparous Holstein cow's lactations from 13 herds participating to a randomized controlled trial evaluating the effect of an incomplete milking protocol during the first five days in milk compared to a conventional milking protocol.

Models and parameters	Estimates		Odds ratio ^a		<i>P</i> -value
	Mean	SE	Mean	95% CI ^b	
Intercept	-1.562	0.12			< 0.01
Treatment groups		9			0.12
Conventional milking (CON)	Reference				
Incomplete milking (INC)	-0.157	0.10	0.73	0.49, 1.1	
Herds		2			< 0.79
1	-0.079	0.25	0.44	0.11, 1.8	
2	-0.493	0.39	0.29	0.06, 1.4	
3	-0.137	0.37	0.42	0.09, 2.0	
4	-0.232	0.30	0.39	0.09, 1.7	
5	0.163	0.32	0.56	0.13, 2.5	
6	-0.793	0.69	0.22	0.03, 1.6	
		3			

7	0.440	0.31	0.74	0.17, 3.3
		3		
8	0.259	0.53	0.62	0.11, 3.6
		5		
9	0.040	0.31	0.50	0.11, 2.2
		0		
10	-0.238	0.51	0.38	0.67, 2.1
		4		
11	-0.077	0.29	0.44	0.10, 1.9
		8		
12	0.405	0.54	0.71	0.12, 4.2
		3		
13	Reference			

^a Odds ratio comparing odds of hyperketonemia in cows milked incompletely compared to cows milked conventionally

^b Confidence intervals

Figure captions

Figure 3. Box-plot of milk weight/day as function of milking protocols and days in milk. Data obtained from 813 multiparous Holstein cow's lactations from 13 herds participating in a randomized controlled trial evaluating the effect of an incomplete milking protocol (INC) during the first five days in milk compared to a conventional milking protocol (CON).

Figure 4. Box-plot of blood β -hydroxybutyrate concentrations as function of milking protocols and days in milk periods. Data obtained from 813 multiparous Holstein cow's lactations from 13 herds participating in a randomized controlled trial evaluating the effect of an incomplete milking protocol (INC) during the first five days in milk compared to a conventional milking protocol (CON).

Figure 5. Histogram of prevalence of hyperketonemia (blood β -hydroxybutyrate concentration > 1.4 mmol/L) as function of milking protocol used. Models estimated using data from 813 multiparous Holstein cow's lactations from 13 herds participating in a randomized controlled trial evaluating the effect of an incomplete milking protocol (INC) during the first five days in milk compared to a conventional milking protocol (CON).

Figure 3.

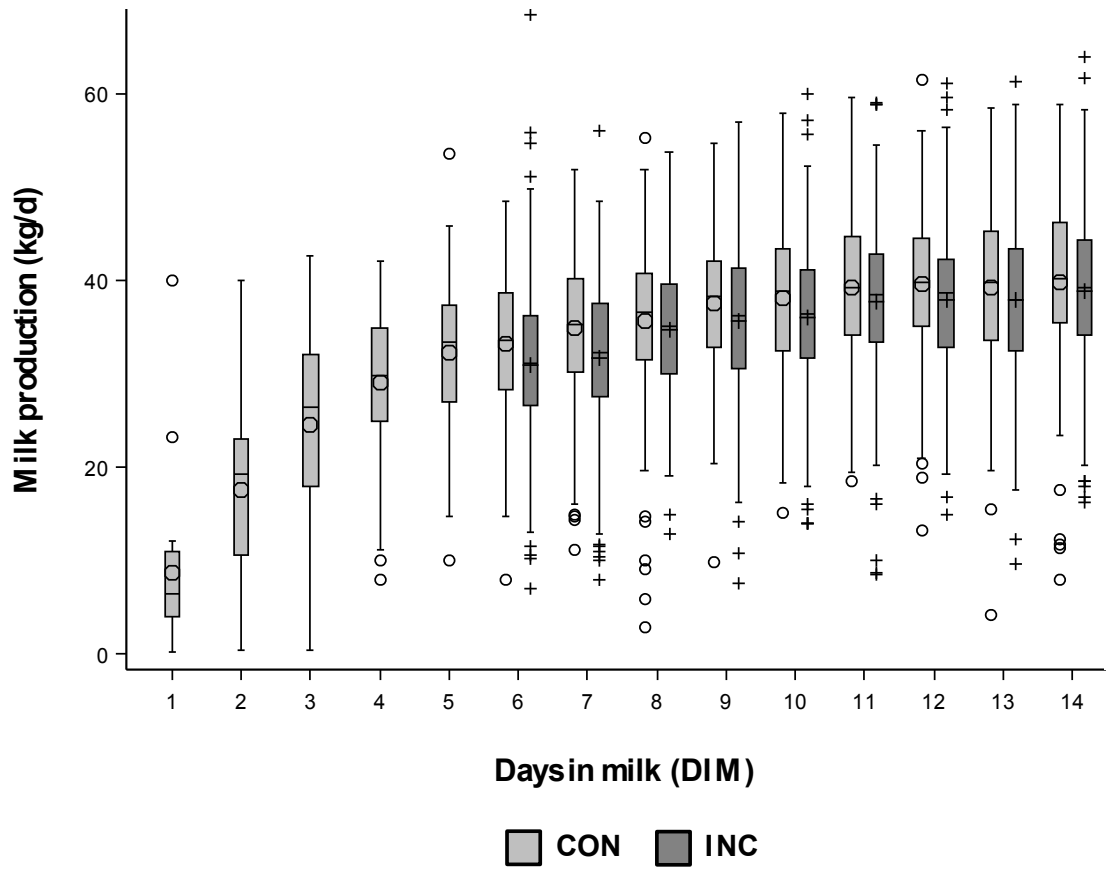


Figure 4.

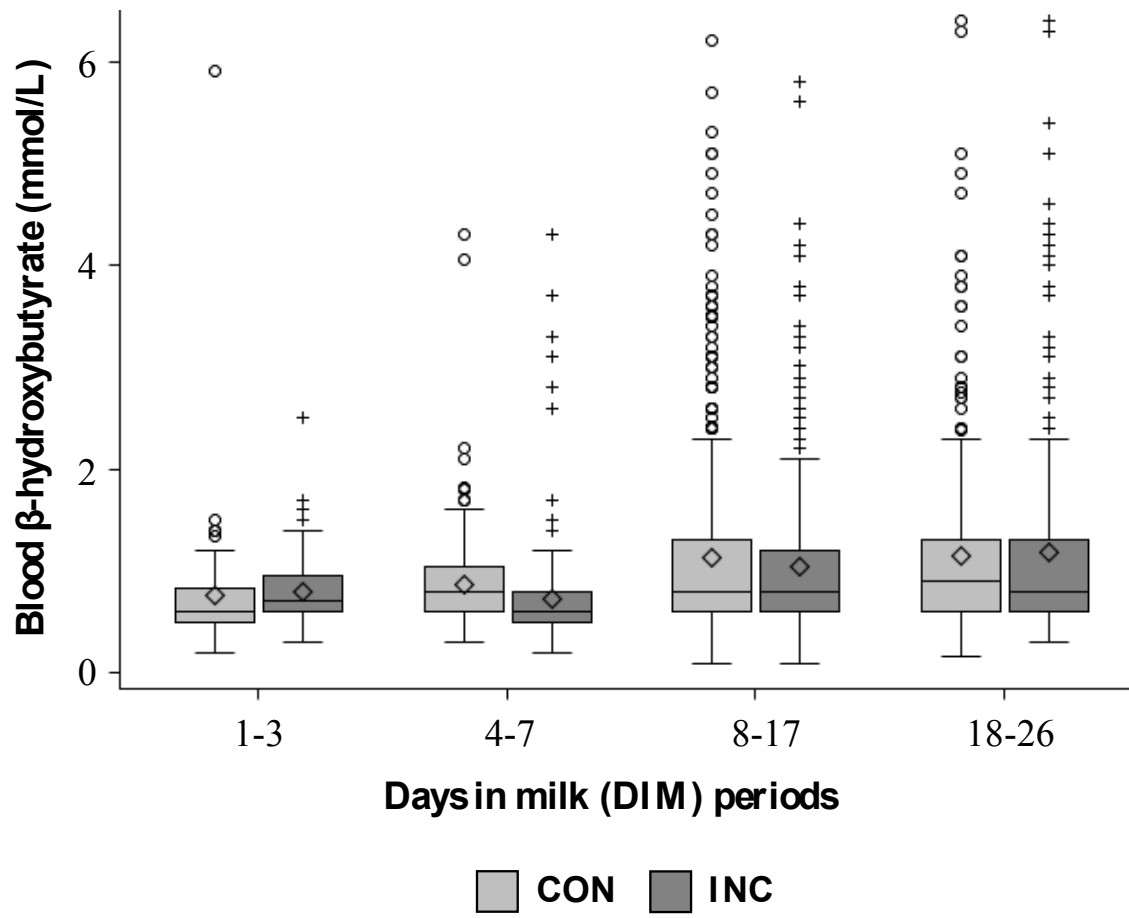
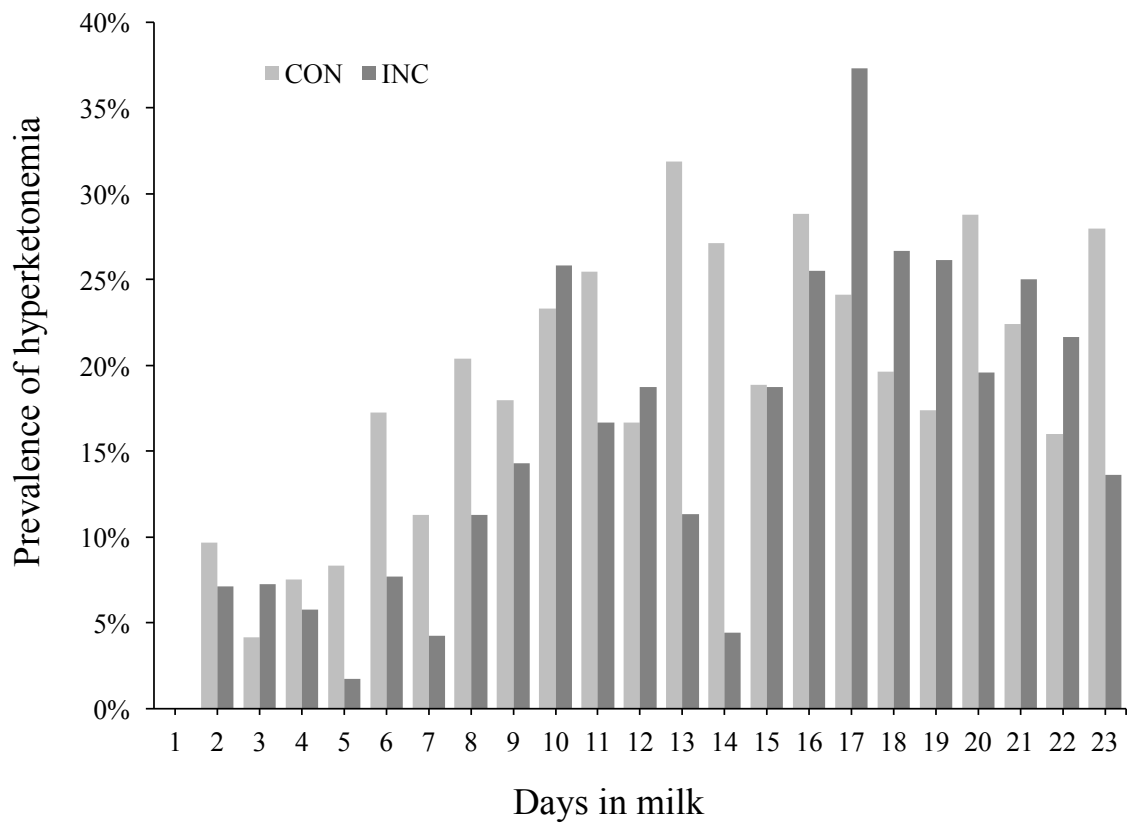


Figure 5.



