

Université de Montréal

**Efficacité d'un traitement intra-mammaire prolongé
à base de ceftiofur (Spectramast®) pour les
mammites cliniques chez les vaches laitières**

par

Geoffrey Truchetti

Département de sciences cliniques

Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine vétérinaire

en vue de l'obtention du grade de

Maître ès sciences (M.Sc.)

en sciences vétérinaires

option sciences cliniques

mai 2011

© Geoffrey Truchetti, 2011

Université de Montréal
Faculté de médecine vétérinaire

Ce mémoire intitulé

Efficacité d'un traitement intra-mammaire prolongé à base de ceftiofur
(Spectramast®) pour les mammites cliniques chez les vaches laitières

présenté par
Geoffrey Truchetti

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Daniel T. Scholl, président-rapporteur
Jean-Philippe Roy, directeur de recherche
Émile Bouchard, codirecteur
Luc DesCôteaux, codirecteur
Jocelyn Dubuc, membre du jury

Résumé

Peu d'études ont exploré l'utilisation du traitement prolongé pour les mammites cliniques et aucune ne portait sur l'utilisation du traitement prolongé à base de ceftiofur pour le traitement des mammites cliniques légères à modérées. L'objectif de cette étude était d'évaluer l'efficacité du traitement intra-mammaire prolongé à base de ceftiofur pour les mammites cliniques légères à modérées, en considérant toutes les bactéries responsables ou seulement *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) et les streptocoques. Des vaches laitières (n = 241) de 22 élevages du Québec et de l'Ontario ont été incluses. L'étude a été conçue comme un essai clinique à allocation aléatoire. Pour chaque cas de mammite clinique légère à modérée, 125 mg d'hydrochloride de ceftiofur (Spectramast® LC) a été administré par voie intra-mammaire une fois par jour pour 2 ou 8 jours. Le pourcentage de guérison clinique 21 jours après la fin du traitement était de 89% (n = 98/110 pour chaque groupe, p = 0,95). Les pourcentages de guérison bactériologique 21 jours après la fin du traitement pour les groupes 2 jours et 8 jours étaient 32% (n = 15/47) et 61% (n = 25/41) respectivement pour toutes les bactéries (p < 0,01); 64% (n = 9/14) et 82% (n = 9/11) respectivement pour les streptocoques (p = 0,50); et 0% (n = 0/20) et 47% (n = 9/19) pour *S. aureus* (p < 0,01). Il n'y avait pas de différence entre les 2 groupes pour les nouvelles infections intra-mammaires (p = 0,30). Le traitement prolongé à base de ceftiofur est un choix raisonnable pour le traitement des mammites cliniques légères à modérées, en particulier causées par *S. aureus*.

Mots-clés : traitement prolongé, ceftiofur, mammite clinique, vache

Abstract

Little research has focused on extended therapy in lactating cows with clinical mastitis and none were with ceftiofur. The objective of the present study was to evaluate the efficacy of an intramammary extended ceftiofur treatment for mild to moderate clinical mastitis, and to determine whether it would increase cure rates when considering any bacteria or more particularly *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) and streptococci. Holstein dairy cows (n = 241) from 22 herds located in Quebec and Ontario, Canada, were included. The study was designed as a randomized clinical trial. For each case of mild to moderate clinical mastitis diagnosed, 125 mg of ceftiofur hydrochloride (Spectramast® LC) was administered intramammary once a day for 2 or 8 consecutive days. Clinical cure rate 21 days after the last treatment was identical in each group (89%; n = 98/110; p = 0.95). Bacteriological cure rates 21 days after the last treatment for the 2- and 8-day regimens were 32% (n = 15/47) and 61% (n = 25/41), respectively, for all bacteria (p < 0.01); 64% (n = 9/14) and 82% (n = 9/11), respectively, for streptococci (p = 0.50); and 0% (n = 0/20) and 47% (n = 9/19), respectively, for *S. aureus* (p < 0.01). There were no statistical differences between experimental groups for new intramammary infections. Extended therapy appears to be a reasonable choice for the treatment of mild to moderate clinical mastitis, particularly in cases where *S. aureus* is the pathogen involved.

Keywords : extended therapy, ceftiofur, clinical mastitis, bovine

Tables des matières

TABLES DES MATIÈRES	V
LISTE DES TABLEAUX	IX
LISTE DES FIGURES	X
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	XI
REMERCIEMENTS	XII
INTRODUCTION	1
REVUE DE LITTÉRATURE	3
INTRODUCTION	3
1. ANTIBIOTHÉRAPIE INTRA-MAMMAIRE DES MAMMITES CLINIQUES	4
1.1. PHARMACOLOGIE	4
1.1.1. CONSIDÉRATIONS ANATOMIQUES	4
1.1.2. CONSIDÉRATIONS PHYSIOLOGIQUES	5
1.1.3. CONSIDÉRATIONS PHARMACEUTIQUES	8
1.1.4. CONSIDÉRATIONS INDIVIDUELLES	9
1.2. CARACTÉRISTIQUES DU TRAITEMENT INTRA-MAMMAIRE IDÉAL	12
2. MÉTHODE DE DIAGNOSTIC DES MAMMITES CLINIQUES	13
2.1. SIGNES CLINIQUES	13
2.2. IDENTIFICATION DES AGENTS PATHOGÈNES	14
2.2.1. LES DIFFÉRENTES MÉTHODES DE DÉTECTION DES AGENTS PATHOGÈNES	14
2.2.2. CRITÈRES D'INFECTION	17
2.2.3. CRITÈRES DE GUÉRISON	18

3. LE TRAITEMENT PROLONGÉ	19
3.1. CONCEPTS PHARMACOLOGIQUES	19
3.1.1. HISTORIQUE DU TRAITEMENT PROLONGÉ	19
3.1.2. BASES SCIENTIFIQUES	21
3.2. LIMITES DU TRAITEMENT PROLONGÉ	23
3.2.1. NOUVELLES INFECTIONS INTRA-MAMMAIRES	23
3.2.2. RISQUE DE RÉSIDUS	26
3.2.3. COÛT DES TRAITEMENTS	26
4. CEFTIOFUR ET MAMMITES	28
4.1. PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES	29
4.2. MÉTABOLISME	29
4.3. PHARMACOCINÉTIQUE	32
4.4. MODE D'ACTION	33
4.5. LE CEFTIOFUR, L'ANTIBIOTIQUE IDÉAL ?	36
5. RÉSULTATS DES ÉTUDES D'EFFICACITÉ CLINIQUE DU TRAITEMENT PROLONGÉ	38
5.1. EFFICACITÉ CONTRE LES MAMMITES CLINIQUES	38
5.2. AUTRES ÉTUDES SUR LE TRAITEMENT PROLONGÉ	39
CONCLUSION DE LA REVUE DE LITTÉRATURE	43
MÉTHODOLOGIE	44
CALCUL DU NOMBRE D'ANIMAUX	44
SÉLECTION DES TROUPEAUX	45

SÉLECTION DES ANIMAUX	45
GROUPES DE TRAITEMENT	46
RÉCOLTE DES ÉCHANTILLONS ET TRAITEMENT	47
ANALYSE DES ÉCHANTILLONS	50
DÉFINITIONS	54
ANALYSES STATISTIQUES	55
ARTICLE	57
ABSTRACT	58
INTRODUCTION	59
MATERIALS AND METHODS	60
RESULTS	65
DISCUSSION	67
ACKNOWLEDGMENTS	73
BIBLIOGRAPHY	74
DISCUSSION	82
POURCENTAGE DE GUÉRISON	82
DISTRIBUTION DES MAMMITES ET DES AGENTS PATHOGÈNES EN CAUSE	84
DÉLAI POUR LE RETOUR À LA NORMALE DU LAIT	86
NOUVELLES INFECTIONS INTRA-MAMMAIRES	87
FORCES ET FAIBLESSES DE L'ÉTUDE	90
CRITIQUE DE L'ÉTUDE	95
CONCLUSION	101

BIBLIOGRAPHIE

Liste des tableaux

Tableau 1. Incidence rapportée de nouvelles infections intra-mammaires (NIIM) dans les groupes contrôles versus groupes de traitement selon les différentes études sur le traitement prolongé intra-mammaire.....	24
Tableau 2. Concentrations minimales inhibitrices (CMI) du ceftiofur pour les bactéries à Gram+ et à Gram-. Adapté de Yancey et coll., 1987 (65).....	35
Tableau 3. Études sur le traitement prolongé pour les mammites cliniques	41
Tableau 4. Études sur le traitement prolongé pour les mammites sub-cliniques.	42
Tableau 5. Normes utilisées dans l'étude pour l'interprétation des résultats bactériologiques de lait. Adapté et traduit de Laboratory and Field Handbook on Bovine Mastitis, page 151, NMC, 1987.....	53
Table 1 (article). Distribution of initial bacteriological culture results among clinical mastitis cases.	78
Table 2 (article). Causes of loss of data for bacteriological analysis of infected mastitis cases.....	79
Table 3 (article). Bacteriological cure rates for two ceftiofur intramammary treatment regimens: standard 2-day therapy (2d group) and extended therapy (8d group).	80
Table 4 (article). Distribution and identification of new intramammary infections for the two intramammary treatment regimens using ceftiofur: standard 2 day therapy (2d group) and extended therapy (8d group) at 7, 14 and 21 days after the end of the treatments.	81
Tableau 10. Causes et proportion des pertes de données observées pour l'évaluation bactériologique.	92
Tableau 11. Coût par guérison des traitements standards et prolongés pour toutes les infections ou pour les infections causées par <i>Staphylococcus aureus</i> et les streptocoques.	97

Liste des figures

Figure 1. Effet d'un antibiotique concentration-dépendant (aminoglycoside) et temps-dépendant (béta-lactame) sur la concentration de bactéries <i>in vitro</i> . Adaptée de Prescott et coll., 2000 (54).....	22
Figure 2. Molécule de ceftiofur. Adaptée de Hornish et coll., 2002 (62).....	29
Figure 3. Métabolisme du ceftiofur. Adaptée de Hornish et coll., 2002 (62).....	31
Figure 4. Protocole de prise d'échantillon du projet Spectramast.	48
Figure 1 (article). Numbers of included and excluded cases of clinical mastitis for clinical and bacteriological evaluation.....	77
Figure 6. Arbre décisionnel pour le traitement des mammites cliniques légères à modérées.	100

Liste des sigles et abréviations

CMI :	Concentration minimale inhibitrice
DFC :	Desfurylceftiofur
<i>E. coli</i> :	<i>Escherichia coli</i>
mL :	Millilitre
NMC :	National Mastitis Council
NIIM :	Nouvelle infection intra-mammaire
PCR :	Polymerase chain reaction
<i>S. aureus</i> :	<i>Staphylococcus aureus</i>
SCN :	Staphylocoque à coagulase négatif
<i>Str. agalactiae</i> :	<i>Streptococcus agalactiae</i>
<i>Str. dysgalactiae</i> :	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>
<i>Str. spp.</i> :	<i>Streptococcus spp.</i>
<i>Str. uberis</i> :	<i>Streptococcus uberis</i>
µL :	Microlitre

Remerciements

Je tiens à remercier pour leurs conseils les membres de mon comité de supervision : Dr. Jean-Philippe Roy, directeur, Dr Émile Bouchard, co-directeur, Dr Luc DesCôteaux, co-directeur, Dre Michèle Doucet et Dr Daniel Scholl.

Je tiens également à remercier Guy Beauchamp pour son aide dans la réalisation des analyses statistiques.

Je tiens également à remercier le personnel du laboratoire de bactériologie pour avoir analysé plus de 2000 échantillons de lait pour le projet.

Merci également aux 22 producteurs qui ont accepté généreusement de participer à cette étude.

Je remercie également mes amis et ma famille qui m'ont encouragé et soutenu tout au long du processus.

Finalement, je remercie la compagnie Pfizer santé animale qui a généreusement subventionné cette étude.

Introduction

Les mammites sont la première cause d'utilisation d'antibiotiques et la pathologie la plus fréquente dans les élevages de bovins laitiers (1), ce qui en fait une des pathologies les plus coûteuses pour l'industrie laitière (2). Les pertes économiques associées aux mammites peuvent être classifiées en cinq grandes catégories : le coût du traitement, les pertes de lait, les pertes de production, le coût de la main d'œuvre et les pertes par réforme ou mort (3). Les pertes de lait, qu'elles soient dues au lait jeté en raison de la présence de résidus médicamenteux ou à une diminution de production de lait, représentent 80% du coût des mammites cliniques et sub-cliniques (4). En plus de ces coûts, la pression du public pour diminuer le risque de résidus d'antibiotique dans l'alimentation impose de choisir de façon judicieuse le traitement. Ce choix devrait s'appuyer sur la littérature scientifique.

Une nouvelle option thérapeutique consiste à augmenter la durée du traitement. L'efficacité des antibiotiques utilisés dans les traitements intramammaires étant dépendante du temps de contact entre l'antibiotique et les bactéries, cette augmentation de la durée du traitement devrait être associée à une augmentation du pourcentage de guérison. Cette option thérapeutique s'appelle le traitement prolongé.

Le ceftiofur est une céphalosporine à usage strictement vétérinaire. Son efficacité contre les bactéries responsables de mammites en fait un candidat idéal pour le traitement des mammites. L'efficacité du traitement prolongé à base de ceftiofur a été démontrée dans le cadre des mammites sub-cliniques et des

mammites cliniques expérimentales causées par *Streptococcus uberis* (*Str. uberis*).
Cependant aucune étude ne rapporte l'efficacité du traitement prolongé à base de
ceftiofur pour le traitement des mammites cliniques naturelles.

Revue de littérature

Introduction

La mammite est une inflammation du parenchyme mammaire, associée ou non à des signes cliniques. On distingue alors la mammite clinique et la mammite sub-clinique en fonction de la présence de signes cliniques tels que la modification du lait ou des quartiers, ou la présence de signes systémiques tels que la fièvre, l'abattement ou le manque d'appétit (5)

L'objectif du traitement des mammites est de permettre un retour en production rapide et complet (1). Lors de mammites cliniques, il s'agit donc d'obtenir une guérison clinique, mais aussi d'obtenir une guérison dite bactériologique, ce qui signifie d'éliminer du quartier l'agent pathogène responsable de la mammite. Cette guérison bactériologique a pour but de limiter la durée d'infection et de réduire le risque d'infection pour le reste du troupeau (1, 6). Une des nouvelles façons d'optimiser la guérison est le traitement prolongé.

Le but de la présente revue de littérature est de faire le point sur le traitement prolongé de la mammite. Pour cela, un rappel de la pharmacologie du traitement des mammites sera fait. Cela introduira la nécessité d'avoir un diagnostic lors du choix du traitement et pour suivre la guérison. Les bases pharmacologiques du traitement prolongé seront ensuite revues. Un rappel des propriétés pharmacologiques du ceftiofur sera alors réalisé pour expliquer son utilisation dans le cadre du traitement prolongé. Enfin une revue des études d'efficacité rapportant l'utilisation du traitement prolongé sera faite.

1. Antibiothérapie intra-mammaire des mammites cliniques

L'objectif de cette partie est de rappeler comment un antibiotique agit et interagit avec le quartier. Une revue complète sur le sujet peut être consulté ailleurs (1). La pharmacologie des traitements intra-mammaire sera abordée. De ces exposés découlera la notion d'antibiotique idéal dont origine celle du traitement prolongé.

1.1. Pharmacologie

De nombreuses considérations (anatomiques, physiologiques, pharmaceutiques et individuelles) influencent la distribution et l'élimination des antibiotiques intra-mammaires, affectant potentiellement le succès du traitement, mais aussi le délai d'attente pour la vente du lait contenant des résidus antibiotiques (1, 7).

1.1.1. Considérations anatomiques

La glande mammaire est composée d'un réseau de canaux bordés de cellules épithéliales et finissant dans les alvéoles, elles-mêmes tapissées par une unique couche de cellules sécrétoires (8). Ces alvéoles sont entourées de cellules myoépithéliales et d'un stroma conjonctif vascularisé contenant des adipocytes et des fibroblastes. Des jonctions apicales serrées connectent les cellules épithéliales entre elles et empêchent les échanges entre le lait et le sang. Les barrières empêchant le passage de drogues du lait vers le sang sont : les membranes stromale et vasculaire, la membrane basale, la membrane apicale et les jonctions entre les

cellules (9). Des processus de transport actif et passif, ainsi que de sécrétion permettent le passage de molécules du sang vers le lait (9). Les compartiments ciblés lors du traitement intra-mammaire sont le lait, le parenchyme mammaire et, lors d'infections sévères avec répercussions systémiques, la vache (1).

1.1.2. Considérations physiologiques

La distribution des antibiotiques intra-mammaires comporte initialement une phase de dissolution du composé puis une phase de diffusion de la molécule dans le lait, compartiment essentiellement hydrophile. La distribution dans le parenchyme plus profond et dans le sang nécessite une diffusion passive à travers des membranes lipophiles (10). Les drogues hydrophiles se distribuent donc bien dans le lait, et les drogues non ionisées, non liées et liposolubles diffusent mieux dans le parenchyme mammaire (10).

L'administration d'antibiotique par voie intra-mammaire est le traitement le plus utilisé pour les mammites cliniques légères à modérées (1, 7). Un avantage de l'utilisation de préparations intra-mammaires est l'obtention d'une forte concentration au site d'infection sans les effets systémiques liés à l'absorption dans la circulation générale. Il n'y a donc pas d'effet indésirable et de résidu dans les autres tissus car il n'y a presque aucune absorption systémique (11, 12). Les effets thérapeutiques des antibiotiques intra-mammaires seraient limités au lait et aux cellules épithéliales des canaux collecteurs et des alvéoles de la glande mammaire. Des données *in vitro* récentes utilisant un modèle de glandes mammaires isolées montrent que certains antibiotiques intra-mammaires (pénicilline, ampicilline et

oxacilline) peuvent atteindre des concentrations thérapeutiques même profondément dans le parenchyme mammaire (13, 14).

Une partie de l'antibiotique peut se lier aux tissus ce qui limite sa diffusion. Une étude réalisée sur des vaches en période de tarissement a montré que plus la drogue est lipophile, plus elle est éliminée rapidement du quartier. Une drogue plus lipophile diffuse mieux dans le quartier puis dans le sang, et sa concentration dans le quartier diminue donc plus rapidement qu'une drogue moins lipophile (15). De grandes variations entre les individus et entre les quartiers d'une même vache ont été observées dans cette étude. Certains des antibiotiques (polymyxine B, colistine, néomycine, streptomycine, spiramycine et certaines tétracyclines) disparaissent du lait à une vitesse exponentielle. Cette cinétique est probablement due à la forte concentration d'antibiotique qui sature les récepteurs, ce qui en laisse une plus grande proportion disponible pour diffuser (15).

Les antibiotiques utilisés dans les traitements intra-mammaires sont tous des acides ou des bases faibles, et existent en solution à l'état ionisé et non ionisé (15). La proportion d'antibiotique ionisé et non ionisé dépend de la constante de dissociation acido-basique (pK_a) de l'antibiotique et du pH de l'environnement. Le pK_a est le pH auquel il existe 50% de forme ionisée et 50% de forme non ionisée. Pour les acides faibles, la proportion de forme non ionisée augmente quand le pH diminue (c'est-à-dire en milieu acide), et inversement en milieu basique. Pour les bases faibles, c'est l'inverse; plus le milieu est basique plus la forme non ionisée est majoritaire. C'est la forme non ionisée qui peut passer à travers les membranes, si la molécule est lipophile. Donc, théoriquement, une plus grande proportion de

molécule non ionisée serait préférable pour un traitement intra-mammaire pour que l'antibiotique diffuse dans tout le parenchyme, bien que cela ne soit pas prouvé scientifiquement. Le pH du lait est légèrement acide ($6,4 < \text{pH} < 7,0$) par rapport au plasma ($\text{pH} = 7,4$). En cas de mammite, le lait devient un peu plus basique (12). La plupart des drogues approuvées aux États-Unis et au Canada sont majoritairement sous forme ionisés comme la céphapirine (98,8% sous forme ionisée), l'érythromycine (98,3% sous forme ionisée) et l'hétacilline (94,4% sous forme ionisée) (7). La novobiocine est une exception importante avec seulement 1,25% sous forme ionisée à un pH de 6,4 (7).

Les protéines présentes dans le lait et le plasma peuvent aussi lier de façon non spécifique les antibiotiques. Les complexes protéines/antibiotiques sont trop gros pour passer à travers les membranes ce qui diminue la diffusion des antibiotiques (7). Le lait contient de nombreuses protéines capable de lier les drogues intra-mammaires dont les caséines, l'alpha-lactalbumine et les bêta-lactaglobulines (12). Bien que les interactions antibiotiques-protéines soient considérées comme négligeables (15), elles ne sont pas complètement comprises. Bien que cela ne soit pas prouvé scientifiquement, certains auteurs pensent que la formation de complexes protéiques dans le lait pourrait favoriser l'élimination en piégeant l'antibiotique dans le compartiment de lait, ou augmenter le risque de résidus en favorisant son passage dans le sang par fixation sur les protéines plasmatiques (7).

1.1.3. Considérations pharmaceutiques

La dissolution d'un produit intra-mammaire implique la séparation de la formulation et la libération du principe actif. Une fois libéré, ce dernier peut diffuser dans le lait par les conduits lactifères principaux. Au final le pourcentage de dissolution détermine la dose disponible (16).

La taille des particules et la formulation sont deux facteurs importants qui influencent la distribution du principe actif dans le parenchyme mammaire. Une étude (13) a testé différentes formulations de pénicilline intra-mammaire. La meilleure distribution a été obtenue par l'usage d'une suspension à base d'huile contenant des particules micronisées. La suspension à base d'huile avec des particules de large taille se distribuait moins bien que la formulation aqueuse.

La formulation influence aussi l'élimination du principe actif, et donc les temps de retrait. Par exemple, l'utilisation de 3% d'aluminium monostéarate comme véhicule prolonge le temps d'excrétion (17). De nos jours, les produits à base d'aluminium monostéarate sont utilisés pour les formulations de traitement au tarissement tandis que les formulations pour vaches en lactation sont généralement à base d'huile végétale ou aqueuse (7).

L'antibiotique peut interférer avec la réaction immunitaire locale. Une étude (18) a rapporté que l'infusion intra-mammaire de céphapirine et de novobiocine dans des quartiers non-infectés au tarissement augmentait la concentration des neutrophiles dans les sécrétions mammaires mais diminuait la capacité de phagocytose des neutrophiles. Une autre étude (19) a montré *in vitro* que l'association novobiocine/pénicilline, le chloramphénicol et le tiamulin diminuaient

la viabilité des neutrophiles bovins, et que l'association novobiocine/pénicilline, l'amikacine, le rifampin, le chloramphénicol et le tiamulin diminuaient la phagocytose de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) par les neutrophiles bovins. Certains antibiotiques altèrent la fonction des neutrophiles et, donc, la réponse immunitaire normale du quartier.

1.1.4. Considérations individuelles

Quelques études ont exploré l'effet de la production laitière sur l'élimination des antibiotiques. Une étude sur 21 produits commerciaux (20) a montré que les vaches faibles productrices avaient un temps d'élimination prolongé. Cependant plusieurs vaches hautes productrices avaient également un temps d'élimination prolongé. La production laitière n'explique donc pas toute la cinétique d'élimination (20). Des études plus récentes ont montré une corrélation positive entre la production laitière et l'élimination pour la pirlimycine (21) et le ceftiofur (22). Bien que l'élimination soit probablement multi-factorielle, la production laitière et l'élimination de l'antibiotique semblent être liées : un niveau de production élevé favorise l'élimination, et inversement. Pour minimiser la dilution de la dose d'antibiotique dans le lait et éliminer les produits de l'inflammation obstruant les canaux lactifères, il est conseillé de faire le traitement intra-mammaire après l'administration d'oxytocine et après la traite (1).

La mammite induit des changements physiques et chimiques du lait et de la glande mammaire qui peuvent altérer la distribution des antibiotiques intra-mammaires. Les canaux lactifères peuvent être comprimés par l'inflammation et

l'œdème ou bouchés par des sécrétions d'origine inflammatoire, ce qui peut empêcher une distribution homogène des drogues (16, 23)

L'inflammation de la glande mammaire modifie la perméabilité vasculaire et augmente souvent l'absorption systémique et la distribution des drogues intramammaires. Par exemple, la gentamycine n'est pas détectée dans le plasma après administration intra-mammaire chez une vache saine, mais l'est chez une vache présentant une mammite clinique (24). Il est aussi suggéré par certains auteurs (7) que les drogues intramammaires diffusent plus profondément dans le parenchyme lors de mammite à cause de l'altération des liaisons entre les cellules épithéliales, bien que cela ne soit pas prouvé expérimentalement.

Les changements de composition du lait peuvent en théorie avoir un impact sur la pharmacocinétique des drogues intramammaires, notamment l'augmentation du pH, de la concentration en albumine, du comptage de cellules somatiques (CCS) et la diminution de la caséine et des graisses. Cependant leur importance n'est pas complètement comprise.

L'influence de la mammite sur l'élimination des antibiotiques est un sujet controversé. Certains auteurs ont prouvé que l'élimination des antibiotiques intramammaires était diminuée en cas de mammite (17), alors que d'autres n'ont pas trouvé de différence entre les vaches atteintes de mammite et les vaches saines (25, 26). Bien que cela ne soit pas prouvé scientifiquement, certains auteurs (7) suggèrent qu'une élimination plus lente pourrait être expliquée par une meilleure distribution dans le parenchyme mammaire, une absorption systémique suivie d'une ré-excrétion dans le lait, ou une diminution de la production laitière.

Lors de mammite légère à modérée, une guérison spontanée peut être observée, notamment dans les cas de mammite à coliforme où le pourcentage de guérison après le traitement est similaire à celui sans traitement (1). Cependant certains individus dans les troupeaux ont une infection intra-mammaire chronique sub-clinique et présentent régulièrement des épisodes de mammites cliniques. Devrait-on traiter tous les individus présentant des mammites légères à modérées ? Le choix de traiter doit se faire en gardant le contexte économique en tête. Le traitement, et la perte de lait en résultant, coûtent cher au producteur. Une analyse économique basée sur des données californiennes (27) a montré que, bien que la production laitière et la survie dans le troupeau n'étaient pas différents entre les individus traités et non traités, la proportion de récurrence était plus haute chez les individus non-traités, et notamment pour les cas de mammites à streptocoques. D'autres études (28-30) ont montré des résultats semblables pour les mammites à streptocoques. Le choix de traiter doit donc se faire selon l'agent pathogène en cause et le contexte individuel (stade de lactation, âge, production laitière).

Le choix de l'antibiotique est traditionnellement fait selon le profil de sensibilité de l'agent pathogène isolé. Le sujet a été revu ailleurs (6). En résumé, l'utilité des profils de sensibilité se basant sur les modèles de diffusion sur gélose (modèle dérivé de la médecine humaine) n'est pas établie et est questionnable. En effet la composition du lait de bovin et les profils cinétiques associés sont très différents de ceux du plasma humain, et les agents bactériens humains sont différents des espèces d'intérêt pour la mammite bovine. De plus, les antibiotiques ne sont pas distribués de façon homogène dans le parenchyme mammaire et

l'antibiotique lui-même peut altérer la fonction des neutrophiles et donc diminuer l'élimination des bactéries. Selon l'auteur, le choix de l'antibiotique ne devrait pas se faire que sur le profil de sensibilité, mais aussi selon l'expérience clinique dans le troupeau.