Chapitre 5. Discussion générale

Un protocole de traite incomplète en début de lactation a précédemment été évalué dans une étude sur un petit nombre d'animaux dans un contexte de ferme de recherche (Carbonneau et al., 2012). Bien que les résultats obtenus sur certains marqueurs de l'équilibre énergétique étaient favorables à une telle stratégie, la réalité de l'industrie laitière est différente de celle d'un milieu de recherche. Avant qu'une stratégie de gestion similaire à celle proposée par Carbonneau et al. (2012) soit implantée, il était impératif qu'elle soit préalablement soumise aux conditions rencontrées sur le terrain. De plus, vu la petite taille de l'échantillon, certains aspects n'ont pu être évalués dans leur étude. Par exemple, il serait intéressant d'évaluer l'impact de l'INC sur : la production laitière et ses composantes pour l'ensemble de la lactation, l'incidence des maladies post-partum associées à l'HYK, les performances subséquentes en reproduction, la réforme précoce et le bien-être animal. Bien qu'ils ne soient pas traités dans ce mémoire, ces aspects seront abordés ailleurs avec les données amassées pendant ce projet. Le sujet de ce mémoire, était de quantifier les effets de l'INC sur la cétonémie, la prévalence d'HYK et la variation de l'IEC en début de lactation.

Retour sur les résultats

Une étude fut menée parallèlement à la principale afin d'évaluer l'accord inter-observateur pour la Δ IEC. À notre connaissance, ce sujet n'avait jamais été abordé dans la littérature. Notre objectif, en utilisant cet indice dans l'étude principale, était de

l'utiliser comme indicateur visuel de l'état des réserves énergétiques. Puisque nous désirions utiliser la Δ IEC pour évaluer si l'utilisation des réserves énergétiques en début de lactation des vaches soumises à l'INC était inférieure à celle des vaches sur CON, il était nécessaire de valider cette mesure pour interpréter correctement les résultats obtenus dans l'étude présentée au deuxième chapitre.

Notre objectif était donc de comparer l'accord inter-observateur obtenu pour une seule mesure de l'IEC à celui obtenu pour la Δ IEC lorsque de nombreux observateurs effectuent des mesures de l'IEC chez les vaches laitières. Nos hypothèses étaient que 1) si l'écart entre deux observateurs était systématique (ex.: un observateur ajoutant toujours un quart de point aux mesures d'un autre observateur), l'accord inter-observateur de la Δ IEC serait supérieur à l'accord inter-observateur obtenu pour une seule mesure de l'IEC, 2) si l'écart entre deux observateurs était aléatoire, l'accord inter-observateur de la Δ IEC serait alors inférieur à l'accord inter-observateur obtenu pour une seule mesure de l'IEC. Un écart aléatoire de mesure entre les évaluateurs semblait être présente dans cette étude puisque les valeurs pour l'accord inter-observateur d'une mesure unique de l'IEC étaient supérieures à celles obtenues pour la Δ IEC. Puisque les mesures de l'IEC sont échelonnées en plusieurs catégories, il est peu probable qu'un observateur déplace toutes ses mesures dans un sens ou dans l'autre. De plus, nous supposons que cet écart aléatoire est dû à l'imprécision inévitable entre les mesures d'un même observateur, et ce, même si l'accord intra-observateur est rapporté comme élevé (Ferguson et al., 1994, Kristensen et al., 2006). Au lieu d'un écart systématique, il serait plausible qu'un évaluateur ait tendance à aller dans les extrêmes dans les deux sens. C'est-à-dire qu'il note les animaux maigres, plus

maigres, et les animaux gras, plus gras comparativement à un autre observateur. Cette forme d'écart systématique aurait pu être visuellement détectée sur les graphiques présentés à la Figure 2 par une augmentation de la distance (positive ou négative) entre la pente générée par les données et la pente d'accord parfait. Bien que ce type d'écart n'ait pas été observé dans cette étude, sa détection pourrait faire l'objet d'autres études.

Comme suggéré par Garcia et al. (2015), la première étape d'un processus de validation devrait être l'évaluation de l'accord intra-observateur. Puisque nous nous intéressons uniquement à l'accord inter-observateur, aucune répétition de mesure d'IEC n'a été effectuée par un même individu. Conséquemment, nous étions incapables d'évaluer directement l'accord intra-observateur dans notre étude. Dans leur article, Garcia et al. (2015) donne un exemple où deux observateurs utilisant une échelle catégorique ont un kappa intra-observateur de 0,80 conduisant à un kappa inter-observateur modéré ($0,80 \times 0,80 = 0,64$) (Landis et Koch, 1977b). Ainsi, avec les accords inter-observateurs obtenus dans notre étude (0,76 à 0,89), nous pouvons supposer que les accords intra-observateur étaient presque parfaits (i.e. entre 0.87 et 0.94). De telles valeurs sont plausibles puisqu'elles ont déjà été obtenues par d'autres études évaluant l'accord intra-observateur de l'IEC pour des évaluateurs expérimentés (Ferguson et al., 1994, Kristensen et al., 2006).

Les résultats du premier article suggèrent que des observateurs expérimentés peuvent recueillir des mesures uniques d'IEC avec un accord presque parfait. Lorsque la Δ IEC est la mesure d'intérêt, un accord modéré entre les observateurs est obtenu. Dans un contexte de recherche similaire au nôtre, dans lequel plus d'un observateur

expérimenté évalue les IEC pour un même animal, l'accord inter-observateur serait similaire à celui obtenu lorsque les deux mesures sont effectuées par un même observateur. Tout de même, afin de limiter l'imprécision, nous suggérons que le nombre d'évaluateurs reste petit et que l'accord inter-observateur pour des mesures unique d'IEC soit fort. Lorsqu'il n'est pas possible de valider ces deux paramètres, nous suggérons que les valeurs de Δ IEC soient calculées, dans la mesure du possible, en utilisant les mesures recueillies par un seul observateur.

L'utilisation de la Δ IEC, sans regard aux valeurs à partir desquelles cet indice est calculé, conduit à une perte importante d'information. L'échelle sur laquelle est évaluée l'IEC est qualitative ordinale (Wildman et al., 1982, Ferguson et al., 1994). Pour éviter cette perte d'information, développer une échelle qualitative ordinale prenant en compte la valeur initiale de l'IEC (IEC au vêlage) serait préférable à l'échelle continue présentement utilisée et qui ne prend pas en compte la valeur initiale de l'IEC (Kristensen et al., 2006). Par exemple, sur l'échelle d'interprétation continue présentement utilisée, la Δ IEC d'une vache dont l'IEC au vêlage passe de 3,50 à 3,00 quelques semaines plus tard, sera équivalente à celle d'une vache passant de 4,00 à 3,50. Cependant, puisque les vaches grasses sont plus à risque de souffrir d'HYK, l'impact sur l'équilibre énergétique est probablement moins important pour la vache passant de 3,50 à 3,00 que pour celle passant de 4,00 à 3,50 (Pedron et al., 1993a, Grummer et al., 2004). Nous n'avons pu trouver de publication scientifique mentionnant une échelle d'interprétation de la Δ IEC combinant à la fois la valeur initiale de l'IEC et la Δ IEC. Malgré que l'utilisation de la Δ IEC soit répandue, son interprétation nécessite

une échelle mieux définie. D'ici là, il est préférable d'interpréter les résultats qui en découlent avec précaution.

L'étude présentée au premier chapitre a permis d'interpréter l'accord de la Δ IEC lorsque des mesures sont effectuées par plusieurs observateurs. Avec réserve, il était désormais possible d'utiliser ce marqueur visuel de la balance énergétique dans le contexte de l'étude présentée au deuxième chapitre. Les objectifs de cette deuxième étude effectuée dans des troupeaux laitiers Holstein commerciaux étaient de quantifier les effets d'un protocole de traite incomplète sur la cétonémie, la prévalence d'HYK et la Δ IEC en début de lactation.

Le protocole de traite incomplète à l'essai était efficace pour réduire la cétonémie durant la période 4-7 JEL. Une tendance à une réduction de la cétonémie était également notée pour la période 8-17 JEL. De leur côté, Carbonneau et al. (2012) ont trouvé une réduction significative de la concentration sanguine de BHB jusqu'à 21 JEL. Bien que le protocole testé dans notre étude soit inspiré de celui qu'ils ont utilisé, il était différent quant au volume de lait prélevé à certains JEL. En plus, la qualité d'application du protocole (ferme de recherche vs ferme commerciale) peut expliquer la plus faible persistance de la réduction de la cétonémie dans notre étude.

L'effet du protocole de traite incomplète sur la cétonémie était similaire pour presque toutes les fermes. Le graphique dans lequel des pentes aléatoires des troupeaux sont utilisées pour modéliser la variation du logarithme naturel du BHB sanguin en fonction du protocole de traite utilisé présente des lignes de régression pratiquement parallèles. Un troupeau, le seul de l'étude dans lequel les animaux étaient

traient trois fois par jour, démontrait néanmoins un effet légèrement plus important de l'INC sur la cétonémie. L'augmentation de la fréquence de traite en début de lactation entraîne, en général, une augmentation de la production laitière (Bar-Peled et al., 1995, Hale et al., 2003, Wall et al., 2006). Conséquemment, Andersen et al. (2004) ont démontré qu'une fréquence de traite augmentée était défavorable à l'équilibre énergétique. Il est possible que les troupeaux avec une fréquence de traite supérieure à deux fois par jour pourraient bénéficier davantage de l'INC. Cette hypothèse nécessitera d'autres recherches sur plusieurs troupeaux avec différentes fréquences de traite pour être validée.