1.2. Caractéristiques du traitement intra-mammaire idéal

L'antibiotique idéal pour le traitement des mammites a été défini en 1980 par 8 points selon des critères théoriques pharmaceutiques (dissolution de la forme active), pharmacocinétiques (absorption, métabolisme, excrétion) et pharmacodynamiques (interaction antibiotique – récepteur – tissu cible) (16) :

- Concentration minimale inhibitrice (CMI) basse pour la majorité des agents pathogènes impliqués dans les mammites
- Haute biodisponibilité à partir des sites d'injection
- Base faible ou faiblement ionisé dans le sérum
- Liposoluble
- Faible degré de liaison aux protéines plasmatiques
- Longue demi-vie dans le corps
- Efficace dans les sécrétions inflammatoires
- Accumulation minimale dans les tissus

Il s'agit de critères idéaux théoriques : aucun antibiotique commercialisé ne répond à tous les critères. De plus ce sont des critères pour un traitement antibiotique, quelque soit la voie d'administration. Comme vu précédemment (1.1.4.), le premier point est discutable, le choix de l'antibiotique ne devrait pas se

faire en se basant uniquement sur le profil de sensibilité. Concernant les antibiotiques spécifiquement intra-mammaires qui sont l'objet de ce mémoire, le deuxième point ne s'applique pas car le site d'injection (*i.e.* le quartier) est l'organe ciblé.

De ces points, la notion de CMI implique la connaissance de l'agent responsable. De plus les critères pharmacologiques (liposolubilité, base faible, liaison aux protéines, demi-vie, efficacité dans les sécrétions inflammatoires et accumulation) nécessitent la connaissance des antibiotiques utilisés. Enfin la notion de longue demi-vie est à l'origine du traitement prolongé. Chacun de ces concepts sera abordé dans les parties suivantes.

2. Méthode de diagnostic des mammites cliniques

L'objectif de la présente section est de présenter les méthodes diagnostiques des mammites cliniques, dans le but de 1) diagnostiquer la mammite sur une base individuelle, 2) choisir le traitement de façon adéquate et 3) pouvoir faire un suivi de la guérison bactériologique. De plus, bien que cela dépasse le cadre du mémoire, la connaissance de l'agent pathogène responsable de la mammite est importante dans le cadre de la gestion de la santé du troupeau. L'implication du diagnostic dans le cadre de la surveillance de la santé du troupeau ne sera pas envisagée.

2.1. Signes cliniques

Par définition, lors de mammite clinique, des modifications évidentes du lait et/ou du quartier sont visibles. On distingue, selon ces signes cliniques, différents types de mammites : légère, modérée ou sévère (parfois appelée aigüe) (31, 32). La

sévérité de ces signes influence fortement le pronostic et le choix du traitement (31, 32). La détection des signes cliniques devrait se faire systématiquement à chaque traite sur une base individuelle, notamment par l'examen des premiers jets de lait et la palpation des quartiers (31, 32).

2.2. Identification des agents pathogènes

Sur une base individuelle il est préférable d'identifier l'agent pathogène responsable des mammites pour pouvoir identifier l'origine, environnementale ou contagieuse, pour choisir un protocole de traitement adéquat pour les mammites, et pour savoir si, une fois guérie cliniquement, l'agent responsable de la mammite a bien disparu (31, 32).

2.2.1. Les différentes méthodes de détection des agents pathogènes

La culture bactériologique est considérée comme le test de référence pour isoler l'agent pathogène responsable de la mammite (31, 32). La culture consiste à ensemencer chaque échantillon sur des géloses Columbia agar supplémentées avec 5% de sang de mouton et des géloses MacConkey. La lecture des résultats est réalisée par un technicien et les colonies sont identifiées par leurs caractéristiques de croissance, morphologie, capacité à faire de l'hémolyse, et aussi par d'autres tests plus spécifiques (test d'oxidase, Triple sugar iron, uréase, citrate, indole et mobilité etc...).

Cependant, jusqu'à 50% des échantillons soumis (mammites cliniques et sub-cliniques confondues) peuvent être négatifs (33). Pour les mammites cliniques spécifiquement, une étude aux États-Unis rapporte une proportion de résultats

négatifs de 27,2% (34), une étude aux Royaume-Unis rapporte une proportion de 26.5% (35) et deux études en Finlande rapportent des proportions de 23.7% (36) et 27.1% (37). Une étude canadienne rapporte une proportion plus élevée de 43.9% (38).

Ces résultats négatifs peuvent être causés par : une élimination spontanée de l'agent pathogène (39, 40), une excrétion cyclique pour les infections chroniques, notamment à *S. aureus* (41), ou une incapacité du test à détecter une faible quantité de bactéries (41). Des modifications du protocole ont été démontrées comme efficaces afin de réduire le nombre d'échantillons négatifs : incubation pré-culture, congélation pré-culture et utilisation de plus grand volume d'inoculation (42, 43).

En plus de la proportion de résultats négatifs, le délai pour l'obtention des résultats est trop long à attendre avant de commencer le traitement, notamment dans le cadre de mammites cliniques modérées à sévères. D'autres méthodes d'identification des agents pathogènes en cause ont été développées telles que 3M Petrifilm, Minnesota Bi-plate et Minnesota Tri-plate. Ces tests reposent sur l'ensemencement à la ferme de gélose contenant un média permettant de distinguer des grandes catégories de bactéries. Les Petrifilms distinguent les bactéries Gram+ des Gram-, et les *S. aureus* des autres bactéries. Les Minnesota Biplates distinguent les bactéries Gram+ des Gram-. Enfin les Minnesota Triplate distinguent les bactéries Gram+, les streptocoques et les bactéries Gram-. La sensibilité et la spécificité de ces tests sont bonnes : la sensibilité variant entre 87.5% et 97,9% (44-46) et la spécificité entre 68,8% et 98,5% (44-46) selon les bactéries et le niveau

technique du manipulateur. Selon les auteurs, l'intérêt de ces méthodes réside dans sa bonne sensibilité ce qui réduit les faux négatifs et augmente donc la valeur prédictive négative du test. Ainsi un individu négatif pourrait ne pas être traité avec des antibiotiques avec une bonne confiance. De plus ces tests sont rapides à faire (résultats en 24 heures), ce qui permet, dans les cas de mammites légères à modérées, d'attendre les résultats avant de choisir le traitement. Cependant, les personnes réalisant le test doivent être entraînées à reconnaître un résultat positif ou négatif (44-46). Par contre, ces tests ne sont pas capables d'identifier les échantillons contaminés. La technique de prise d'échantillon doit donc être faite le plus aseptiquement possible pour éviter des résultats positifs à cause de la contamination (44-46).

Pour palier à la forte proportion de résultats négatifs à la culture bactériologique, les méthodes moléculaires comme la Polymerase Chain Reaction (PCR) ont été étudiées. Une étude (47) a comparé l'examen bactériologique conventionnel et la PCR pour les mammites cliniques et sub-cliniques. Pour les mammites cliniques, la bactériologie conventionnelle identifie la présence d'une bactérie dans 600 des 780 échantillons, et la PCR dans 691 des 780 échantillons. Cela inclut 53 échantillons négatifs à la culture mais positifs à la PCR pour *S. aureus*. Une autre étude (48) rapporte que 43% (34/79) des échantillons provenant de mammites cliniques étaient négatifs à la bactériologie conventionnelle mais positifs à la PCR. Des échantillons considérés non contaminés à la bactériologie conventionnelle peuvent être considérés comme contaminés par la PCR. D'après les

auteurs, la PCR pourrait être intéressante lorsque la bactériologie conventionnelle est négative.

Le test idéal aurait une sensibilité et une spécificité de 100%. Cependant ce test n'existe pas, il est donc important de balancer l'utilisation de méthode sensible versus le coût de l'intervention. Le choix de la méthode utilisée devrait être déterminé pour chaque élevage en se basant sur les objectifs du troupeau.

Après avoir identifié la présence d'une bactérie dans le lait, il faut déterminer si elle peut être responsable de l'infection. C'est ce que l'on appelle les critères d'infections.

2.2.2. Critères d'infection

Peu de détails sur les critères d'infection sont trouvés dans la littérature, les auteurs référant généralement aux critères du National Mastitis Council (NMC) (Laboratory and Field Handbook on Bovine Mastitis, NMC, 1987) sans préciser quelles sont leurs décisions dans les cas non couverts par le NMC. Les critères demandés en recherche pour considérer un quartier infecté sont : deux sur trois cultures consécutives positives, une culture d'un même agent pathogène dans des échantillons en duplicata ou une culture positive associées à des signes d'infection compatibles (CCS élevé, altération du lait et du quartier) (31, 32). Un consensus récent a été établi (49). Un quartier est considéré comme infecté, indépendamment de la présence d'inflammation, si un agent pathogène est isolé avec au moins 10 colonies (1000 cfu/mL) et si l'agent pathogène est isolé au moins 2 fois sur une période de 3 semaines.

En se basant sur ce consensus comme méthode de référence, des chercheurs américains et canadien ont évalué les sensibilités et spécificités de différents critères d'infection (50). Les paramètres entrant dans les différents critères d'infection étaient le nombre de colonies à la culture bactérienne, la présence de plusieurs agents pathogènes dans le même échantillon (culture mixte ou pure) et le CCS. La conclusion des auteurs est que le choix de la définition d'infection dépend des objectifs de l'étude ou du programme de contrôle de mammite dans lequel les échantillons seront utilisés.

En pratique, un seul échantillon positif associé à la présence de signes cliniques est souvent considéré comme suffisant (31, 32). La valeur prédictive positive du résultat est plus grande lorsqu'un seul agent pathogène est isolé. Il est généralement accepté que l'échantillon est contaminé si plus de deux agents pathogènes sont isolés (31).

Une fois la bactérie responsable isolée, le choix du traitement peut se faire. Dans le cadre des mammites cliniques non sévères, l'utilisation de méthodes d'identification à la ferme, permet de faire le diagnostic et de traiter de façon adéquate si on attend 24h les résultats.

2.2.3. Critères de guérison

La résolution des signes cliniques n'est pas synonyme de guérison bactériologique et vice versa. Les signes cliniques peuvent persister après l'élimination de l'agent pathogène, alors que l'infection peut persister après à la disparition des signes cliniques (31). Bien que le diagnostic de mammite clinique

soit, par définition, clinique, l'identification de l'agent pathogène responsable de la mammite clinique est fondamental afin de choisir le traitement approprié et suivre la guérison bactériologique. De même que pour les critères d'infection, il n'existe pas de consensus pour les critères de guérison. En pratique, le retour à un lait et un quartier d'apparence normal est souvent utilisé comme critère de guérison. En recherche, un suivi après le traitement est souvent réalisé, mais la période d'observation est très variable. Dans les articles présentés par la suite, la période de suivi post-traitement était d'environ 21 jours (14 à 28 jours). Certains auteurs (51, 52) suggèrent d'utiliser des marqueurs d'inflammation du quartier (CCS et N-acetyl- β -glucosaminidase) pour prédire la guérison bactériologique de mammite clinique. L'évaluation seule de ces marqueurs à 2 ou 4 semaines après le traitement ne permet pas de prédire adéquatement la guérison bactériologique. Les auteurs (51, 52) suggèrent donc d'évaluer les marqueurs d'inflammation et de réaliser un examen bactériologique pour obtenir de meilleurs résultats.

3. Le traitement prolongé

3.1. Concepts pharmacologiques

3.1.1. Historique du traitement prolongé

La première étude proposant d'augmenter le nombre de jours de traitement date de 1952 (53). Dans cette étude, Wilson teste différents dosages (20 000 à 300 000 unités), différentes formes chimiques (solution aqueuse ou suspension à base d'huile végétale ou minérale) et différentes durées de traitement (entre 1 et 3 jours). La conclusion de l'auteur concernant la posologie des traitements intra-mammaires à base de pénicilline est qu'il vaut mieux augmenter la durée du traitement

qu'augmenter la dose. Pour augmenter la durée du traitement, deux solutions sont possibles, soit augmenter le nombre de jours de traitement ou choisir des produits ayant une longue action. Bien que cette étude ne soit pas scientifiquement valide (pas d'analyse statistique ni une réelle rigueur de comparaison : les groupes varient pour plus de deux paramètres d'intérêt, comme par exemple, la dose et la forme chimique), les études ultérieures sur le traitement prolongé citent cette référence comme point de départ pour justifier le traitement prolongé.

Cette idée est reprise par la suite par différents auteurs jusqu'à ce que tous les résultats soient compilés en une seule revue de littérature (16). Les critères d'utilisation raisonnée pour les antibiotiques parentéraux et intra-mammaires y sont détaillés. Concernant le traitement prolongé, un seul point est intéressant (les autres sont discutés dans la partie V) : la longue demi-vie. Par définition, le temps de demi-vie est le temps nécessaire à l'élimination de 50% de l'antibiotique, donc plus le temps de demi-vie est long, plus la durée d'action est longue. D'après Ziv, pour qu'un antibiotique soit efficace, il faut, entre autre, que sa durée d'action soit longue, soit en augmentant le temps d'action, soit en augmentant le nombre de jour de traitement (16). L'objectif est de traiter le plus rapidement possible, avec un antibiotique adapté aux agents pathogènes et suffisamment longtemps pour éliminer les agents pathogènes (16). Ce dernier point est à la base de l'idée du traitement prolongé. La validation scientifique de ces hypothèses viendra par la suite et sera développé dans la dernière partie de cette revue de littérature.