En évaluant l'effet du protocole de traite sur l'HYK, nous avons évalué si la réduction de la cétonémie obtenue par notre étude se situait à un seuil lié à des problèmes de santé (McArt et al., 2013). Par exemple, si cette réduction s'était produite à un seuil supérieur à 3,0 mmol / L, l'INC aurait été d'un intérêt plus faible. En définissant hypercétonémique un animal dont la concentration en BHB sanguin était supérieure ou égale à 1,4 mmol/L, le protocole de traite incomplète à l'essai était efficace pour réduire l'HYK durant les périodes 4-7 et 8-17 JEL. Réduire l'incidence d'HYK durant la période 3-7 JEL est particulièrement importante puisque les impacts négatifs associées à un premier épisode d'HYK dans cette période sont accrus comparativement à ceux associés à un premier épisode d'HYK se produisant après 8 JEL (McArt et al., 2012a). Les résultats de la dernière étude citée montrent que les vaches souffrant d'HYK entre 3 et 7 JEL sont 4,5 (IC 95% 1,7 ; 11,7) fois plus susceptibles d'être retirées du troupeau, 6,1 (IC 95% 2,3 ; 16,0) fois plus susceptibles de développer un déplacement de l'abomasum, moins susceptibles de concevoir au

premier service (0,70 IC 95% 0,60 ; 0,80), et produisent 2,2 kg de moins de lait par jour pour les 30 premières JEL que les vaches ayant eu un premier test positif à plus 8 JEL.

Dans le but d'évaluer si l'INC permettait d'apprécier visuellement la réduction de la mobilisation énergétique, la Δ IEC a été utilisée comme indicateur visuel de l'état des réserves énergétiques. Dans leur étude, Gillund et al. (2001) avaient trouvé que la perte d'IEC était supérieure chez les vaches atteintes d'HYK comparativement à celles en santé. Bien que significatives, les différences de perte d'IEC rapportées étaient seulement de 0,1 à 0,2 point. Ce qui revient à dire qu'elles n'étaient pas visuellement remarquables puisque la différence entre deux catégories de l'échelle d'interprétation de l'IEC est au minimum 0,25 point. Ceci rappelle l'importance d'une échelle catégorique, et non quantitative, lorsqu'il est question d'évaluer la Δ IEC adéquatement. Il n'est donc pas surprenant qu'il n'ait pas été possible d'apprécier l'effet l'INC sur la perte de l'indice de l'état corporel en début de lactation dans notre étude.

Forces et limites de l'étude

Il aurait été intéressant d'évaluer le degré de mobilisation graisseuse des deux groupes de traite en mesurant les AGL en pré- et en post-partum. En effet, la mesure des BHB permet de mesurer la capacité oxydative des AG par les hépatocytes, alors que la mesure des AGL permet d'évaluer directement le degré de mobilisation graisseuse (Ospina et al., 2010). Puisque des niveaux supérieurs d'AGL en période prépartum et post-partum sont associés à une augmentation des risques de développer certaines conditions, il aurait été non seulement intéressant d'évaluer l'effet de l'INC

sur les AGL en période post-partum, mais aussi d'évaluer si les animaux avec des AGL élevés en période prépartum auraient bénéficié davantage d'un tel protocole.

Le glucose sérique aurait également été d'intérêt. Gordon et al. (2017) ont démontré que les vaches avec une glycémie ≤ 2.2 mmol/L associée à de l'HYK (au seuil de 1.2 mmol/L) bénéficiaient de l'administration d'un médicament contenant un mélange de butaphosphan et de cyanocobalamine ou d'insuline glargine. La modification de l'effet du traitement (INC) avec cette valeur de glycémie sur l'HYK pourrait faire l'objet d'autres études.

Dans le but que les résultats de cette étude soient généralisables à d'autres fermes laitières, un effort a été déployé pour que l'éventail de fermes sélectionnées soit important : salles de traite, robot trayeur ou unités de traite mobiles ; troupeaux de petite et de grande taille ; stabulation libres et entravées. De plus, les analyses ont considéré la réalité de l'industrie : analyse avec intention de traitement, non exclusion des animaux sur INC qui ont été traités davantage, soit par oubli de retirer les machines à traire au bon moment, soit par oubli d'effectuer l'INC pour le bon nombre de jours.

Malgré tout, certains biais sont à considérer. Les fermes choisies forment un échantillon de convenance, ce qui pourrait entraîner un certain biais de sélection. Cette étude demandait un investissement de temps et un important changement de mentalité de la part des producteurs participants. Nous avons donc sélectionné des troupeaux innovateurs dans lesquels se trouvaient une bonne régie et des employés consciencieux. Ces conditions ne sont pas toujours rencontrées dans toutes les fermes commerciales.

Un autre biais potentiel est le biais d'information, puisque les trayeurs qui appliquaient les protocoles de traite et l'équipe de recherche qui effectuait l'échantillonnage étaient au courant de l'allocation de chaque animal. Il est possible, par exemple, que les animaux sur INC aient reçu plus de soins par les producteurs et/ou qu'ils aient été surveillés davantage (pour la présence d'autres conditions qui seront analysées suite à ce mémoire). Dans ce cas, l'effet observé du traitement, et présenté comme effet causal, pourrait être un mélange de l'effet du traitement et de l'effet des meilleurs soins apportés aux animaux du groupe INC. Quant au fait que l'équipe de recherche était au courant des groupes d'allocation lors de l'évaluation des animaux, il faut noter que la mesure de la cétonémie, la mesure d'intérêt de ce mémoire, est une valeur objective. Par conséquent, l'impact de cette connaissance des groupes d'allocation ne devrait pas influencer les résultats. En contrepartie, l'évaluation de l'IEC est moins objective et, savoir si un animal était sur INC ou CON, pourrait avoir influencé la note d'un observateur.

De plus, bien que le protocole de traite incomplète ait été clairement expliqué, il est impossible de s'assurer de l'uniformité du traitement. En déviant le lait dans un récipient pour évaluer la quantité de lait retiré en temps réel, aucun volume n'était enregistré par la machine à traire puisque le lait en était détourné. Les volumes de lait prélevé sur les vaches du groupe INC n'étaient donc pas enregistrés dans les bases de données de production des systèmes de traite.

Perspectives de recherche

Maintenant qu'il est établi que l'INC est efficace pour réduire l'HYK, il serait pertinent d'évaluer son effet sur : 1) la production laitière et ses composantes ; 2) l'incidence des maladies post-partum et la réforme précoce ; 3) les performances en reproduction ; et, finalement, 4) le bien-être animal (temps couché, pression extra-mammaire).

Réduire la quantité de lait prélevée en début de lactation sans modifier la fréquence de la traite n'a pas été associé à une réduction du rendement laitier ou de sa composition, lorsque corrigé pour l'énergie, qu'il contient durant les neuf premières semaines de lactation (Carbonneau et al., 2012). Néanmoins, ceci doit être réévalué sur une lactation entière. Suggérant qu'un degré modéré de mobilisation énergétique au début de la lactation peut être critique pour obtenir des rendements élevés en lait pour les vaches multipares, Ospina et al. (2013) ont constaté que des concentrations plus faibles d'AGL et de BHB dans les première, deuxième et troisième semaines après le vêlage étaient associées à une perte globale de lait dans les quatre premiers contrôles laitiers. Il serait aussi simplement possible que les plus fortes productrices souffrant davantage du BEN, aient des concentrations sériques en AGL et BHB plus élevées, sans être délétères pour la production. Une étude future devrait établir le sens de cette relation avec l'INC.

L'effet de l'INC sur les maladies post-partum et sur la réforme précoce est un autre point d'intérêt puisque l'HYK est associée à des risques plus élevés de développer une rétention placentaire, un déplacement de l'abomasum ou de réforme dans le premier mois de lactation (McArt et al., 2012a, Suthar et al., 2013). La santé mammaire

est un autre point important. En réduisant l'efficacité du système immunitaire par l'effet des corps cétoniques sur les neutrophiles, l'HYK se présente comme un facteur de risque pour différentes maladies infectieuses post-partum telles que la mammite (Hoeben et al., 1999, Suriyasathaporn et al., 2000). Ster et al. (2012) ont démontré que ce sont davantage les AGL, plutôt que les BHB, qui affectent l'efficacité du système immunitaire. Puisque l'INC est efficace pour réduire la cétonémie, il est fort probable qu'il diminue les AGL sériques en amont. Ainsi, l'INC pourrait prévenir les mammites cliniques et réduire l'incidence de mammite subclinique en début de lactation.

En contrepartie, il est possible que du lait coule des trayons lorsque la trayeuse est retirée en milieu de traite. Parce que la littérature associe la fuite de lait à un risque accru de mammite, et parce qu'il était plausible que l'INC l'initie, la santé mammaire devait faire l'objet d'une enquête future afin d'évaluer la pertinence d'un tel traitement (Schukken et al., 1990, Peeler et al., 2000). Bien que non publiées, les données recueillies dans ce projet suggèrent que l'INC n'induit pas de perte de lait après la fin du traitement. En effet, 1/23 vaches sur INC avait un écoulement de lait aux trayons alors que ce phénomène était présent sur 2/23 vaches sur CON ; $P=0,56$).

Toujours au sujet du lien entre la cétonémie et son effet sur le système immunitaire, l'effet de l'INC sur l'incidence de métrite devra être examiné. La littérature est incohérente lorsqu'elle tente d'associer le succès à la première insémination artificielle à l'HYK (Oetzel, 2013). Cependant, beaucoup de publications ne tiennent pas compte du moment du premier épisode d'HYK (McArt et al., 2012). Il sera pertinent d'étudier ce sujet puisque l'INC est efficace pour réduire l'HYK entre 4-7 JEL, période

associée à un risque de conception inférieur à celui d'un premier épisode d'HYK après huit JEL.