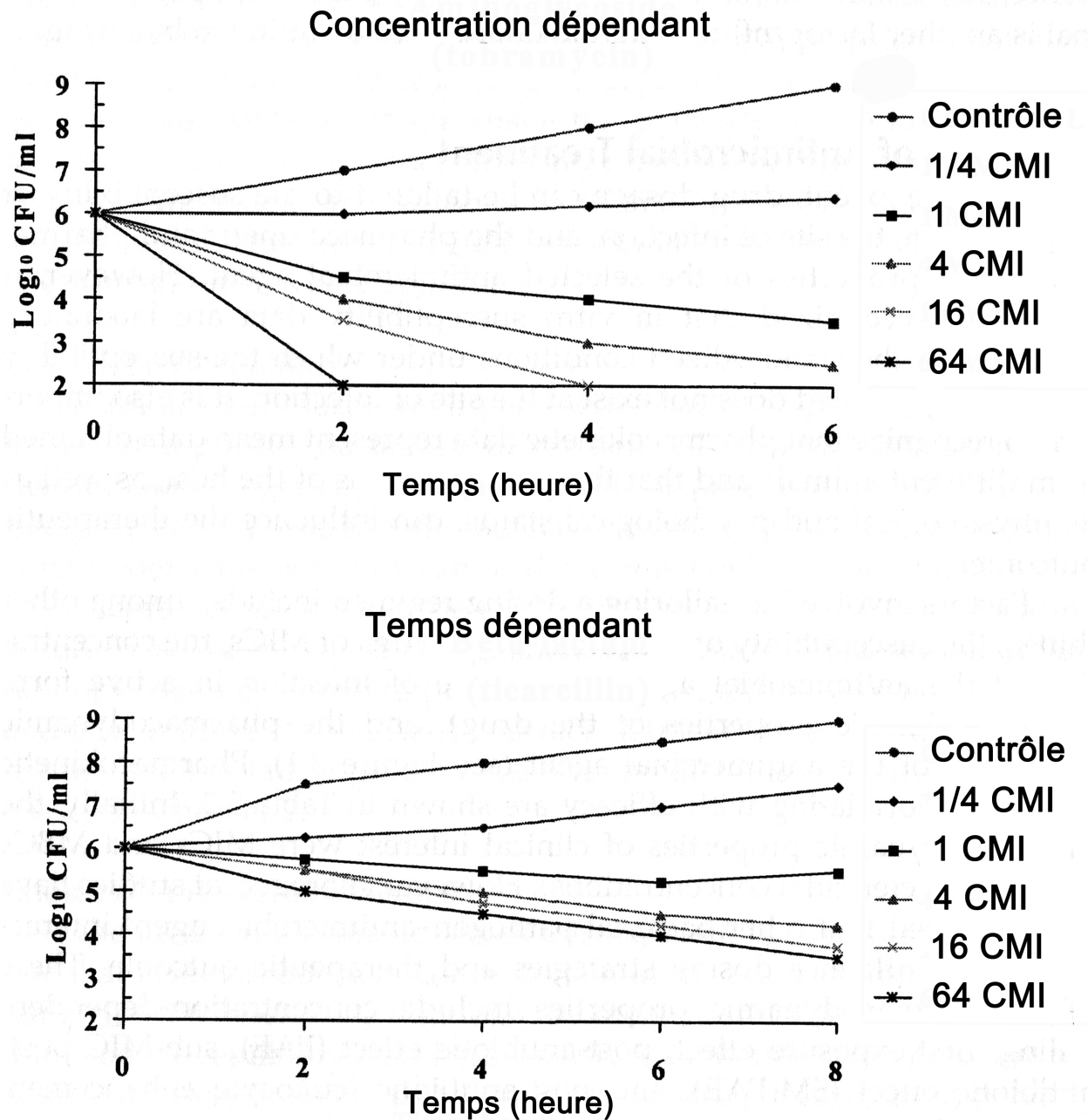
3.1.2. Bases scientifiques

Le principe des antibiotiques temps-dépendants est derrière la notion de traitement prolongé. Par définition, un antibiotique temps-dépendant est un antibiotique dont l'effet contre les bactéries est dépendant du temps de contact entre l'antibiotique et les bactéries quand la concentration est supérieure à la CMI. Le pic de concentration obtenu lors de l'administration n'a pas d'effet sur l'efficacité de l'antibiotique (54). À l'inverse, les antibiotiques concentration-dépendants ont un effet contre les bactéries qui dépend de la concentration maximale obtenue, mais aussi du temps. L'effet est directement proportionnel à l'aire sous la courbe de concentration en fonction du temps (54). Tous les antibiotiques intra-mammaires actuellement commercialisés au Canada pour le traitement des mammites sont des antibiotiques temps-dépendants.

Leur effet sur les bactéries est représenté par la figure 1. Pour les antibiotiques concentration-dépendants, plus la concentration est élevée plus l'antibiotique est efficace, c'est-à-dire plus la concentration en bactérie dans le milieu (exprimé en logCFU/mL) diminue rapidement; pour les antibiotiques temps-dépendants, la concentration ne change pas l'efficacité, par contre plus le temps de contact est long, plus la concentration en bactérie diminue.

Figure 1. Effet d'un antibiotique concentration-dépendant (aminoglycoside) et temps-dépendant (bêta-lactame) sur la concentration de bactéries *in vitro*.

Adaptée de Prescott et coll., 2000 (54).



Une fois dans le quartier, l'antibiotique diffuse puis est éliminé dans le sang ou dans le lait au moment de la traite (7). Tant que la concentration est supérieure à la CMI, l'antibiotique est efficace. En théorie, lors de traitement prolongé, l'antibiotique est efficace pendant plus longtemps que pour une thérapie normale. On devrait donc observer un pourcentage de guérison plus élevé (53).

3.2. Limites du traitement prolongé

3.2.1. Nouvelles infections intra-mammaires

Certains auteurs ont observé jusqu'à 28 jours après le traitement des infections intra-mammaires par un agent pathogène différent de celui initialement isolé. Ces infections ont été appelées nouvelles infections intra-mammaires (NIIM). Ces nouvelles infections peuvent être accompagnées de signes cliniques ou être sub-cliniques. La proportion de nouveaux cas de mammites dans les différentes études sur le traitement prolongé est rapportée dans le tableau 1.

Tableau 1. Incidence rapportée de nouvelles infections intra-mammaires (NIIM) dans les groupes contrôles versus groupes de traitement selon les différentes études sur le traitement prolongé intra-mammaire.

Étude	NIIM contrôle (%)	NIIM traitement (%)	Mortalité groupe contrôle (%)	Mortalité groupe traitement (%)
Gillepsie et coll., 2002 ¹ (55)	3,6	15,5	0	20
Deluyker et coll., 2005 ² (56)	1,8	5,2	0	0
Middleton et Luby, 2008 ² (57)	-. ³	26,1	-. ³	16,7
Munoz et coll., 2009 ² (58)	-. ³	89	-. ³	12,5
Roy et coll., 2009 ² (59)	0	12,9	0	0

¹: mammites sub-cliniques ou cliniques

²: mammites cliniques

³: pas de groupe contrôle.

Les 4 premières études de ce tableau (55-58) ont été réalisées en été et avec un traitement à base de pirlimycine. Les agents pathogènes isolés sont environnementaux et de type coliforme (*Escherichia coli* (*E. coli*) et *Klebsiella* spp.). Les facteurs de risque proposés par les auteurs sont : la température, l'altération du canal du trayon due au traitement, l'état de propreté des locaux, la modification du comportement des vaches par temps chaud et le traitement prolongé. À noter que l'antibiotique utilisé dans ce cas n'a pas de spectre pour les bactéries à Gram-, qui sont les bactéries impliquées dans ces cas de NIIM (54).

Une des études rapportée (58) a comparé les agents pathogènes isolés des nouveaux cas de mammites aux agents pathogènes isolés sur les seringues utilisées. Les bactéries isolées dans les deux cas étaient comparables. De plus, il n'y avait pas de preuve de contamination des seringues non utilisées. Les auteurs pensent qu'une mauvaise manipulation et une mauvaise hygiène pourrait être à l'origine des NIIM.

La dernière étude rapportée (59) porte sur la céphapirine. Les nouvelles infections rapportées étaient toutes causées par des levures; 3 des 4 mammites étaient modérées, 1 sur 4 était sévère. Le facteur de risque principal rapporté par les auteurs est la technique d'infusion.

Les NIIM doivent être prises en compte et expliquées au producteur avant de commencer un traitement prolongé, quelle que soit la molécule utilisée. Il est important de s'assurer que le producteur réalise les infusions intra-mammaires le plus aseptiquement possible.

3.2.2. Risque de résidus

À ce jour aucune étude n'a exploré la cinétique d'élimination des antibiotiques intra-mammaires après un traitement prolongé. D'après les données fournies par Pfizer® pour notre étude (données non publiées), un temps d'attente après le dernier traitement de 4 jours pour le lait, et aucun pour la viande, est adéquat pour un traitement prolongé de 8 jours. Ce temps d'attente est le même que pour le traitement standard de 2 jours. La publication de données internes ou plus de travail est nécessaire afin de pouvoir déterminer les temps d'attente pour les traitements prolongés.

3.2.3. Coût des traitements

Le prix du traitement prolongé est plus élevé qu'un traitement standard (60, 61). En plus du coût supplémentaire pour l'antibiotique, la période d'attente pour le lait est plus longue. Une étude (61) s'est intéressée au coût de différentes modalités de traitement pour les mammites cliniques. Seules les premiers cas de mammites cliniques de vaches en début de lactation (moins de 30 jours en lait) ont été considérés. Les données économiques utilisées pour l'étude sont ceux de l'état du Wisconsin. Les critères suivants ont été considérés : coût du diagnostic (utilisation de tests à la ferme et examens bactériologiques du lait), coût du traitement et du travail supplémentaire associé, coût du lait jeté, coût de la diminution de production associée aux mammites cliniques et sub-cliniques, réforme après 3 traitements inefficaces, risque de transmission (seulement pour *S. aureus*), pourcentage de guérison bactériologique et risque de récurrence. Plusieurs scénarios sont comparés : utilisation de tests diagnostics à la ferme ou pas, associé avec un traitement

(prolongé versus standard) ou pas. Trois scénarios d'infection étaient envisagés : infections à Gram+, infections à Gram- et pas de bactérie isolée. Le scénario le plus économiquement rentable était de traiter les infections à Gram+ avec un traitement standard et de ne pas traiter les autres cas de mammites. L'utilisation du traitement prolongé était associée avec les plus grandes pertes économiques. L'extrapolation de ces résultats aux animaux du Québec serait biaisée, en effet le coût du lait et des vaches, ainsi que le niveau de production des vaches québécoises sont différents.

Une étude s'est intéressée au coût réel du traitement prolongé dans le cadre des mammites sub-cliniques causées par *Str. uberis* et *Streptococcus dysgalactiae* (*Str. dysgalactiae*) aux Pays-Bas (60). De multiples facteurs ont été pris en compte : pourcentage de guérison, risque de transmission, impact sur la production laitière suite aux guérisons (estimé à 0 pour ces mammites dans cette étude), impact sur la prévention de mammites cliniques, réformes, pénalités due à un CCS élevées, baisse de fertilité, coût de l'antibiotique et du lait jeté, coût de la main-d'œuvre supplémentaire. La conclusion des auteurs est que le traitement prolongé devrait être réservé aux animaux de grande valeur et dans les cas de mammites chroniques. Ils rapportent aussi que le traitement prolongé serait valable si le coût du diagnostic et du traitement était inférieur à 50 euros, ce qui est bien en dessous du prix de l'antibiotique seul. De plus les caractéristiques des troupeaux et le coût individuel des vaches varient selon les pays. Cette analyse est viable aux Pays-Bas où l'étude a été réalisée, mais la conclusion ne serait peut être pas la même avec une autre population. Par exemple, au Québec où le coût d'un individu est plus élevé, l'impact du pourcentage de réforme serait peut être plus important.

Un traitement à base de ceftiofur pour 8 jours de traitement aurait coûté environ 415\$ en 2008 au Québec: 145\$ pour les coûts d'antibiotique plus 270\$ pour les pertes de lait (12 jours de temps de retrait, pour une vache moyenne produisant 30kg de lait, et pour un prix de 0,75\$ par litre de lait). De la même façon, un traitement à base de pirlimycine aurait coûté environ 415\$: 170\$ pour les coûts d'antibiotiques et 225\$ de perte de lait (10 jours de temps de retrait pour une vache produisant moyenne 30kg de lait, et pour un prix de 0,75\$ par litre de lait).

Le coût des traitements prolongés doit être pris en compte et expliqué au producteur avant de commencer un protocole de traitement prolongé. À cause de son coût, le traitement prolongé est indiqué pour certaines vaches spécifiques dans les élevages. Plus de travail est nécessaire afin d'évaluer le coût réel du traitement prolongé dans le cadre des mammites cliniques légères à modérées dans la réalité économique québécoise.

4. Ceftiofur et mammites

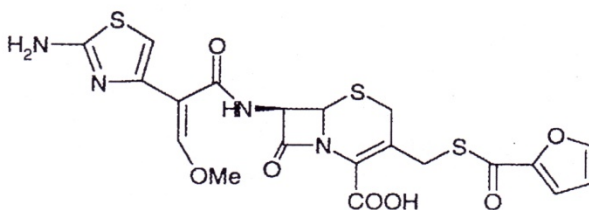
L'objectif de ce paragraphe est de rappeler la pharmacocinétique et la pharmacodynamique du ceftiofur afin de justifier son utilisation dans le cadre d'un traitement prolongé. Beaucoup de données concernant le métabolisme et la pharmacologie du ceftiofur ne sont pas publiées, mais ont été étudiées par certaines compagnies pharmaceutiques (notamment The Upjohn Co., Pharmacia Corp. et Pharmacia & Upjohn Co. qui ont été rachetées par Pfizer). Ces données ont été résumées dans un revue de littérature (62) écrit par M. Hornish de Pharmacia Corp., mais les études originales ne sont pas publiées. Par la suite, les données originales

seront citées lorsque disponibles, sinon la revue de littérature sera citée. En ce qui concerne l'utilisation homologuée du ceftiofur, les notices des produits à base de ceftiofur seront utilisées en absence d'autres sources disponibles.

4.1. Propriétés physico-chimiques

Le ceftiofur, comme les autres céphalosporines, est un dérivé semi-synthétique de la céphalosporine C. Il appartient à la famille des céphalosporines de troisième génération. Sa structure est représentée dans la figure 2. Le ceftiofur contient un cycle β -lactame qui est responsable de son activité antimicrobienne. Il existe sous deux formes de sel : sodique (forme acide) et chlorhydrate (forme alcaline); et une forme amphotère peu soluble (62).

Figure 2. Molécule de ceftiofur. Adaptée de Hornish et coll., 2002 (62).