Réduire l'incidence HYK est important, mais ceci doit se faire sans compromis sur le bien-être animal. Dans leur expérience Carbonneau et al. (2012) ont évalué le cortisol sérique pendant la période de traitement. Cette hormone est libérée suite à un stimuli stressant. Les valeurs rapportées avaient tendance ($P = 0,08$) à être plus basses pour les vaches sur la traite complète que pour les vaches sur traites partielles. Il est donc possible que l'INC entraîne une augmentation du cortisol. Toujours pour mesurer si l'INC engendrait un stress physique, les catécholamines auraient pu être mesurées (Von, 1964, Hopster et al., 2002). Puisque des échantillons de sérum ont été congelés à chaque prélèvement, il serait intéressant de comparer le cortisol ou les catécholamines des deux groupes durant la première semaine post-partum pour comparer nos résultats à ceux de Carbonneau et al. (2012). Il est possible que la libération de cortisol ou de catécholamines soit liée à de la douleur que pourrait entraîner une forte pression de lait dans le pis. Une situation semblable est rencontrée lors d'un tarissement abrupt. Au tarissement, Bertulat et al. (2013) ont constaté que les vaches à haut rendement (> 20 kg / jour) faisaient face à des pressions extra-mammaires élevées et à une augmentation de la production de glucocorticoïdes par rapport aux vaches à faible rendement (<15 kg / jour). La pression extra-mammaire tolérée par les vaches a été évaluée également dans ce projet. Toujours non publiées, les mesures effectuées avant la traite entre un et sept JEL étaient similaires pour les vaches sur INC et CON ($P=0,23$).

Chapinal et al. (2014) ont évalué le temps couché dans les logettes chez les

vaches primipares et multipares tarées abruptement et évoluant en stabulation libre. Les primipares passaient moins de temps couchées que les vaches multipares suggérant que le bien-être pourrait être compromis lorsqu'elles sont tarées de cette façon. Malgré tout, lorsque soumises à l'INC, un certain volume de lait est retiré de la glande mammaire. Ceci pourrait expliquer que dans le présent projet, l'INC n'a pas réduit le temps passé couché, évalué avec des *Hobo Pendant Acceleration data loggers* (Onset Computer Corporation, 127 Bourne, MA) , comparativement aux vaches sur CON (Krug et al., 2017). Cependant, les vaches en 2^e lactation sur INC avaient tendance à se lever plus souvent que les vaches en 2^e lactation sur CON et le temps qu'elles passaient couchées était inférieur. L'inverse, était observé pour les vaches en $\geq 3^e$ lactation. Ceci suggère que l'INC pourrait être problématique pour les vaches en 2^e lactation alors que les $\geq 3^e$ lactation pourraient en bénéficier (Krug et al., 2017). Bref, bien qu'il serait pertinent de comparer le cortisol des vaches soumises à l'INC vs CON, d'autres indicateurs du bien-être animal sont en faveur de l'INC.

Le métabolisme des primipares étant différent de celui des multipares, puisqu'une partie des nutriments est dirigée vers la croissance de l'animal, ces jeunes animaux ont été exclus de notre étude. Cependant, il serait intéressant de les soumettre à l'INC pour voir son effet sur ce groupe. Santschi et al. (2016) ont noté une prévalence d'HYK inférieure pour les animaux dans leur première lactation (18,7%) comparativement aux vaches dans leur deuxième lactation (19,5%) et \geq à leur troisième lactation (27,6%). Cependant, les primipares avaient la plus haute prévalence (30%) d'HYK durant la première semaine de lactation comparativement aux multipares pour lesquelles les plus hautes prévalences étaient atteintes durant la deuxième semaine de lactation (2^e

veau : 25,8% et $\geq 3^{\text{e}}$ veau : 34,6%). Puisque l'INC est efficace pour réduire l'HYK en première semaine, il est probable que les primipares puissent en bénéficier.

De plus, une analyse coût-bénéfice sera nécessaire pour vérifier la pertinence d'une telle stratégie. Avant d'appliquer cette stratégie dans son troupeau, un gérant de ferme devra considérer la prévalence annuelle d'HYK dans son troupeau, la réduction de la prévalence d'HYK anticipée des vaches soumises à l'INC et le prix qu'il reçoit pour son lait.

Conclusion

Les effets d'un protocole de traite incomplète sur la cétonémie, la prévalence d'hypercétonémie et la variation de l'indice de l'état corporel en période post-partum ont été étudiés dans ce projet. Cette stratégie s'est dévoilée être un moyen efficace pour réduire l'hypercétonémie en début de lactation. Par contre, elle n'a pas permis de diminuer la variation de l'indice de l'état corporel. Pour ce dernier indice, des résultats plus précis auraient été obtenus si un observateur avait effectué toutes les évaluations.

Avant de recommander l'utilisation de ce protocole de traite incomplète dans les laiteries commerciales, d'autres analyses devront être effectuées pour évaluer ses effets sur les performances reproductives, le bien-être, l'incidence de maladies infectieuses (mammite et endométrite) ainsi que le taux de réforme.

Bref, ce protocole de traite incomplète tient compte du besoin des producteurs laitiers de diminuer l'incidence d'HYK dans leur troupeau et a le potentiel d'améliorer d'autres aspects de la production laitière. Selon nous, il sera bien accueilli par le public et les consommateurs qui cherchent à acheter des aliments produits de manière «responsable».

Bibliographie

- Allen, J. C. 1990. Milk synthesis and secretion rates in cows with milk composition changed by oxytocin. *J Dairy Sci.* 73:975-984. 10.3168/jds.S0022-0302(90)78755-3.
- Andersen, J. B., N. C. Friggens, T. Larsen, M. Vestergaard, and K. L. Ingvarsten. 2004. Effect of energy density in the diet and milking frequency on plasma metabolites and hormones in early lactation dairy cows. *J Vet Med A.* 51:52-57. Doi 10.1111/J.1439-0442.2004.00605.X.
- Andrade, C. 2014. Cause versus association in observational studies in psychopharmacology. *J Clin Psychiatry.* 75:e781-784. 10.4088/JCP.14f09362.
- Avramoglu, R. K. and K. Adeli. 2004. Hepatic regulation of apolipoprotein B. *Rev Endocr Metab Disord.* 5:293-301. 10.1023/B:REMD.0000045100.66675.92.
- Baird, G. D. 1982. Primary ketosis in the high-producing dairy cow: clinical and subclinical disorders, treatment, prevention, and outlook. *J Dairy Sci.* 65:1-10.
- Bar-Peled, U., E. Maltz, I. Bruckental, Y. Folman, Y. Kali, H. Gacitua, A. R. Lehrer, C. H. Knight, B. Robinzon, H. Voet, and et al. 1995. Relationship between frequent milking or suckling in early lactation and milk production of high producing dairy cows. *J Dairy Sci.* 78:2726-2736.
- Barnhart, H. X., M. Haber, and J. Song. 2002. Overall concordance correlation coefficient for evaluating agreement among multiple observers. *Biometrics.* 58:1020-1027.

- Bauman, D. E. and W. B. Currie. 1980. Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation: a review of mechanisms involving homeostasis and homeorhesis. *J Dairy Sci.* 63:1514-1529.
- Baumgard, L. H., J. K. Sangster, and D. E. Bauman. 2001. Milk fat synthesis in dairy cows is progressively reduced by increasing supplemental amounts of trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid (CLA). *J Nutr.* 131:1764-1769.
- Bell, A. W. 1979. Lipid metabolism in liver and selected tissues and in the whole body of ruminant animals. *Prog Lipid Res.* 18:117-164.
- Bell, A. W. 1995. Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. *J Anim Sci.* 73:2804-2819.
- Bell, A. W. and D. E. Bauman. 1997. Adaptations of glucose metabolism during pregnancy and lactation. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2:265-278.
- Belury, M. A. 2002. Dietary conjugated linoleic acid in health: physiological effects and mechanisms of action. *Annu Rev Nutr.* 22:505-531. 10.1146/annurev.nutr.22.021302.121842.
- Bergman, E. N. 1990. Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. *Physiol Rev.* 70:567-590.
- Bernal-Santos, G., J. W. Perfield, 2nd, D. M. Barbano, D. E. Bauman, and T. R. Overton. 2003. Production responses of dairy cows to dietary supplementation with conjugated linoleic acid (CLA) during the transition period and early lactation. *J Dairy Sci.* 86:3218-3228. 10.3168/jds.S0022-0302(03)73925-3.
- Berry, D. P., R. F. Veerkamp, and P. Dillon. 2006. Phenotypic profiles for body weight, body condition score, energy intake, and energy balance across different parities

- and concentrate feeding levels. *Livest Prod Sci.* 104:1-12. Doi 10.1016/J.Livsci.2006.02.012.
- Bertics, S. J., R. R. Grummer, C. Cadorniga-Valino, and E. E. Stoddard. 1992. Effect of prepartum dry matter intake on liver triglyceride concentration and early lactation. *J Dairy Sci.* 75:1914-1922. 10.3168/jds.S0022-0302(92)77951-X.
- Bertulat, S., C. Fischer-Tenhagen, V. Suthar, E. Mostl, N. Isaka, and W. Heuwieser. 2013. Measurement of fecal glucocorticoid metabolites and evaluation of udder characteristics to estimate stress after sudden dry-off in dairy cows with different milk yields. *J Dairy Sci.* 96:3774-3787. 10.3168/jds.2012-6425.
- Bobe, G., J. W. Young, and D. C. Beitz. 2004. Invited review: pathology, etiology, prevention, and treatment of fatty liver in dairy cows. *J Dairy Sci.* 87:3105-3124. 10.3168/jds.S0022-0302(04)73446-3.
- Bowker, A. H. 1948. A test for symmetry in contingency tables. *J Am Stat Assoc.* 43:572-574.
- Butaye, P., L. A. Devriese, and F. Haesebrouck. 2003. Antimicrobial growth promoters used in animal feed: effects of less well known antibiotics on gram-positive bacteria. *Clin Microbiol Rev.* 16:175-188.
- Cameron, R. E., P. B. Dyk, T. H. Herdt, J. B. Kaneene, R. Miller, H. F. Bucholtz, J. S. Liesman, M. J. Vandehaar, and R. S. Emery. 1998. Dry cow diet, management, and energy balance as risk factors for displaced abomasum in high producing dairy herds. *J Dairy Sci.* 81:132-139. 10.3168/jds.S0022-0302(98)75560-2.
- Carbonneau, E., A. M. de Passille, J. Rushen, B. G. Talbot, and P. Lacasse. 2012. The effect of incomplete milking or nursing on milk production, blood metabolites, and

- immune functions of dairy cows. *J Dairy Sci.* 95:6503-6512. 10.3168/jds.2012-5643.
- Carrasco, J. L., B. R. Phillips, J. Puig-Martinez, T. S. King, and V. M. Chinchilli. 2013. Estimation of the concordance correlation coefficient for repeated measures using SAS and R. *Comput Methods Programs Biomed.* 109:293-304. 10.1016/j.cmpb.2012.09.002.
- Castaneda-Gutierrez, E., B. C. Benefield, M. J. de Veth, N. R. Santos, R. O. Gilbert, W. R. Butler, and D. E. Bauman. 2007. Evaluation of the mechanism of action of conjugated linoleic acid isomers on reproduction in dairy cows. *J Dairy Sci.* 90:4253-4264. 10.3168/jds.2007-0117.
- Chagas, L. M., M. C. Lucy, P. J. Back, D. Blache, J. M. Lee, P. J. Gore, A. J. Sheahan, and J. R. Roche. 2009. Insulin resistance in divergent strains of Holstein-Friesian dairy cows offered fresh pasture and increasing amounts of concentrate in early lactation. *J Dairy Sci.* 92:216-222. 10.3168/jds.2008-1329.
- Chapinal, N., M. Carson, T. F. Duffield, M. Capel, S. Godden, M. Overton, J. E. Santos, and S. J. LeBlanc. 2011. The association of serum metabolites with clinical disease during the transition period. *J Dairy Sci.* 94:4897-4903. 10.3168/jds.2010-4075.
- Chapinal, N., M. E. Carson, S. J. LeBlanc, K. E. Leslie, S. Godden, M. Capel, J. E. Santos, M. W. Overton, and T. F. Duffield. 2012. The association of serum metabolites in the transition period with milk production and early-lactation reproductive performance. *J Dairy Sci.* 95:1301-1309. 10.3168/jds.2011-4724.