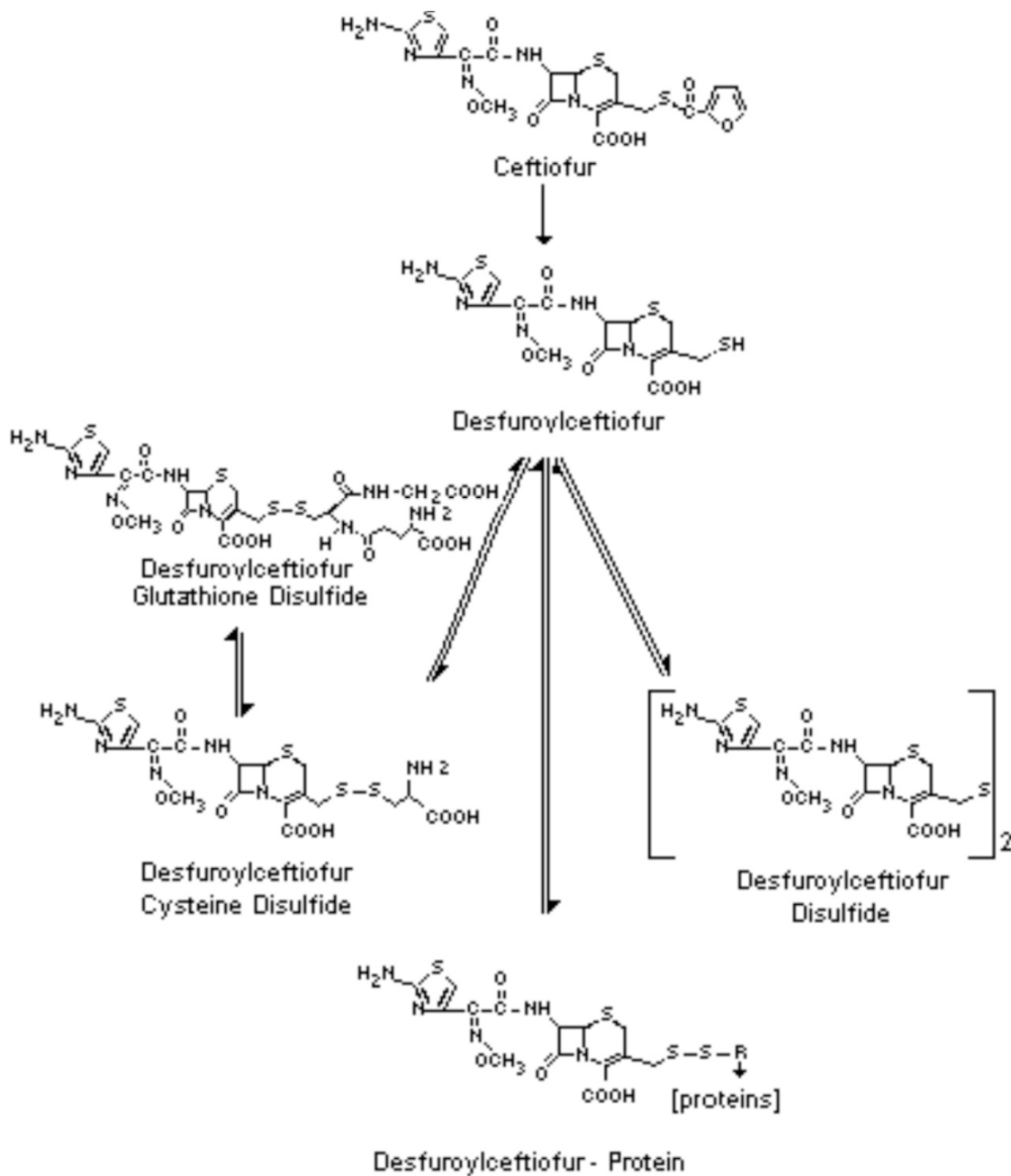


4.2. Métabolisme

Lorsque administré par voie systémique, le ceftiofur est rapidement métabolisé en desfuroylceftiofur (DFC) par métabolisme hépatique (54, 62). La représentation du métabolisme du ceftiofur est résumée dans la figure 3. Le DFC est par la suite conjugué ou lié à d'autres molécules mais il est encore actif car le cycle β -lactame n'est pas modifié. Ces conjugaisons augmentent le temps de demi-vie du

ceftiofur. Par la suite le DFC est hydrolysé en molécules polaires non actives par clivage du cycle β -lactame (54, 62).

Figure 3. Métabolisme du ceftiofur. Adaptée de Hornish et coll., 2002 (62).



Le ceftiofur est excrété dans les fèces sous forme polaire inactive et dans l'urine majoritairement sous forme active (85% de DFC, 5% de ceftiofur et 10% de forme polaire inactive). Cependant, le ceftiofur est instable dans l'environnement et il est rapidement inactivé dans le sol par les bactéries et par la lumière (62).

Le ceftiofur administré par voie systémique est peu excrété dans le lait. Lors d'administration de ceftiofur par voie parentérale, seulement 0,1% de la dose est excrétée dans le lait et la majeure partie des résidus est liée à des protéines. La molécule de ceftiofur non transformée n'est pas retrouvée dans le lait (63).

4.3. Pharmacocinétique

Des études réalisées chez les bovins ont montré la même pharmacocinétique dans le sang des deux formes de sel de ceftiofur (acide et alcaline) (62). Les auteurs pensent donc que les effets thérapeutiques et l'innocuité sont les mêmes pour ces deux formulations (62). Aux posologies homologuées, la concentration de ceftiofur dans les tissus est inférieure aux limites maximales tolérées de résidus (notice Spectramast® LC et notice Excenel® RTU). Les temps d'attente pour la viande et le lait sont donc de 0 jour (Hornish et coll., 2002, notice Excenel® RTU) par voie systémique et 0 et 4 jours, pour la viande et le lait respectivement, par voie intramammaire (notice Spectramast® LC).

Deux études (22, 64) ont exploré la cinétique du ceftiofur et de ses dérivés dans le lait après des administrations intra-mammaires de 100mg, 200mg et 300mg de ceftiofur. Que ce soit pour le ceftiofur ou ses dérivés, une diminution rapide de la concentration dans le lait est observée suivi d'un palier. Pour la dose de 300mg (22),

le temps d'attente conseillé pour le lait est de 7 jours. Cette même étude a montré une corrélation positive entre la production laitière et la vitesse d'élimination du ceftiofur. Les auteurs de cette étude recommandent donc d'augmenter le temps d'attente pour le lait si les animaux traités produisent peu de lait. Pour la dose de 100mg (64), le temps d'attente recommandé pour le lait est de 1 jour. Pour la dose de 200mg (64), le temps d'attente recommandé n'a pas été calculé. Dans le produit commercial homologué au Canada pour les administrations intra-mammaires de ceftiofur, la dose est de 125mg, et le temps d'attente est de 4 jours.

Une de ces deux études (64) a montré que la concentration dans le parenchyme mammaire profond après deux administrations intra-mammaire, à 24 heures d'intervalle, de 200mg de ceftiofur atteignait des concentrations supérieures comparées à une injection intra-mammaire ou à deux injections intra-musculaires de 500mg de ceftiofur à 24 heures d'intervalle. Cette observation était aussi accompagnée d'une diminution plus marquée du nombre de *S. aureus* dans le quartier. La conclusion des auteurs est qu'un traitement répété est nécessaire pour augmenter les chances de guérison bactériologique.

4.4. Mode d'action

L'action antimicrobienne du ceftiofur provient de son cycle β -lactame. Son mode d'action est similaire aux autres antibiotiques de la famille des β -lactamines. Il se fixe sur des protéines de liaison pour empêcher la synthèse de la paroi bactérienne (54, 62).

Son spectre spécifique est large et couvre à la fois les bactéries à Gram- (*Pasteurella* spp, *Mannheimia* spp., *Actinobacillus* spp., *Haemophilus* spp., *Salmonella* spp., et *E. coli*) et à Gram+ (staphylocoques coagulase négatif (SCN), streptocoques). Son spectre spécifique provient du groupement oxyimino-aminothiazolyl et du groupement thioester acide furoïque situés sur l'acide nucléique du ceftiofur (65). Les valeurs de concentration minimale inhibitrice du ceftiofur pour les bactéries à Gram+ et à Gram- sont résumées dans le tableau 2.

Tableau 2. Concentrations minimales inhibitrices (CMI) du ceftiofur pour les bactéries à Gram+ et à Gram-. Adapté de Yancey et coll., 1987 (65).

Organismes	Intervalle CMI ¹	CMI ₅₀ ²	CMI ₉₀ ³	
Gram -	<i>Pasteurella haemolitica</i>	≤0,06	≤0,06	≤0,06
	<i>Pasteurella. multocida</i>	≤0,06	≤0,06	≤0,06
	<i>Histophilus somni</i>	≤0,06-0,13	≤0,06	≤0,06
	<i>Histophilus pleuropneumoniae</i>	≤0,06	≤0,06	≤0,06
	<i>Escherichia coli</i>	0,25	0,25	0,25
	<i>Salmonella choleraesuis</i>	1-2	ND ⁴	ND
	<i>Salmonella typhmurium</i>	0,25-1,0	0,5	1,0
	<i>Bordetella bronchiseptica</i>	>32	>32	>32
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16-64	ND	ND
Gram +	<i>Corynebacterium pyogènes</i>	≤0,06	ND	ND
	<i>Staphylococcus aureus</i>	0,5->32	1,0	32
	<i>Streptococcus agalactiae</i>	≤0,06	≤0,06	≤0,06
	<i>Streptococcus bovis</i>	≤0,06	ND	ND
	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	≤0,06	≤0,06	≤0,06
	<i>Streptococcus faecalis</i>	0,5->32	2	>32
	<i>Streptococcus suis type II</i>	≤0,06-0,15	≤0,06	≤0,06
	<i>Streptococcus uberis</i>	≤0,06-0,13	≤0,06	0,13

¹ Lorsqu'une seule valeur de CMI est notée, tous les isolats avaient cette CMI

² CMI₅₀ : CMI inhibant 50% des souches testées

³ CMI₉₀ : CMI inhibant 90% des souches testées

⁴ ND : non déterminée.

Au Canada, le ceftiofur est homologué pour le traitement de la mammites clinique causée par *E. coli*, *Str. dysgalactiae* et les SCN, et pour le traitement au tarissement des mammites sub-cliniques à *S. aureus*, *Str. dysgalactiae* et *Str. uberis*. Le ceftiofur est aussi homologué pour le traitement de maladies respiratoires bovines associées à *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida* et *Histophilus somni*, pour le traitement de la nécrobacillose interdigitée (piétin, pododermatite) associée à *Fusobacterium necrophorum* et *Prevotella melaninogenicus*, et pour le traitement de la métrite aiguë post-partum causée par *Arcanobacterium pyogenes*, *E. coli* et *Fusobacterium necrophorum* (notice Spectramast LC® et Excenel® RTU).

Pour les mammites, la posologie homologuée est une infusion intramammaire de 125 mg par quartier infecté, une fois par jour, pendant 2 jours. Le Spectramast LC® contient 125mg de ceftiofur par seringue de 10mL (notice Spectramast LC®).

Pour les maladies respiratoires et pour la nécrobacillose interdigitée la posologie homologuée est de 1mg/kg une fois par jour pendant 3 jours. Le traitement peut être prolongé jusqu'à 5 jours. Pour le traitement de la métrite aiguë post-partum, la posologie homologuée est de 2,2 mg/kg une fois par jour pour 5 jours. L'Excenel® RTU contient 50mg de ceftiofur par mL (notice Excenel® RTU).

4.5. Le ceftiofur, l'antibiotique idéal ?

Le ceftiofur répond-t-il au critère d'antibiotique idéal tel que défini par Ziv (16) ?

- CMI basse pour la majorité des agents pathogènes impliqués dans les mammites ? Comme vu précédemment la CMI est basse pour les agents pathogènes impliqués dans le cas de mammites. Aucune donnée n'est par contre publiée concernant la concentration intra-mammaire obtenue après 2 jours ou 8 jours de traitement à base de ceftiofur.

- Haute biodisponibilité à partir des sites d'injection ? Comme vu précédemment, ce point ne s'applique pas pour les infusions intra-mammaires car l'antibiotique est déjà disponible pour le quartier.

- Base faible ou faiblement ionisé dans le sérum ? Le ceftiofur tel que commercialisé est sous forme de base faible (notice Spectramast LC®). Aucune donnée n'est publiée concernant son état de ionisation dans le sérum et dans le lait.

- Liposoluble. Aucune donnée n'est publiée concernant la liposolubilité du ceftiofur.

- Faible degré aux protéines plasmatiques ? Le ceftiofur, ainsi que le DFC, sont liés aux protéines plasmatiques (54).

- Longue demi-vie dans l'organisme ? Bien que le temps de demi-vie ne soit pas long, le traitement prolongé augmente le temps de contact entre l'antibiotique et les bactéries, ce qui est similaire à un grand temps de demie-vie.

- Efficace dans les sécrétions inflammatoires ? Aucune donnée n'a été publiée concernant la capacité du ceftiofur à rester efficace dans les sécrétions inflammatoires.

- Accumulation minimale dans les tissus ? Aucune donnée n'est publiée concernant l'accumulation dans les tissus. Cependant, pour l'homologation du

produit, ces données ont dues être fournies. Un temps d'attente de 4 jours pour le lait, et aucun pour la viande, est imposé après le traitement homologué de 2 jours pour le Spectramast® LC. D'après les données fournies par Pfizer® pour notre étude (données non publiées), un temps d'attente de 4 jours pour le lait, et aucun pour la viande, après le dernier traitement est adéquat pour un traitement prolongé de 8 jours. L'accumulation dans les tissus est sans doute minimale.

Le ceftiofur semble donc théoriquement être un antibiotique répondant à plusieurs points de l'antibiotique idéal. Plus de travail est nécessaire pour comprendre la distribution de l'antibiotique dans le parenchyme mammaire. Le traitement prolongé à base de ceftiofur a été rapporté pour les mammites sub-cliniques et les mammites cliniques expérimentales à *Str. uberis*. Dans la prochaine partie les études d'efficacité sur le traitement prolongé seront rapportées en mettant l'emphase sur le traitement des mammites cliniques.

5. Résultats des études d'efficacité clinique du traitement prolongé

5.1. Efficacité contre les mammites cliniques

Seules trois études (66-68) ont exploré l'efficacité du traitement prolongé contre les mammites cliniques. Le nombre de cas et de jours de traitement, ainsi que les principales espèces bactériennes et les antibiotiques étudiés sont résumés dans le tableau 3. Toutes ont été faites à partir de modèles d'infections expérimentales. Le principe de ces 3 études consiste à infuser une quantité donnée d'un agent pathogène. Dans ces études, l'agent pathogène étudié est *Str. uberis*. Par contre la souche utilisée et la dose infectante sont différentes d'une étude à l'autre. Dans les

études de Oliver (66, 67), la souche est UT888, alors que la souche utilisée dans l'étude de Hilerton et Kliem (68) est 0140J. La dose infectante était de 1000 (68) à 5000 (66, 67) CFU total. Les antibiotiques testés sont aussi tous différents entre les études : ceftiofur (66), pirlimycine (67) et association penethamate, dihydrostreptomycine et framycetin (68). Le nombre d'animaux inclus dans l'étude, le nombre de jours de traitement ainsi que les résultats sont résumés dans le tableau 3. Les définitions de guérison se faisaient à 21 jours ou 28 jours post-traitement. Un seul échantillon était analysé pour chaque prélèvement et aucune information détaillée concernant les normes utilisées pour les évaluations bactériologiques n'est fournie dans ces études.

Les protocoles étant différents les uns des autres, il est difficile de comparer les études entre elles. Par contre dans toutes ces études, le traitement prolongé a augmenté le pourcentage de guérison bactériologique pour certaines infections à *Str. uberis*. Aucune étude n'a exploré le traitement prolongé pour les mammites cliniques naturelles.

5.2. Autres études sur le traitement prolongé

Un nombre plus important d'études ont exploré l'efficacité du traitement prolongé pour les mammites sub-cliniques. Contrairement aux études sur les mammites cliniques, l'efficacité du traitement prolongé a été étudiée sur des mammites sub-cliniques naturelles. Le nombre de cas et de jours de traitement, ainsi que les principales espèces bactériennes et les antibiotiques étudiés sont résumés dans le tableau 4.

Comme pour les traitements des mammites cliniques, le protocole (le nombre de jours de suivi, le nombre de jour de traitement, les antibiotiques utilisés) étant différent d'une étude à l'autre, il est difficile de comparer les résultats entre eux. Par contre, le traitement prolongé augmente dans toutes ces études, le pourcentage de guérison bactériologique pour les mammites sub-cliniques. Comme discuté auparavant ces données ne sont pas extrapolable aux mammites cliniques.

Tableau 3. Études sur le traitement prolongé pour les mammites cliniques

Étude	Antibiotique	Bactéries	Groupe contrôle		Groupe traitement prolongé	
			Durée du traitement (jours)	Pourcentage de guérison (%)	Durée du traitement (jours)	Pourcentage de guérison (%)
Hillerton et Kliem, 2002 (68)	Penethamate, Dihydrostreptomycine, Framycetine	<i>Str. uberis</i>	3 (n = 10)	70	6 (n = 10)	100
Oliver et coll., 2003 (67)	Pirlimycine	<i>Str. uberis</i>	2 (n = 31)	58	5 (n = 32)	69
Oliver et coll., 2003 (67)	Pirlimycine	<i>Str. uberis</i>	2 (n = 31)	58	8 (n = 40)	80
Oliver et coll., 2004a (66)	Ceftiofur	<i>Str. uberis</i>	2 (n = 7)	43	5 (n = 16)	88
Oliver et coll., 2004a (66)	Ceftiofur	<i>Str. uberis</i>	2 (n = 7)	43	8 (n = 14)	100

Tableau 4. Études sur le traitement prolongé pour les mammites sub-cliniques.

Étude	Antibiotique	Bacteries	Groupe contrôle		Groupe traitement prolongé		Groupe traitement prolongé		
			Durée du traitement (jours)	Pourcentage de guérison (%)	Durée du traitement (jours)	Pourcentage de guérison (%)	Durée du traitement (jours)	Pourcentage de guérison (%)	
Deluyker et coll., 2001 (69)	Pirlimycine	<i>S. aureus</i>	2 (n = N/A)	25			8 (n = N/A)	51	
		<i>Str. dysgalactiae</i>		69				100	
		<i>Str. uberis</i>		21				75	
		<i>Str. agalactiae</i>		55				94	
		Total		34				60	
Gillespie et coll., 2002 (55)	Pirlimycine	<i>Str. uberis</i>	2 (n = 36)	50	5 (n = 36)		8 (n = 20)	100	
		<i>Str. dysgalactiae</i>		100				83	100
		<i>Str. spp.</i>		67				83	100
		<i>S. aureus</i>		13				85	83
Taponen et coll., 2003 (70)	Pénicilline G (IM) + Pénicilline / néomycine (IMM)	<i>S. aureus</i> pénicilline résistant					5 (n = 7)	29	
	Amoxicilline/ acide clavulanique (IM and IMM)	<i>S. aureus</i> pénicilline susceptible					5 (n = 65)	76	
Oliver et coll., 2004 (71)	Ceftiofur	<i>S. aureus</i>	2 (n = 49)	7	5 (n = 41)		8 (n = 38)	36	
		<i>Str. uberis</i>		17				56	67
		<i>Str. spp.</i>		50				67	78
		Total		39				54	66
Deluyker et coll., 2005 (56)	Pirlimycine	<i>S. aureus</i>	2 (n = 164)	56			8 (n = 130)	86	
		<i>Str. uberis</i>		72				95	
		Other strep.		81				99	
Roy et coll., 2009 (59)	Céphapirine	<i>S. aureus</i>	0 (n = 44)	4			5 (n = 33)	39	

Conclusion de la revue de littérature

Le traitement prolongé semble être une piste prometteuse pour augmenter l'efficacité des traitements intra-mammaires pour la mammites clinique. Cependant, beaucoup de travail reste à faire dans ce domaine. Les connaissances concernant l'efficacité des antibiotiques intra-mammaires ne sont pas complètes, l'efficacité du traitement prolongé n'a pas été évaluée pour certains antibiotiques, et pour d'autres, les connaissances ne concernent qu'un certain type de mammites. De plus, il serait intéressant d'évaluer dans quelles circonstances l'augmentation de l'efficacité devient rentable pour un élevage. Le risque de résidus devra aussi être exploré avant de pouvoir utiliser le traitement prolongé de façon plus intensive.

Le traitement prolongé à base de ceftiofur a été montré comme plus efficace que le traitement standard pour les mammites sub-cliniques et les mammites cliniques expérimentales à *Str. uberis*. Notre étude vient compléter ces connaissances pour les mammites cliniques naturelles légères à modérées.

Méthodologie

Calcul du nombre d'animaux

Pour le calcul du nombre d'animaux nécessaires à la réalisation de l'étude, une estimation de la proportion de chacun des agents pathogènes rencontrés lors de mammites cliniques a été effectuée. Les prévalences attendues étaient de 15% pour les mammites causées par des coliformes, 10% pour les mammites causées par des streptocoques, 15% pour les mammites causées par *S. aureus* et 20% pour les mammites causées par SCN. D'après les articles publiés pour le traitement à base de ceftiofur (66, 71), les différences de pourcentage de guérison attendues, entre le traitement prolongé et le traitement standard, étaient de 15% pour les mammites causées par des coliformes et SCN, et de 30% pour les mammites causées par des streptocoques, *S. aureus* et pour l'ensemble des mammites quel que soit l'agent pathogène impliqué. Si on considère les mammites causées par des coliformes et des SCN, pour une erreur alpha de 5% et beta de 20%, il aurait fallu environ 950 cas de mammites dans l'étude pour valider statistiquement les différences estimées de pourcentage de guérison. En ce qui concerne les mammites causées par streptocoques et *S. aureus*, il aurait fallu 400 cas de mammites pour mettre en évidence une différence du pourcentage de guérison de 30%. Les bactéries d'intérêt retenues étant *S. aureus* et les streptocoques, 400 cas étaient donc nécessaires.

Par ailleurs, en se basant sur la littérature (38) et notre expérience, la prévalence moyenne estimée de mammite clinique dans les élevages laitiers était de

30%, parmi lesquelles 20% sont des mammites sévères. Puisqu'aucun article sur le traitement prolongé n'a rapporté la proportion de perte de données, nous les avons estimées à environ 15% en se basant sur notre expérience. Ainsi pour obtenir 400 cas, nous devons inclure environ 2000 vaches laitières dans l'étude.

Sélection des troupeaux

Des troupeaux laitiers Holstein à moins d'une journée de trajet (aller-retour) de la Faculté de médecine vétérinaire (FMV) ont été sélectionnés en se basant sur la volonté des producteurs de participer à l'étude ainsi que leur rigueur anticipée à suivre un protocole et à tenir un dossier complet pour chaque cas.

Sélection des animaux

Nos critères d'inclusion étaient :

- Vache de race Holstein
- Vache en lactation
- Mammite clinique légère (lait modifié seulement) ou modérée (quartier inflammé et lait modifié sans signe systémique)

Nos critères d'exclusion étaient :

- Traitement antibiotique ou anti-inflammatoire s'étant terminé moins de 14 jours avant le diagnostic de mammite
- Traitement autre que celui décrit par le protocole pendant la période d'étude.
- Animal déjà inclus dans l'étude auparavant

Groupes de traitement

Les animaux ont été répartis de façon aléatoire dans les deux groupes expérimentaux. Le groupe de traitement homologué recevait une infusion intramammaire de 125 mg de ceftiofur une fois par jour pendant 2 jours, et le groupe de traitement prolongé recevait une infusion intra-mammaire de 125 mg de ceftiofur une fois par jour pendant 8 jours.

Pour la désignation du traitement expérimental, des lots d'enveloppes numérotées avaient été préparés, contenant autant d'instructions pour le traitement 2 jours que 8 jours, et réparties dans un ordre aléatoire. Pour chaque cas de mammite diagnostiqué, le producteur devait prendre une enveloppe dans l'ordre de numérotation et l'ouvrir. Il découvrait à ce moment le nombre de traitement à effectuer (2 ou 8). Dans le cas de mammite affectant plusieurs quartiers, une seule enveloppe pour le choix du traitement devait être utilisée, et tous les quartiers affectés étaient traités selon le même protocole.

Un groupe contrôle négatif (traitement placebo) ne pouvait pas être utilisé d'après les normes d'éthique, car un traitement conventionnel efficace existe (traitement deux jours) et la mammite est une affection douloureuse pouvant évoluer vers la mort dans certains cas. Le traitement 8 jours a donc été comparé seulement au traitement standard de 2 jours (groupe contrôle positif).

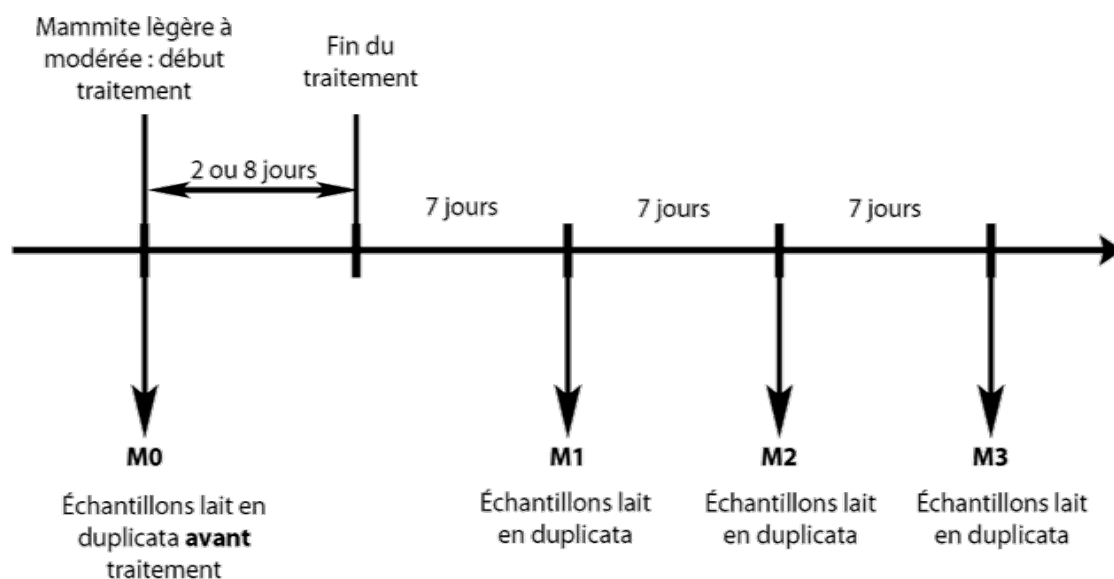
La méthode pour effectuer les infusions intra-mammaires a été standardisée et expliquée aux producteurs. La méthode conseillée était de nettoyer ses mains et

porter des gants, puis de nettoyer le trayon à l'aide de compresses imbibées d'alcool jusqu'à ce que le trayon soit propre (avec une attention particulière à l'extrémité du trayon). L'infusion devait se faire par insertion complète de la canule (environ 0,5 cm), avec un tube par quartier ayant de la mammite. Le trayon et la base du quartier devaient ensuite être massés afin de bien faire diffuser l'antibiotique. Enfin un bain de trayon devait être appliqué immédiatement après le traitement.

Récolte des échantillons et traitement

Pour chaque cas de mammite clinique admissible, des échantillons de lait devaient être prélevés avant le traitement et 7, 14 et 21 jours après la fin du traitement. Chaque échantillon devait être pris en duplicata. La figure 4 résume le protocole de prise d'échantillon.

Figure 4. Protocole de prise d'échantillon du projet Spectramast.