- Chapinal, N., G. Zobel, K. Painter, and K. E. Leslie. 2014. Changes in lying behavior after abrupt cessation of milking and regrouping at dry-off in freestall-housed cows: A case study. *J Vet Behav.* 9:364-369. 10.1016/j.jveb.2014.07.008.
- Chesson, A. and C. W. Forsberg. 1997. Polysaccharide degradation by rumen microorganisms. Pages 329-381 in *The Rumen Microbial Ecosystem*. C. S. H. Stewart, P.N., ed. Blackie academic & professional, and imprint of Chapman & Hall, London.
- Chouinard, P. Y., L. Corneau, W. R. Butler, Y. Chilliard, J. K. Drackley, and D. E. Bauman. 2001. Effect of dietary lipid source on conjugated linoleic acid concentrations in milk fat. *J Dairy Sci.* 84:680-690. 10.3168/jds.S0022-0302(01)74522-5.
- Coffey, M. P., G. Simm, J. D. Oldham, W. G. Hill, and S. Brotherstone. 2004. Genotype and diet effects on energy balance in the first three lactations of dairy cows. *J Dairy Sci.* 87:4318-4326. 10.3168/jds.S0022-0302(04)73577-8.
- Cohen, J. 1983. The cost of dichotomization. *Appl Psychol Meas.* 7:249-253.
- Cook, R. D. and S. Weisberg. 1982. *Residuals and influence in regression*. New York: Chapman and Hall.
- Cummings, D. E. and K. E. Foster. 2003. Ghrelin-leptin tango in body-weight regulation. *Gastroenterology.* 124:1532-1535.
- Dahl, G. E., R. L. Wallace, R. D. Shanks, and D. Lueking. 2004. Hot topic: effects of frequent milking in early lactation on milk yield and udder health. *J Dairy Sci.* 87:882-885. 10.3168/jds.S0022-0302(04)73232-4.

- De Boer, G., A. Trenkle, and J. W. Young. 1986. Secretion and clearance rates of glucagon in dairy cows. *J Dairy Sci.* 69:721-733. 10.3168/jds.S0022-0302(86)80461-1.
- Dechow, C. D., G. W. Rogers, L. Klei, and T. J. Lawlor. 2004. Heritability and correlations for body condition score and dairy form within and across lactation and age. *J Dairy Sci.* 87:717-728. 10.3168/jds.S0022-0302(04)73215-4.
- del Rincon, J. P., K. Iida, B. D. Gaylann, C. E. McCurdy, J. W. Leitner, L. A. Barbour, J. J. Kopchick, J. E. Friedman, B. Draznin, and M. O. Thorne. 2007. Growth hormone regulation of p85alpha expression and phosphoinositide 3-kinase activity in adipose tissue: mechanism for growth hormone-mediated insulin resistance. *Diabetes.* 56:1638-1646. 10.2337/db06-0299.
- Dillon, P., S. Snijders, F. Buckley, B. Harris, P. O'Connor, and J. F. Mee. 2003. A comparison of different dairy cow breeds on a seasonal grass-based system of milk production 2. Reproduction and survival. *Livest Prod Sci.* 83:35-42. Doi 10.1016/S0301-6226(03)00042-3.
- Djemali, M., A. E. Freeman, and P. J. Berger. 1987. Reporting of dystocia scores and effects of dystocia on production, days open, and days dry from dairy herd improvement data. *J Dairy Sci.* 70:2127-2131. 10.3168/jds.S0022-0302(87)80263-1.
- Dohoo, I. R. and S. W. Martin. 1984. Subclinical ketosis: prevalence and associations with production and disease. *Can J Comp Med.* 48:1-5.

- Dohoo, I. R., S. W. Martin, and H. Stryhn. 2009a. Introduction to observational studies. Pages 139-146 in *Veterinary epidemiologic research*. 2 ed. VER Inc., Charlottetown, P.E.I., Canada.
- Dohoo, I. R., S. W. Martin, and H. Stryhn. 2009b. Linear regression. Pages 323-360 in *Veterinary epidemiologic research*. 2 ed. VER Inc., Charlottetown, P.E.I., Canada.
- Dohoo, I. R., S. W. Martin, and H. Stryhn. 2009c. Logistic regression. Pages 395-422 in *Veterinary epidemiologic research*. 2 ed. VER Inc., Charlottetown, P.E.I., Canada.
- Dohoo, I. R., S. W. Martin, and H. Stryhn. 2009d. Mixed models for continuous data. Pages 553-565 in *Veterinary epidemiologic research*. 2 ed. VER Inc., Charlottetown, P.E.I., Canada.
- Dohoo, I. R., S. W. Martin, and H. Stryhn. 2009e. Model-building strategies. Pages 365-390 in *Veterinary epidemiologic research*. 2 ed. VER Inc., Charlottetown, P.E.I., Canada.
- Drackley, J. K., O. T.R., and D. G.N. 2001. Adaptations of glucose and long-chain fatty acid metabolism in liver of dairy cows during the periparturient period. *J Dairy Sci.* 84:E100-E112.
- Dubuc, J. and J. Denis-Robichaud. 2017. A dairy herd-level study of postpartum diseases and their association with reproductive performance and culling. *J Dairy Sci.* 100:3068-3078. 10.3168/jds.2016-12144.
- Dubuc, J., D. DuTremblay, M. Brodeur, T. Duffield, R. Bagg, J. Baril, and L. DesCoteaux. 2009. A randomized herd-level field study of dietary interactions with

- monensin on milk fat percentage in dairy cows. *J Dairy Sci.* 92:777-781. 10.3168/jds.2008-1658.
- Duffield, T. 2000. Subclinical ketosis in lactating dairy cattle. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 16:231-253, v.
- Duffield, T. F., K. D. Lissemore, B. W. McBride, and K. E. Leslie. 2009. Impact of hyperketonemia in early lactation dairy cows on health and production. *J Dairy Sci.* 92:571-580. 10.3168/jds.2008-1507.
- Duffield, T. F., A. R. Rabiee, and I. J. Lean. 2008a. A meta-analysis of the impact of monensin in lactating dairy cattle. Part 1. Metabolic effects. *J Dairy Sci.* 91:1334-1346. 10.3168/jds.2007-0607.
- Duffield, T. F., A. R. Rabiee, and I. J. Lean. 2008b. A meta-analysis of the impact of monensin in lactating dairy cattle. Part 2. Production effects. *J Dairy Sci.* 91:1347-1360. 10.3168/jds.2007-0608.
- Duffield, T. F., D. Sandals, K. E. Leslie, K. Lissemore, B. W. McBride, J. H. Lumsden, P. Dick, and R. Bagg. 1998. Efficacy of monensin for the prevention of subclinical ketosis in lactating dairy cows. *J Dairy Sci.* 81:2866-2873. 10.3168/jds.S0022-0302(98)75846-1.
- Earle, D. F. 1976. A guide to scoring dairy cow condition. *Journal of the Department of Agriculture, Victoria.* 1976:228-231.
- Emery, R. S., J. S. Liesman, and T. H. Herdt. 1992. Metabolism of long chain fatty acids by ruminant liver. *J Nutr.* 122:832-837.
- Enemark, J. M. 2008. The monitoring, prevention and treatment of sub-acute ruminal acidosis (SARA): a review. *Vet J.* 176:32-43. 10.1016/j.tvjl.2007.12.021.

- Etherton, T. D. and D. E. Bauman. 1998. Biology of somatotropin in growth and lactation of domestic animals. *Physiol Rev.* 78:745-761.
- Ferguson, J. D. 2002. A Review of Body Condition Scoring in Dairy Cows. in Proc. Texas Animal Nutrition Council.
- Ferguson, J. D., D. T. Galligan, and N. Thomsen. 1994. Principal descriptors of body condition score in Holstein cows. *J Dairy Sci.* 77:2695-2703. 10.3168/jds.S0022-0302(94)77212-X.
- Fisher, R. A. 1935. The logic of inductive inference. *Journal of Royal Statistical Society.* 98:39-82.
- Fleiss, J. L. 1971. Measuring nominal scale agreement among many raters. *Psychol Bull.* 76(5):378-382.
- Fleming, S. A. 2008. Bovine metabolic disorders. Page 1365 in *Large animal internal medicine.* 4 th ed. B. P. Bradford, ed. Mosby Elsevier, United States.
- Friggens, N. C. and J. H. Badsberg. 2007. The effect of breed and parity on curves of body condition during lactation estimated using a non-linear function. *Animal.* 1:565-574. 10.1017/S1751731107691861.
- Frizzell, R. T., P. J. Campbell, and A. D. Cherrington. 1988. Gluconeogenesis and hypoglycemia. *Diabetes Metab Rev.* 4:51-70.
- Gallo, L., P. Carnier, M. Cassandro, R. Mantovani, L. Bailoni, B. Contiero, and G. Bittante. 1996. Change in body condition score of Holstein cows as affected by parity and mature equivalent milk yield. *J Dairy Sci.* 79:1009-1015. 10.3168/jds.S0022-0302(96)76452-4.