La méthode de prélèvement des échantillons de lait a été expliquée à chaque producteur. Le protocole était de se nettoyer les mains et mettre des gants pour le prélèvement des échantillons. Le producteur devait ensuite nettoyer les trayons avec une serviette de papier propre si la préparation avant la traite n'avait pas encore été effectuée. Quelques jets de lait devaient être tirés dans une tasse-filtre (si disponible). Un bain de trayon prétraite devait être fait s'il était utilisé habituellement à la ferme. L'extrémité du trayon devait être nettoyée vigoureusement avec une compresse imbibée avec de l'alcool (mais non détrempée). Le nettoyage devait se poursuivre jusqu'à ce que la surface d'une nouvelle compresse demeure propre, le tout en évitant

tout contact des mains avec l'extrémité du trayon. Après le retrait du bouchon du tube à prélèvement avec le petit doigt et en conservant l'intérieur du bouchon dirigé vers le sol, le tube devait être incliné à environ 45° et le lait prélevé jusqu'au 2/3 du tube. Le tube ne devait pas toucher l'extrémité du trayon. L'extrémité du trayon devait être nettoyée une seconde fois, avant le prélèvement du deuxième échantillon. Un bain de trayon devait être réalisé si la vache échantillonnée n'était pas traitée immédiatement. Les tubes devaient ensuite être identifiés puis placés au congélateur aussitôt que possible dans l'attente de leur récupération.

Pour chaque cas de mammite clinique admissible, les producteurs devaient remplir une fiche contenant les informations suivantes : numéro d'identification de la vache, numéro de l'enveloppe de traitement, groupe de traitement, température rectale, quartier infecté, apparence du lait et du quartier, date des échantillons, date de retour du lait à la normale, date de la fin du temps d'attente lait, date du retour du lait dans le réservoir et date des traitements Spectramast® LC, ainsi que les autres traitements et les récurrences de mammite.

La notation de l'apparence du lait et des quartiers s'est faite comme suit :

Pour le lait : **1)** normal, **2)** présence de grumeaux, **3)** lait purulent, **4)** lait aqueux **5)** présence de sang.

Pour le quartier : **1)** normal, palpation souple en fin de traite, pas de chaleur/douleur/rougeur/enflure/inconfort; **2)** légère enflure, quartier moins souple en fin de traite, pas de chaleur/douleur/rougeur/inconfort; **3)** enflure modérée, quartier ferme, rouge et chaud au toucher, le quartier ne revient pas à sa taille

normale en fin de traite, inconfort pendant la préparation à la traite et à la traite; **4)** enflure sévère, quartier très ferme, peu de changement de consistance après la traite, inconfort sévère; **5)** tissu cicatriciel, présence d'une masse compacte palpable n'évoluant pas (localisation et taille) entre les traites, pas de chaleur/douleur/rougeur/enflure/inconfort; **6)** œdème atteignant l'ombilic et l'attache du quartier.

Tous les mois, les échantillons de lait et les fiches d'informations ont été récoltés chez les producteurs. Les échantillons étaient ensuite acheminés directement au laboratoire de bactériologie de la FMV.

Analyse des échantillons

L'analyse bactériologique des échantillons était effectuée à l'aveugle puisque le personnel du laboratoire ne connaissait pas le groupe de traitement des vaches (traitement standard ou prolongé). Les échantillons étaient décongelés soit en les laissant une nuit au réfrigérateur, soit en les plongeant environ 30 minutes dans un bain d'eau froide avant leur ensemencement. L'ensemencement de chaque échantillon était fait sur des géloses Columbia agar supplémentées avec 5 % de sang de mouton (PML Microbiological, Mississauga, Ontario, Canada) à l'aide d'une anse calibrée (VWR International, Mississauga, Ontario, Canada) déposant 10 µL de lait sur la gélose. Les géloses et les échantillons de lait restant étaient incubés 18-24 heures à 35°C dans une atmosphère enrichie de 5 % dioxyde de carbone. Après cette période d'incubation, un premier examen des géloses était réalisé. Un comptage des colonies, leur description

macroscopique ainsi que les tests d'identification appropriés étaient effectués. Une seconde lecture était faite 24 heures plus tard. Si la lecture des géloses ne révélait aucune croissance après 24 heures, les enrichissements (laits incubés) étaient ensemencés pour analyse, selon la même méthode que précédemment.

Sur les différents isolats à identifier, une coloration de Gram était effectuée pour examen de la morphologie cellulaire. Les coques à Gram+ étaient soumises à un test de catalase. Les coques catalase-positives étaient identifiées ensuite par un test de coagulase et de Dnase au besoin. Les coques catalase négatives autres que *Aerococcus* spp. étaient soumises aux tests d'identification des streptocoques soit : réaction de Christie, Atkins and Munch-Peterson, hydrolyse de l'esculine, hydrolyse de l'hippurate, acidification de l'inuline et du raffinose. Un test de croissance avec du chlorure de sodium 6,5% ainsi que les groupes de Lancefield (groupe B et C) étaient réalisés au besoin, pour l'identification des entérocoques et des *Str. dysgalactiae* et *Streptococcus agalactiae* (*Str. agalactiae*) respectivement. Une identification à l'aide d'une galerie API20S (BioMérieux, Marcy L'Étoile, France) était effectuée dans les cas douteux. Les bâtonnets à Gram+ étaient classés selon leurs apparences macroscopiques et microscopiques, et le résultat du test de la catalase. Les bactéries à Gram- étaient repiquées sur une gélose MacConkey (PML Microbiological, Mississauga, Ontario, Canada) et étaient identifiées à l'aide des tests suivants: test d'oxidase, Triple sugar iron, uréase, citrate, indole et mobilité. Une identification à l'aide d'une galerie API20E (BioMérieux, Marcy L'Étoile, France) était effectuée dans

les cas douteux. Les levures, *Nocardia* spp. et *Prototheca* spp. étaient identifiées selon leur apparence à la coloration de Gram.

Les milieux de culture et les tests fabriqués au laboratoire de bactériologie clinique de la FMV de l'Université de Montréal étaient contrôlés pour chaque lot à l'aide de témoins positifs et négatifs. Les géloses n'étaient pas testées par le laboratoire de la FMV, mais des tests sur chaque lot sont réalisés de routine par le fabricant des géloses.

L'interprétation des résultats des bactériologies de lait a été effectuée selon les normes du NMC (Laboratory and Field Handbook on Bovine Mastitis, page 151, NMC, 1987) modifiées comme décrit dans le tableau 5.

Tableau 5. Normes utilisées dans l'étude pour l'interprétation des résultats bactériologiques de lait. Adapté et traduit de Laboratory and Field Handbook on Bovine Mastitis, page 151, NMC, 1987.

Colonies (/gélose)	1	2 - 9		>9	
	Pure	Pure	Mixte	Pure	Mixte
<i>Staphylococcus aureus</i>	3	4	4	4	4
<i>Streptococcus agalactiae</i>	4	4	4	4	4
Streptocoque groupe G	4	4	4	4	4
<i>Streptococcus</i> spp	2	3	2	4	3
<i>Streptococcus uberis</i>	2	3	2	4	3
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	2	3	2	4	3
<i>Escherichia coli</i>	2	3	2	4	2
<i>Klebsiella</i> spp.	2	3	2	4	2
<i>Enterobacter</i> spp.	2	3	2	4	2
<i>Serratia</i> spp.	2	3	2	4	2
<i>Pseudomonas</i> spp.	2	3	2	4	4
<i>Pasteurella</i> spp.	4	4	4	4	4
<i>Nocardia</i> spp.	2	3	2	4	3
Levures	2	3	1	4	2
<i>Prototheca</i>	2	3	3	4	3
<i>Corynebacterium bovis</i>	1	2	2	4	3
<i>Proteus</i> spp.	2	3	1	4	2
SCN	1	2	2	4	2

Degrés de confiance: 1= non significatif, 2= questionnable, 3= probablement significatif et 4= hautement significatif

Les scores 3 et 4 ont été considérés significatifs. Les scores de 1 ont été considérés comme non significatifs. Les résultats contenant le score 2 ont été considérés comme douteux. Ces résultats ne sont donc pas considérés comme positifs ou négatifs.

Les résultats d'enrichissement significatifs étaient considérés s'ils mettaient en évidence la présence de bactéries dont le score le plus bas est de 3 selon les normes du NMC (i.e. *S. aureus*, *Str. agalactiae*, streptocoques groupe G et *Pasteurella*).

Définitions

Un quartier était considéré comme infecté lorsque les deux échantillons avant le traitement étaient significatifs (score 3 ou 4 selon le NMC) pour la même bactérie.

La guérison a été évaluée à 7, 14 et 21 jours après la fin du traitement. Les guérisons bactériologique et clinique ont été analysées. Un animal était considéré comme guéri cliniquement à 7, 14 ou 21 jours après la fin du traitement s'il ne présentait pas de signes cliniques de la fin du traitement jusqu'à 7, 14 ou 21 jours après la fin du traitement respectivement.

Un animal était considéré guéri à 7 jours d'un point de vue bactériologique lorsque les deux échantillons à 7 jours étaient négatifs ou non significatifs pour la ou les bactéries isolées dans l'échantillon pris au moment du diagnostic de mammite (premier jour = M0). Seuls les cas infectés pouvaient guérir d'un point de vue bactériologique. Un animal était considéré guéri à 14 jours d'un point de vue bactériologique lorsque les deux échantillons à 7 et 14 jours étaient négatifs ou non

significatifs pour la ou les bactéries isolées dans l'échantillon M0. Un animal était considéré guéri à 21 jours d'un point de vue bactériologique lorsque les trois échantillons à 7, 14 et 21 jours étaient négatifs ou non significatifs pour la ou les bactéries isolées dans l'échantillon M0.

Une NIIM correspondait à une infection intra-mammaire détectée pendant la période de suivi avec un agent pathogène présent dans les 2 échantillons en duplicata différent de celui initialement isolé.

Analyses statistiques

Une analyse par régression logistique mixte a été utilisée pour comparer les pourcentages de guérison clinique et bactériologique, pour toutes les bactéries et les infections causées par les streptocoques et pour la proportion de NIIM. Le facteur fixe était le traitement, le facteur aléatoire, le troupeau, et les co-facteurs étaient les jours en lait, la sévérité de la mammite (légère ou modérée) et le quartier. Le pourcentage de guérison bactériologique pour les infections à *S. aureus* a également été analysé en utilisant le test exact du chi-carré, car le pourcentage de guérison était de 0% dans le groupe de traitement standard. Un modèle linéaire mixte a été utilisé pour comparer le temps nécessaire pour un retour à un lait d'apparence normale. Le facteur fixe était le traitement; le facteur aléatoire, le troupeau; et les co-facteurs étaient les jours en lait, la sévérité de la mammite (légère ou modérée) et le quartier. Les cas de mammites causées par des levures et *Prototheca* n'ont pas été inclus dans les analyses car notre objectif était de comparer l'efficacité du ceftiofur pour les mammites

d'origine bactérienne. Pour valider l'absence de différence entre les groupes expérimentaux, un test de T a été utilisé pour analyser les jours en lait, un test exact de Chi-carré pour la sévérité de la mammite et les proportions de *S. aureus* et streptocoques. Les résultats ont été considérés significatifs lorsque $p < 0,05$.

Article

Efficacy of extended intramammary ceftiofur therapy against mild to moderate clinical mastitis in Holstein dairy cows.

Geoffrey Truchetti, Émile Bouchard, Luc DesCôteaux and Jean-Philippe Roy

Département de Sciences cliniques, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, 3200 rue Sicotte, C.P. 5000, J2S 7C6, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada

Corresponding author:

Geoffrey Truchetti

Key words: extended therapy, ceftiofur, clinical mastitis, dairy cow.

Abstract

Intramammary extended therapy is a treatment recommended against chronic subclinical mastitis. Few studies have investigated the efficacy of extended ceftiofur therapy and no research has focused on extended therapy for naturally occurring clinical mastitis. The objective of this study was to compare the efficacy of an intramammary ceftiofur extended therapy of 8 days with a standard 2-day regimen for the treatment of naturally occurring mild to moderate clinical mastitis in lactating dairy cows. Holstein dairy cows (n = 241) from 22 dairy herds located in Quebec and Ontario, Canada, were included. For each case of mild to moderate clinical mastitis, 125 mg of ceftiofur hydrochloride (Spectramast® LC) was administered intramammary once a day for 2 or 8 consecutive days. The clinical cure 21 days after the last treatment was 89% in each treatment group (n = 98/110, p = 0.95) for both treatment regimens. Bacteriological cure 21 days after the last treatment for the 2- and 8-day regimens were 32% (n = 15/47) and 61% (n = 25/41), respectively, for all bacteria (p = 0.007), 64% (n = 9/14) and 82% (n = 9/11), respectively, for streptococci (p = 0.50), and 0% (n = 0/20) and 47% (n = 9/19), respectively, for *Staphylococcus aureus* (p = 0.0004). There were no statistical differences between groups for new intramammary infections. Ceftiofur extended therapy increased cure when compared to a standard 2-day regimen for the treatment of naturally occurring mild to moderate clinical mastitis in lactating dairy cows.

Introduction

Mastitis is one of the most common diseases in dairy cattle and one of the most frequent causes for antibiotic use in dairy herds (1). The incidence of clinical mastitis was reported to be 19.8% at the individual cow level in a survey in Ontario, Canada (2). Due in part to its frequency, mastitis is one of the costliest diseases for the dairy industry (3). In a review on economic aspect of mastitis, the cost was estimated between 83CAD to 132CAD per average cow per year (4).

Extended therapy has been introduced to help manage this costly disease, first for the treatment of sub-clinical mastitis, then for treating clinical mastitis. The principle of extended therapy is to increase the duration of treatment. As all intramammary antibiotics are time-dependant, an increase frequency of cure is expected. Extended therapy has been evaluated for subclinical mastitis and experimentally induced clinical mastitis but no study reports its use for the treatment of naturally occurring clinical mastitis.