- Garcia, E., K. Konig, B. H. Allesen-Holm, I. C. Klaas, J. M. Amigo, R. Bro, and C. Enevoldsen. 2015. Experienced and inexperienced observers achieved relatively high within-observer agreement on video mobility scoring of dairy cows. *J Dairy Sci.* 98:4560-4571. 10.3168/jds.2014-9266.
- Garnsworthy, P. C. and J. H. Topps. 1982. The effect of body condition of dairy cows at calving on their food-intake and performance when given complete diets. *Anim Prod.* 35:113-119.
- Gearhart, M. A., C. R. Curtis, H. N. Erb, R. D. Smith, C. J. Sniffen, L. E. Chase, and M. D. Cooper. 1990. Relationship of Changes in Condition Score to Cow Health in Holsteins. *J Dairy Sci.* 73:3132-3140.
- Geishauser, T., K. Leslie, J. Tenhag, and A. Bashiri. 2000. Evaluation of eight cow-side ketone tests in milk for detection of subclinical ketosis in dairy cows. *J Dairy Sci.* 83:296-299. 10.3168/jds.S0022-0302(00)74877-6.
- Gill, M. 1979. The principles and practice of feeding ruminants on complete diets. *Grass Forage Sci.* 34:155-161.
- Gillund, P., O. Reksen, Y. T. Grohn, and K. Karlberg. 2001. Body condition related to ketosis and reproductive performance in Norwegian dairy cows. *J Dairy Sci.* 84:1390-1396. 10.3168/jds.S0022-0302(01)70170-1.
- Gohary, K., M. W. Overton, M. Von Massow, S. J. LeBlanc, K. D. Lissemore, and T. F. Duffield. 2016. The cost of a case of subclinical ketosis in Canadian dairy herds. *Can Vet J.* 57:728-732.
- Gomez-Cortes, P., P. Frutos, A. R. Mantecon, M. Juarez, M. A. de la Fuente, and G. Hervas. 2008. Milk production, conjugated linoleic acid content, and in vitro ruminal

- fermentation in response to high levels of soybean oil in dairy ewe diet. *J Dairy Sci.* 91:1560-1569. 10.3168/jds.2007-0722.
- Gordon, J. L., T. F. Duffield, T. H. Herdt, D. F. Kelton, L. Neuder, and S. J. LeBlanc. 2017. Effects of a combination butaphosphan and cyanocobalamin product and insulin on ketosis resolution and milk production. *J Dairy Sci.* 100:2954-2966. 10.3168/jds.2016-11925.
- Gordon, J. L., S. J. Leblanc, and T. F. Duffield. 2013. Ketosis treatment in lactating dairy cattle. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 29:433-445. 10.1016/j.cvfa.2013.03.001.
- Grant, R. J. and J. L. Albright. 1995. Feeding behavior and management factors during the transition period in dairy cattle. *J Anim Sci.* 73:2791-2803.
- Green, B. L. 1997. Effects of the monensin controlled-release capsule on ruminal parameters and the occurrence of subclinical ketosis in transition dairy cows. Page 160. Vol. Master. University of Guelph.
- Green, B. L., B. W. McBride, D. Sandals, K. E. Leslie, R. Bagg, and P. Dick. 1999. The impact of a monensin controlled-release capsule on subclinical ketosis in the transition dairy cow. *J Dairy Sci.* 82:333-342. 10.3168/jds.S0022-0302(99)75240-9.
- Greene, W. A., D. M. Galton, and H. N. Erb. 1988. Effects of prepartum milking on milk production and health performance. *J Dairy Sci.* 71:1406-1416. 10.3168/jds.S0022-0302(88)79699-X.

- Grummer, R. R., S. J. Bertics, and R. A. Hackbart. 2000. Short communication: effects of prepartum milking on dry matter intake, liver triglyceride, and plasma constituents. *J Dairy Sci.* 83:60-61. 10.3168/jds.S0022-0302(00)74855-7.
- Grummer, R. R., D. G. Mashek, and A. Hayirli. 2004. Dry matter intake and energy balance in the transition period. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 20:447-470. 10.1016/j.cvfa.2004.06.013.
- Haemmerle, G., R. Zimmermann, and R. Zechner. 2003. Letting lipids go: hormone-sensitive lipase. *Curr Opin Lipidol.* 14:289-297. 10.1097/01.mol.0000073509.41685.36.
- Hale, S. A., A. V. Capuco, and R. A. Erdman. 2003. Milk yield and mammary growth effects due to increased milking frequency during early lactation. *J Dairy Sci.* 86:2061-2071. 10.3168/jds.S0022-0302(03)73795-3.
- Haney, M. E., Jr. and M. M. Hoehn. 1967. Monensin, a new biologically active compound. I. Discovery and isolation. *Antimicrob Agents Chemother.* 7:349-352.
- Hayirli, A., R. R. Grummer, E. V. Nordheim, and P. M. Crump. 2003. Models for predicting dry matter intake of Holsteins during the prefresh transition period. *J Dairy Sci.* 86:1771-1779. Doi 10.3168/Jds.S0022-0302(03)73762-X.
- Henderson, G., F. Cox, S. Ganesh, A. Jonker, W. Young, C. Global Rumen Census, and P. H. Janssen. 2015. Rumen microbial community composition varies with diet and host, but a core microbiome is found across a wide geographical range. *Sci Rep.* 5:14567. 10.1038/srep14567.
- Herdt, T. H. 1998. Ketosis in cattle. Page 2305 in *The Merck veterinary manual*. Eight edition ed. S. E. Aiello, ed. Merck & Co., Inc., New Jersey.

- Herdt, T. H. 2000. Ruminant adaptation to negative energy balance. Influences on the etiology of ketosis and fatty liver. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 16:215-230, v.
- Herdt, T. H. 2002a. Gastrointestinal, physiology and metabolism. Page 221 in *Textbook of veterinary physiology.* J. G. Cunningham, ed. W.B. Saunders company, Philadelphia.
- Herdt, T. H. 2002b. Postabsorptive nutrient utilization. Page 304 in *Textbook of veterinary physiology.* J. G. Cunningham, ed. W.B. Saunders company, Philadelphia.
- Hoeben, D., C. Burvenich, A. M. Massart-Leen, M. Lenjou, G. Nijs, D. Van Bockstaele, and J. F. Beckers. 1999. In vitro effect of ketone bodies, glucocorticosteroids and bovine pregnancy-associated glycoprotein on cultures of bone marrow progenitor cells of cows and calves. *Vet Immunol Immunopathol.* 68:229-240.
- Hollis, S. and F. Campbell. 1999. What is meant by intention to treat analysis? Survey of published randomised controlled trials. *BMJ.* 319:670-674.
- Holtenius, P. and K. Holtenius. 1996. New aspects of ketone bodies in energy metabolism of dairy cows: a review. *J Vet Med A.* 43:579-587.
- Hopster, H., R. M. Bruckmaier, J. T. Van der Werf, S. M. Korte, J. Macuhova, G. Korte-Bouws, and C. G. van Reenen. 2002. Stress responses during milking; comparing conventional and automatic milking in primiparous dairy cows. *J Dairy Sci.* 85:3206-3216. 10.3168/jds.S0022-0302(02)74409-3.

- Horst, R. L., J. P. Goff, T. A. Reinhardt, and D. R. Buxton. 1997. Strategies for preventing milk fever in dairy cattle. *J Dairy Sci.* 80:1269-1280. 10.3168/jds.S0022-0302(97)76056-9.
- Houseknecht, K. L., C. P. Portocarrero, S. Ji, R. Lemenager, and M. E. Spurlock. 2000. Growth hormone regulates leptin gene expression in bovine adipose tissue: correlation with adipose IGF-1 expression. *J Endocrinol.* 164:51-57.
- Huczynski, A., J. Stefanska, P. Przybylski, B. Brzezinski, and F. Bartl. 2008. Synthesis and antimicrobial properties of monensin A esters. *Bioorg Med Chem.* 18:2585-2589. 10.1016/j.bmcl.2008.03.038.
- Ingle, D. L., D. E. Bauman, and U. S. Garrigus. 1972. Lipogenesis in the ruminant: in vivo site of fatty acid synthesis in sheep. *J Nutr.* 102:617-623.
- Iwersen, M., U. Falkenberg, R. Voigtsberger, D. Forderung, and W. Heuwieser. 2009. Evaluation of an electronic cowside test to detect subclinical ketosis in dairy cows. *J Dairy Sci.* 92:2618-2624. 10.3168/jds.2008-1795.
- Jenkins, T. C., R. J. Wallace, P. J. Moate, and E. E. Mosley. 2008. Board-invited review: Recent advances in biohydrogenation of unsaturated fatty acids within the rumen microbial ecosystem. *J Anim Sci.* 86:397-412. 10.2527/jas.2007-0588.
- Keown, J. F., R. W. Everett, N. B. Empet, and L. H. Wadell. 1986. Lactation curves. *J Dairy Sci.* 69:769-781.
- King, T. S. and V. M. Chinchilli. 2001. A generalized concordance correlation coefficient for continuous and categorical data. *Stat Med.* 20:2131-2147. 10.1002/sim.845.
- Kleen, J. L., G. A. Hooijer, J. Rehage, and J. P. Noordhuizen. 2003. Subacute ruminal acidosis (SARA): a review. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med.* 50:406-414.

- Kleppe, B. B., R. J. Aiello, R. R. Grummer, and L. E. Armentano. 1988. Triglyceride accumulation and very low density lipoprotein secretion by rat and goat hepatocytes in vitro. *J Dairy Sci.* 71:1813-1822. 10.3168/jds.S0022-0302(88)79750-7.
- Knol, M. J., I. van der Tweel, D. E. Grobbee, M. E. Numans, and M. I. Geerlings. 2007. Estimating interaction on an additive scale between continuous determinants in a logistic regression model. *Int J Epidemiol.* 36:1111-1118. 10.1093/ije/dym157.
- Knol, M. J. and T. J. VanderWeele. 2012. Recommendations for presenting analyses of effect modification and interaction. *Int J Epidemiol.* 41:514-520. 10.1093/ije/dyr218.
- Kristensen, E., L. Dueholm, D. Vink, J. E. Andersen, E. B. Jakobsen, S. Illum-Nielsen, F. A. Petersen, and C. Enevoldsen. 2006. Within- and across-person uniformity of body condition scoring in Danish Holstein cattle. *J Dairy Sci.* 89:3721-3728. 10.3168/jds.S0022-0302(06)72413-4.
- Krug, C., T. J. DeVries, J. P. Roy, J. Dubuc, and S. Dufour. 2017. Incomplete milking in early lactation does not affect dairy cows resting behaviors: results from a randomized controlled trial. *Front Vet Sci.* 4 10.3389/fvets.2017.00066.
- Lacasse, P., V. Lollivier, R. M. Bruckmaier, Y. R. Boisclair, G. F. Wagner, and M. Boutinaud. 2011. Effect of the prolactin-release inhibitor quinagolide on lactating dairy cows. *J Dairy Sci.* 94:1302-1309. Doi 10.3168/Jds.2010-3649.
- Landis, J. R. and G. G. Koch. 1977a. An application of hierarchical kappa-type statistics in the assessment of majority agreement among multiple observers. *Biometrics.* 33:363-374.

- Landis, J. R. and G. G. Koch. 1977b. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*. 33:159-174.
- Lefebvre, D. 2009. D'une lactation à l'autre : pour une transition réussie. in Proc. Symposium sur les bovins laitiers. Agri-réseau, Drummondville.
- Leury, B. J., L. H. Baumgard, S. S. Block, N. Segole, R. A. Ehrhardt, R. P. Rhoads, D. E. Bauman, A. W. Bell, and Y. R. Boisclair. 2003. Effect of insulin and growth hormone on plasma leptin in periparturient dairy cows. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 285:R1107-1115. 10.1152/ajpregu.00320.2003.
- Liesman, J. S., J. P. McNamara, A. V. Capuco, M. Binelli, W. K. Vanderkooi, R. S. Emery, H. A. Tucker, and W. M. Moseley. 1995. Comparison of growth hormone-releasing factor and somatotropin: lipid and glucose metabolism in dairy cows. *J Dairy Sci*. 78:2159-2166. 10.3168/jds.S0022-0302(95)76843-6.
- Linn, J. G. 1988. Factors affecting the composition of milk from dairy cows. Page 384 in *Designing Foods: Animal product options in the marketplace*. N. A. o. sciences, ed. National Research Council Washington D.C.
- Loiselle, M. C., C. Ster, B. G. Talbot, X. Zhao, G. F. Wagner, Y. R. Boisclair, and P. Lacasse. 2009. Impact of postpartum milking frequency on the immune system and the blood metabolite concentration of dairy cows. *J Dairy Sci*. 92:1900-1912. 10.3168/jds.2008-1399.
- Lucy, M. C., H. Jiang, and Y. Kobayashi. 2001. Changes in the somatotrophic axis associated with the initiation of lactation. *J Dairy Sci*. 84:E113-E119.
- Lucy, M. C., G. A. Verkerk, B. E. Whyte, K. A. Macdonald, L. Burton, R. T. Cursons, J. R. Roche, and C. W. Holmes. 2009. Somatotrophic axis components and nutrient

- partitioning in genetically diverse dairy cows managed under different feed allowances in a pasture system. *J Dairy Sci.* 92:526-539. 10.3168/jds.2008-1421.
- Macdonald, K. A. R., J.R.;. 2008. Body condition scoring made easy. DairyNZ, New Zealand.
- Marquardt, J. P., R. L. Horst, and N. A. Jorgensen. 1977. Effect of parity on dry matter intake at parturition in dairy cattle. *J Dairy Sci.* 60:929-934. 10.3168/jds.S0022-0302(77)83965-9.
- Mason, S. 1997. Breed class average. in DairyNote. agromedia.ca.
- Mayo, K. E., P. A. Godfrey, S. T. Suhr, D. J. Kulik, and J. O. Rahal. 1995. Growth hormone-releasing hormone: synthesis and signaling. *Recent Prog Horm Res.* 50:35-73.
- McArt, J. A., D. V. Nydam, and G. R. Oetzel. 2012a. Epidemiology of subclinical ketosis in early lactation dairy cattle. *J Dairy Sci.* 95:5056-5066. 10.3168/jds.2012-5443.
- McArt, J. A., D. V. Nydam, and G. R. Oetzel. 2012b. A field trial on the effect of propylene glycol on displaced abomasum, removal from herd, and reproduction in fresh cows diagnosed with subclinical ketosis. *J Dairy Sci.* 95:2505-2512. 10.3168/jds.2011-4908.
- McArt, J. A., D. V. Nydam, G. R. Oetzel, T. R. Overton, and P. A. Ospina. 2013. Elevated non-esterified fatty acids and beta-hydroxybutyrate and their association with transition dairy cow performance. *Vet J.* 198:560-570. 10.1016/j.tvjl.2013.08.011.

- McArt, J. A., D. V. Nydam, and M. W. Overton. 2015. Hyperketonemia in early lactation dairy cattle: a deterministic estimate of component and total cost per case. *J Dairy Sci.* 98:2043-2054. 10.3168/jds.2014-8740.
- McCarthy, S., D. P. Berry, P. Dillon, M. Rath, and B. Horan. 2007. Influence of Holstein-Friesian strain and feed system on body weight and body condition score lactation profiles. *J Dairy Sci.* 90:1859-1869. 10.3168/jds.2006-501.
- McGarry, J. D. and N. F. Brown. 1997. The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis. *Eur J Biochem.* 244:1-14.
- McNamara, J. P. 1991. Regulation of adipose tissue metabolism in support of lactation. *J Dairy Sci.* 74:706-719. 10.3168/jds.S0022-0302(91)78217-9.
- McNamara, J. P. and J. K. Hillers. 1986. Regulation of bovine adipose tissue metabolism during lactation. 2. Lipolysis response to milk production and energy intake. *J Dairy Sci.* 69:3042-3050. 10.3168/jds.S0022-0302(86)80767-6.
- Moore, C. E., H. C. Hafliger, O. B. Mendivil, S. R. Sanders, D. E. Bauman, and L. H. Baumgard. 2004. Increasing amounts of conjugated linoleic acid progressively reduces milk fat synthesis immediately postpartum. *J Dairy Sci.* 87:1886-1895.
- Morin, P. A., Y. Chorfi, J. Dubuc, J. P. Roy, D. Santschi, and S. Dufour. 2017. Short communication: An observational study investigating inter-observer agreement for variation over time of body condition score in dairy cows. *J Dairy Sci.* 10.3168/jds.2016-11872.
- Mullins, C. R., L. K. Mamedova, M. J. Brouk, C. E. Moore, H. B. Green, K. L. Perfield, J. F. Smith, J. P. Harner, and B. J. Bradford. 2012. Effects of monensin on

- metabolic parameters, feeding behavior, and productivity of transition dairy cows. *J Dairy Sci.* 95:1323-1336. 10.3168/jds.2011-4744.
- Mulvaney, P. M. 1981. Dairy cow condition scoring. BSAP Occasional Publication.349-353.
- Nicholson, M. J. and A. R. Sayers. 1987. Repeatability, reproducibility and sequential use of condition scoring of *Bos indicus* cattle. *Trop Anim Health Prod.* 19:127-135.
- NRC. 2001. Nutrient requirements of dairy cattle. 7th ed. Nutrient requirements of domestic animals. National Academy Press, Washington, D.C.
- O'Connor, A. M., J. M. Sargeant, I. A. Gardner, J. S. Dickson, M. E. Torrence, C. E. Dewey, I. R. Dohoo, R. B. Evans, J. T. Gray, M. Greiner, G. Keefe, S. L. Lefebvre, P. S. Morley, A. Ramirez, W. Sisco, D. R. Smith, K. Snedeker, J. Sofos, M. P. Ward, R. Wills, and C. Steering. 2010. The REFLECT statement: methods and processes of creating reporting guidelines for randomized controlled trials for livestock and food safety. *J Vet Intern Med.* 24:57-64. 10.1111/j.1939-1676.2009.0441.x.
- Oetzel, G. R. 2004. Monitoring and testing dairy herds for metabolic disease. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 20:651-674. 10.1016/j.cvfa.2004.06.006.
- Oetzel, G. R. 2007. Subacute ruminal acidosis in dairy herds : physiology, pathophysiology, milk fat responses, and nutritional management. in 40th annual conference of American association of bovine practionners Vancouver, BC, Canada.
- Oetzel, G. R. 2013. Understanding the impact of subclinical ketosis. in Proc. Florida ruminant nutrition 24th symposium. University of Florida IFAS extension, Florida.

- Oikawa, S. and G. R. Oetzel. 2006. Decreased insulin response in dairy cows following a four-day fast to induce hepatic lipidosis. *J Dairy Sci.* 89:2999-3005. 10.3168/jds.S0022-0302(06)72572-3.
- Ospina, P. A., J. A. McArt, T. R. Overton, T. Stokol, and D. V. Nydam. 2013. Using nonesterified fatty acids and beta-hydroxybutyrate concentrations during the transition period for herd-level monitoring of increased risk of disease and decreased reproductive and milking performance. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 29:387-+. Doi 10.1016/J.Cvfa.2013.04.003.
- Ospina, P. A., D. V. Nydam, T. Stokol, and T. R. Overton. 2010. Evaluation of nonesterified fatty acids and beta-hydroxybutyrate in transition dairy cattle in the northeastern United States: Critical thresholds for prediction of clinical diseases. *J Dairy Sci.* 93:546-554. 10.3168/jds.2009-2277.
- Palmquist, D. L., A. L. Lock, K. J. Shingfield, and D. E. Bauman. 2005. Biosynthesis of conjugated linoleic acid in ruminants and humans. *Adv Food Nutr Res.* 50:179-217. 10.1016/S1043-4526(05)50006-8.
- Pappritz, J., U. Meyer, R. Kramer, E. M. Weber, G. Jahreis, J. Rehage, G. Flachowsky, and S. Danicke. 2011. Effects of long-term supplementation of dairy cow diets with rumen-protected conjugated linoleic acids (CLA) on performance, metabolic parameters and fatty acid profile in milk fat. *Arch Anim Nutr.* 65:89-107. 10.1080/1745039X.2011.552275.
- Pedron, O., F. Cheli, E. Senatore, D. Baroli, and R. Rizzi. 1993a. Effect of body condition score at calving on performance, some blood parameters, and milk fatty

- acid composition in dairy cows. *J Dairy Sci.* 76:2528-2535. 10.3168/jds.S0022-0302(93)77588-8.
- Pedron, O., F. Cheli, E. Senatore, D. Baroli, and R. Rizzi. 1993b. Effect of Body Condition Score at Calving on Performance, Some Blood Parameters, and Milk Fatty-Acid Composition in Dairy-Cows. *Journal of Dairy Science.* 76:2528-2535.
- Peeler, E. J., M. J. Green, J. L. Fitzpatrick, K. L. Morgan, and L. E. Green. 2000. Risk factors associated with clinical mastitis in low somatic cell count British dairy herds. *J Dairy Sci.* 83:2464-2472. 10.3168/jds.S0022-0302(00)75138-1.
- Petersson-Wolfe, C. S., K. E. Leslie, T. Osborne, B. W. McBride, R. Bagg, G. Vessie, P. Dick, and T. F. Duffield. 2007. Effect of monensin delivery method on dry matter intake, body condition score, and metabolic parameters in transition dairy cows. *J Dairy Sci.* 90:1870-1879. 10.3168/jds.2006-402.
- Phyn, C. V., J. K. Kay, A. G. Rius, S. R. Morgan, C. G. Roach, T. M. Grala, and J. R. Roche. 2014. Temporary alterations to postpartum milking frequency affect whole-lactation milk production and the energy status of pasture-grazed dairy cows. *J Dairy Sci.* 10.3168/jds.2013-7836.
- Rabelo, E., R. L. Rezende, S. J. Bertics, and R. R. Grummer. 2003. Effects of transition diets varying in dietary energy density on lactation performance and ruminal parameters of dairy cows. *J Dairy Sci.* 86:916-925. 10.3168/jds.S0022-0302(03)73674-1.
- Raboisson, D., M. Mounie, E. Khenifar, and E. Maigne. 2015. The economic impact of subclinical ketosis at the farm level: Tackling the challenge of over-estimation due

- to multiple interactions. *Prev Vet Med.* 122:417-425.
10.1016/j.prevetmed.2015.07.010.
- Radcliff, R. P., B. L. McCormack, B. A. Crooker, and M. C. Lucy. 2003. Growth hormone (GH) binding and expression of GH receptor 1A mRNA in hepatic tissue of periparturient dairy cows. *J Dairy Sci.* 86:3933-3940. 10.3168/jds.S0022-0302(03)74002-8.
- Rasmussen, L. K. N., B.L.; Pryce, J.E. Mottram, T.T. Veerkamp, R.F. 1999. Risk factors associated with the incidence of ketosis in dairy cows. *J Anim Sci* 68:8.
- Renaville, R., M. Hammadi, and D. Portetelle. 2002. Role of the somatotrophic axis in the mammalian metabolism. *Domest Anim Endocrinol.* 23:351-360.
- Reynolds, C. K., G. B. Huntington, H. F. Tyrrell, and P. J. Reynolds. 1988. Net metabolism of volatile fatty acids, D-beta-hydroxybutyrate, nonesterified fatty acids, and blood gasses by portal-drained viscera and liver of lactating Holstein cows. *J Dairy Sci.* 71:2395-2405.
- Rhoads, R. P., J. W. Kim, B. J. Leury, L. H. Baumgard, N. Segole, S. J. Frank, D. E. Bauman, and Y. R. Boisclair. 2004. Insulin increases the abundance of the growth hormone receptor in liver and adipose tissue of periparturient dairy cows. *J Nutr.* 134:1020-1027.
- Roche, J. R., D. Blache, J. K. Kay, D. R. Miller, A. J. Sheahan, and D. W. Miller. 2008. Neuroendocrine and physiological regulation of intake with particular reference to domesticated ruminant animals. *Nutr Res Rev.* 21:207-234.
10.1017/S0954422408138744.

- Roche, J. R., N. C. Friggens, J. K. Kay, M. W. Fisher, K. J. Stafford, and D. P. Berry. 2009. Invited review: Body condition score and its association with dairy cow productivity, health, and welfare. *J Dairy Sci.* 92:5769-5801. 10.3168/Jds.2009-2431.
- Rotondi, M. A. and A. Donner. 2012. A confidence interval approach to sample size estimation for interobserver agreement studies with multiple raters and outcomes. *J Clin Epidemiol.* 65:778-784. 10.1016/j.jclinepi.2011.10.019.
- Ruegg, P. L. and R. L. Milton. 1995. Body condition scores of Holstein cows on Prince Edward Island, Canada: relationships with yield, reproductive performance, and disease. *J Dairy Sci.* 78:552-564. 10.3168/jds.S0022-0302(95)76666-8.
- Russell, J. B. and J. L. Rychlik. 2001. Factors that alter rumen microbial ecology. *Science.* 292:1119-1122.
- Santschi, D. E., R. Lacroix, J. Durocher, M. Duplessis, R. K. Moore, and D. M. Lefebvre. 2016. Prevalence of elevated milk beta-hydroxybutyrate concentrations in Holstein cows measured by Fourier-transform infrared analysis in Dairy Herd Improvement milk samples and association with milk yield and components. *J Dairy Sci.* 99:9263-9270. 10.3168/jds.2016-11128.
- Sartin, J. L., R. J. Kemppainen, K. A. Cummins, and J. C. Williams. 1988. Plasma-Concentrations of Metabolic Hormones in High and Low Producing Dairy-Cows. *J Dairy Sci.* 71:650-657.
- Sasaki, S. 2002. Mechanism of insulin action on glucose metabolism in ruminants. *Anim Sci J.* 73:423-433. 10.1046/j.1344-3941.2002.00059.x.

- Schelling, G. T. 1984. Monensin mode of action in the rumen. *J Anim Sci.* 58:1518-1527.
- Schukken, Y. H., F. J. Grommers, D. Van de Geer, H. N. Erb, and A. Brand. 1990. Risk factors for clinical mastitis in herds with a low bulk milk somatic cell count. 1. Data and risk factors for all cases. *J Dairy Sci.* 73:3463-3471. 10.3168/jds.S0022-0302(90)79045-5.
- Schulz, K., J. Frahm, U. Meyer, S. Kersten, D. Reiche, J. Rehage, and S. Danicke. 2014. Effects of prepartal body condition score and peripartal energy supply of dairy cows on postpartal lipolysis, energy balance and ketogenesis: an animal model to investigate subclinical ketosis. *J Dairy Res.* 1-10. 10.1017/S0022029914000107.
- Sim, J. and C. C. Wright. 2005. The kappa statistic in reliability studies: use, interpretation, and sample size requirements. *Phys Ther.* 85:257-268.
- Smith, B. P. 2002. Large animal internal medicine : diseases of horses, cattle, sheep, and goats. 3rd edition ed. Mosby.
- Smith, T. R. and J. P. McNamara. 1990. Regulation of bovine adipose tissue metabolism during lactation. 6. Cellularity and hormone-sensitive lipase activity as affected by genetic merit and energy intake. *J Dairy Sci.* 73:772-783.
- Ster, C., M. C. Loiselle, and P. Lacasse. 2012. Effect of postcalving serum nonesterified fatty acids concentration on the functionality of bovine immune cells. *J Dairy Sci.* 95:708-717. 10.3168/jds.2011-4695.
- Stevenson, J. S. and E. P. Call. 1988. Reproductive disorders in the periparturient dairy cow. *J Dairy Sci.* 71:2572-2583. 10.3168/jds.S0022-0302(88)79846-X.

- Suriyasathaporn, W., C. Heuer, E. N. Noordhuizen-Stassen, and Y. H. Schukken. 2000. Hyperketonemia and the impairment of udder defense: a review. *Vet Res.* 31:397-412. 10.1051/vetres:2000128.
- Suthar, V. S., J. Canelas-Raposo, A. Deniz, and W. Heuwieser. 2013. Prevalence of subclinical ketosis and relationships with postpartum diseases in European dairy cows. *J Dairy Sci.* 96:2925-2938. 10.3168/jds.2012-6035.
- Sutton, J. D., M. S. Dhanoa, S. V. Morant, J. France, D. J. Napper, and E. Schuller. 2003. Rates of production of acetate, propionate, and butyrate in the rumen of lactating dairy cows given normal and low-roughage diets. *J Dairy Sci.* 86:3620-3633. 10.3168/jds.S0022-0302(03)73968-X.
- Tajima, K., S. Arai, K. Ogata, T. Nagamine, H. Matsui, M. Nakamura, R. Aminov, and Y. Benno. 2000. Rumen bacterial community transition during adaptation to high-grain diet. *Anaerobe.* 6:273-284. doi:10.1006/anae.2000.0353.
- Tamminga, S., P. A. Luteijn, and R. G. M. Meijer. 1997. Changes in composition and energy content of liveweight loss in dairy cows with time after parturition. *Livest Prod Sci.* 52:31-38. Doi 10.1016/S0301-6226(97)00115-2.
- Tatone, E. H., T. F. Duffield, S. J. LeBlanc, T. J. DeVries, and J. L. Gordon. 2017. Investigating the within-herd prevalence and risk factors for ketosis in dairy cattle in Ontario as diagnosed by the test-day concentration of beta-hydroxybutyrate in milk. *J Dairy Sci.* 100:1308-1318. 10.3168/jds.2016-11453.
- Thihsing-Hansen, T., R. J. Jorgensen, and S. Ostergaard. 2002. Milk fever control principles: a review. *Acta Vet Scand.* 43:1-19.

- Unger, R. H. 1972. Insulin-glucagon ratio. *Isr J Med Sci.* 8:252-257.
- Vernon, R. G. and C. M. Pond. 1997. Adaptations of maternal adipose tissue to lactation. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2:231-241.
- Von, E. 1964. Quantitation of Stress by Catecholamine Analysis. *Clin Pharmacol Ther.* 5:398-404.
- Wall, E. H., H. M. Crawford, S. E. Ellis, G. E. Dahl, and T. B. McFadden. 2006. Mammary response to exogenous prolactin or frequent milking during early lactation in dairy cows. *J Dairy Sci.* 89:4640-4648. 10.3168/jds.S0022-0302(06)72514-0.
- Wang, X. 2012. Correlation between composition of the bacterial community and concentration of volatile fatty acids in the rumen during the transition period and ketosis in dairy cows. *Appl Environ Microb.* 78
- Washburn, S. P., S. L. White, J. T. Green, Jr., and G. A. Benson. 2002. Reproduction, mastitis, and body condition of seasonally calved Holstein and Jersey cows in confinement or pasture systems. *J Dairy Sci.* 85:105-111. 10.3168/jds.S0022-0302(02)74058-7.
- Whigham, L. D., M. E. Cook, and R. L. Atkinson. 2000. Conjugated linoleic acid: implications for human health. *Pharmacol Res.* 42:503-510. 10.1006/phrs.2000.0735.
- Wildman, E. E., G. M. Jones, P. E. Wagner, R. L. Boman, T. H. F., and L. T. N. 1982. A dairy cow body condition scoring system and its relationship to selected production characteristics. *J Dairy Sci.* 65:495-497.

Wright, I. A. and A. J. F. Russel. 1984. Partition of fat, body-composition and body condition score in mature cows. *Anim Prod.* 38:23-32.