Ceftiofur therapy is a third generation cephalosporin effective against a wide range of pathogens that cause mastitis including Gram-positive and Gram-negative bacteria, and has been labeled to treat clinical mastitis caused by *Escherichia coli* (*E. coli*), *Streptococcus dysgalactiae* (*Str. dysgalactiae*) and coagulase negative staphylococci (5-7). Extended intramammary therapy of ceftiofur was reported to provide a greater probability of cure for experimentally induced *Streptococcus uberis* mastitis (6) and for subclinical mastitis (7). When compared to the standard 2 days

treatment, extended therapy increased cure by 57% and 27% respectively. However no research has been done in field trials for evaluating the efficacy of ceftiofur extended therapy for treating naturally occurring clinical mastitis in lactating dairy cows.

The objective of the current study was to compare the efficacy of an intramammary ceftiofur extended therapy of 8 days with a standard 2-day regimen for the treatment of naturally occurring mild to moderate clinical mastitis in lactating dairy cows. The hypothesis was that extended therapy would increase cure frequency.

Materials and methods

A randomized clinical trial was conducted between January 2009 and December 2009 in 22 Holstein dairy herds located in Ontario and Québec, Canada. The experiment protocol was accepted by the Animal Care and Use Committee of the Faculté de médecine vétérinaire of the Université de Montréal (08-rech-1447).

Cows having mild to moderate clinical mastitis, as diagnosed by the producers, during the study period were included in the trial. Mild clinical mastitis (score 1) was defined as the presence of abnormal milk only. Moderate clinical mastitis (score 2) was defined as the presence of abnormal milk combined with signs of inflammation of the affected quarter, including redness, swelling, heat and pain, but without sign of systemic illness. Severe clinical mastitis (score 3) was defined as the presence of signs identical to score 2 and associated with signs of systemic illness (such as elevated rectal temperature, heart rate and respiratory rate, decreased motility or absence of

ruminal contraction, and dehydration) (8). Severe clinical mastitis cases were not included in the study.

Cows diagnosed with mild to moderate clinical mastitis (score 1 or 2) were randomly allocated to receive one of the two experimental treatment: either an intramammary infusion of 125mg of ceftiofur hydrochloride (Spectramast® LC, Pfizer Animal Health, Kirkland, QC) every 24 hours for 2 consecutive days (2d group), or the same treatment every 24 hours for 8 consecutive days (8d group). Randomization was performed by the use of numbered envelope designating in which group the new case of mastitis has to be allocated. The content of each envelope was determined by the use of randomization list for each herd. Producers opened a new envelope at each case of mild to moderate clinical mastitis, following the pre-determined order of the envelopes. The content of the envelope was unknown to the producers before opening it. No negative control group was used in this trial.

Treatments were performed by dairy producers. Producers were given a written form explaining the protocol. Protocol was explained individually to each producer. A written form was also also provided. Before treatments, teats were cleaned thoroughly with alcohol 70%. For both experimental treatments groups, ceftiofur was infused aseptically by full insertion of the plastic canula into the teat canal. In case of multiple quarter infections, the different quarters received the same treatment, however only one was randomly selected for the analysis to avoid having multiple infections for the same cow.

Cows were excluded from the trial if they received an antibiotic or anti-

inflammatory therapy within 14 days prior to diagnosis of clinical mastitis. Cows receiving antibiotic or anti-inflammatory therapy other than ceftiofur intra-mammary as described in the protocol during experimental treatment period were also excluded. Cows could only be included once in the trial also to avoid having multiple infections for the same cow. For each case of mild to moderate clinical mastitis, the data collected included identification of the cow, the infected quarter, dates of treatments and samples, days in milk (DIM) at first treatment, severity of mastitis (score 1 or 2) and time necessary to return to normal milk (calculated from the day of diagnosis).

Duplicate milk samples were collected from affected quarters by dairy producers prior to the first ceftiofur treatment, and at 7, 14, and 21 days after the last treatment for bacteriological culture. All milk samples were collected prior to regular milking using standardized procedures. Before sample collection, teats were dipped in a premilking teat disinfectant solution if usually used by the producer, cleaned thoroughly, dried with paper towels, and teat ends were sanitized with gauzes containing 70% isopropyl alcohol. A second alcohol application was made before sampling the duplicate. Immediately after sampling, milk samples were frozen (-20°C) until monthly sample pick-up.

Frozen milk samples were picked-up every month and sent to the bacteriological laboratory of the Faculté de médecine vétérinaire of the Université de Montréal (St-Hyacinthe, QC). Milk samples were thawed by immersion in cold water for 30 minutes. Samples (10µL) from each infected quarter were plated onto a

Columbia agar plate supplemented with 5% defibrinated sheep blood (PML Microbiological, Mississauga, ON, Canada). Plates and the remaining milk samples were incubated at 35°C and bacteriological growth was observed and recorded once every 24 hours for 2 days. Bacteria found on culture media were identified according to colony morphology and appropriate identification tests. In the absence of bacterial growth at 24 hours, enrichment procedures consisted in replating incubated milk samples using the same techniques. Gram coloration was performed on every bacterial isolate. Gram-positive cocci were first tested with a catalase test. Gram-positive, catalase-positive cocci were then tested for coagulase and DNase. Growth evaluations in 6.5% sodium chloride and Lancefield groups (group B and C) were performed if needed for the identification of enterococci and *Str. dysgalactiae* and *Streptococcus agalactiae* (*Str. agalactiae*), respectively. Streptococci were identified down to species level using the API 20 Strep System (BioMérieux, Marcy l'Étoile, France). Gram-negative bacteria were plated on MacConkey agar (PML Microbiological, Mississauga, ON, Canada) and evaluated with the following tests: triple sugar iron, urea, citrate, motility, and indole. Yeasts, *Nocardia* spp. and *Prototheca* spp. were identified based on their appearance after Gram coloration.

Bacteriological results were interpreted based on the National Mastitis Council (NMC) guidelines (9). Bacterial growth from enrichment procedures were considered significant for *S. aureus*, *Str. agalactiae* and *Pasteurella* spp. Contamination was defined as the growth of 3 or more different bacteria in a sample. A quarter was considered infected by a bacteria when growth was significant (highly and probably

significant as in the NMC guidelines) in both duplicate samples. Quarters were considered non-infected by a bacteria if both samples were free of bacteria or if the growth was considered non significant using the NMC guidelines. If a quarter was infected by 2 bacteria, only one, chosen randomly by tossing a coin, was included for the bacteriological cure to avoid having 2 infections for the same cow. Clinical cure was defined as a return to a milk of normal appearance at 21 days after the last treatment. A quarter was considered bacteriologically cured if the quarter was non-infected, for the previously identified bacteria, at 7, 14 and 21 days following the last treatment. A new intramammary infection (NIMI) was defined as the isolation, using the above criteria, in any of the follow-up duplicate samples of a bacteria different than the previously identified ones.

Mixed logistic regression was used to quantify clinical and bacteriological cure and NIMI. Only cows having NIMI or having all the samples complete without data loss could be included in the analysis for NIMI. A mixed linear model was used to compare the time for a return to normal milk between the 2 groups. In those 2 types of analysis, the fixed factor was the treatment regimen; the herd was the random factor and the DIM, severity of mastitis and the affected quarter were co-factors. To compare the degree of severity of mastitis between the 2 groups, the exact chi-square test was used. To compare bacteriological cure for *S. aureus* infections, the exact chi-square test was used *a posteriori*, as cure was 0% in one of the 2 groups, preventing the use of the mixed logistic regression. The proportion of *S. aureus* and streptococci versus the other bacterial strains was compared between the 2 groups *a posteriori* using the

exact chi-square test. Clinical mastitis cases caused by *Prototheca* spp. and yeasts were not statistically analysed. Results were considered statistically significant when $p < 0.05$.

Results

A total of 241 cases of mild to moderate clinical mastitis (score 1: $n = 65$; Score 2: $n = 176$) were included in the study; 122 in the 2d group and 119 in the 8d group. There were 121 clinical mastitis affecting the front quarters and 120 the rear quarters. There was no statistical difference between the two groups for DIM (average: 136.3 and 151.7 for 2d and 8d groups respectively; t -value = -0.99 , $DF = 239$, $p = 0.30$) or severity of mastitis (36 mild mastitis cases and 86 moderate mastitis cases in the 2d group, and 29 mild mastitis cases and 90 moderate mastitis cases in the 8d group; $\chi^2 = 0.80$, $DF = 1$, $p = 0.39$).

The numbers of included, excluded or lost cases of clinical mastitis for clinical and bacteriological evaluations are summarized in figure 1. The distribution of pathogens isolated is summarized in Table 1. In some cases two bacteria were mixed into one category, one was a mix of *S. aureus* and streptococci, and the other one was a mix of *Enterococcus* spp. and *S. aureus*. For the first case, streptococci infection was randomly chosen, and for the second case the *Enterococcus* spp. infection was randomly chosen. There was no significant difference in the distribution of *S. aureus* or streptococci in study treatment group ($\chi^2 = 0.127$, $DF = 1$, $p = 0.72$ and $\chi^2 = 0.09$, $DF = 1$, $p = 0.76$, respectively).

For clinical cure, 21 of the 241 cases of mild to moderate clinical mastitis were excluded, 9 because they were yeasts or *Prototheca* spp. mastitis, 9 because monitoring was stopped without reasons, 2 because another treatment was administered to treat another disease and 1 because the cow was dried off before the end of the monitoring period. Clinical cure for 2d and 8d groups were identical (98/110 for each; OR = 1.04, DF = 1, p = 0.95) with no effects of the affected quarter ($\chi^2 = 2.07$, DF = 3, p = 0.56), severity of mastitis ($\chi^2 = 0.00$, DF = 1, p = 0.95) and DIM ($\chi^2 = 0.08$, DF = 1, p = 0.78). There was a significant difference between the two groups for the delay for return to normal milk (2.8 d for the 2d group, 3.66 d for the 8d group; F = 7.41, DF = 1, p = 0.007), with no effects of the affected quarter (F = 0.77, DF = 3, p = 0.51), severity of mastitis (F = 3.28, DF = 1, p = 0.07) and DIM (F = 3.09, DF = 1, p = 0.08).

For bacteriological cure, 37 of 125 infected cases could not be analyzed and therefore, 88 were included to analyze cure. The causes of the 37 lost observations are summarized in Table 2. Bacteriological cure are presented in Table 3. Bacteriological cure was significantly greater in the 8d group than in the 2d group for all bacteria combined (OR = 3.75, DF = 1, p = 0.007), for *S. aureus* ($\chi^2 = 12.53$, DF = 1, p = 0.0004), but not for streptococci (OR = 2.24, DF = 1, p = 0.50). For each of these analysis (all bacteria combined, *S. aureus* and streptococci, there was no effects of the affected quarter ($\chi^2 = 3.04$, DF = 3, p = 0.39; $\chi^2 = 3.02$, DF = 3, p = 0.39 and $\chi^2 = 5.74$, DF = 3, p = 0.12 respectively), severity of mastitis ($\chi^2 = 3.40$, DF = 1, p = 0.07; $\chi^2 = 0.01$, DF = 1, p = 0.91 and $\chi^2 = 0.25$, DF = 1, p = 0.62 respectively) and DIM ($\chi^2 = 0.16$, DF = 1, p = 0.69).

= 1, $p = 0.69$; $\chi^2 = 1.39$, $DF = 1$, $p = 0.24$ and $\chi^2 = 0.83$, $DF = 1$, $p = 0.36$ respectively). Of the 48 bacteriological cure failures, 34 were considered clinically cured.

For the NIMI analysis, 155 mastitis cases (78 in the 2d group, 77 in the 8d group) could be included. Of the 155 mastitis, 16 were followed by new intramammary infections (NIMI) during the observation period, 10 in the 2d group and 6 in the 8d group. There was no significant difference between the 2 groups ($OR = 1.67$, $DF = 1$, $p = 0.30$) with no effects of severity of mastitis ($\chi^2 = 1.34$, $DF = 1$, $p = 0.25$) and DIM ($\chi^2 = 1.96$, $DF = 1$, $p = 0.16$). The distribution and identification of NIMI for the two treatment regimens are presented in Table 4. Note that only one bacteria was Gram-. The risk of NIMI varied significantly with the location of the infected quarter ($\chi^2 = 8.47$, $DF = 3$, $p = 0.04$). There were 3 NIMI in the left front quarter, 1 in the left rear quarter, 8 in the right front quarter, and 4 in the right rear quarter. There were 11 NIMI in front quarters and 5 NIMI in the rear quarters.

Discussion

The objective of this study was to compare clinical and bacteriological cure with ceftiofur intramammary extended therapy to a standard 2 day regimen for treating naturally occurring clinical mastitis. Extended therapy significantly increases bacteriological cure for all bacteria combined and for *S. aureus*, but not for streptococci as a group. No improvement of clinical cure was noted. Improvements in bacteriological cure using extended ceftiofur therapy reported in previous studies (6,

7) were similar to our results. Clinical cure has not been reported in the study on experimentally induced clinical mastitis (6).

Interestingly 34 clinical cures were observed without bacteriological cure in both groups during the study. Similar findings have been reported and this situation can result in recurrence of clinical mastitis and high somatic cell counts (10-12). In one of those studies (11), a persistent intramammary infection, caused by the same bacteria, was found one year after the first culture in 4.77% of all episodes of clinical mastitis. This result points out that, for any intramammary treatment, a bacteriological cure should be the goal to maximize the benefit of treatment.

No improvement in bacteriological cure for streptococci infections was found, unlike results reported by Oliver et al. (6). However, in the study of Oliver (6), the infections were experimental (same strain and infectious dose of the same species (*Str. uberis* UT 888)) and only 2 herds were included. Whereas in our study, the streptococci strains were coming from 22 different herds. This major difference in study protocol can increase the variation in each group, masking differences between groups. More cases would have been needed. To find a 30% difference between groups, with a significance level of 0.05 and a power of 0.8, at least 30 cases in each group would have been needed. For streptococci infections, only 14 and 11 cases in the 2d and 8d group respectively were recruited.

More cases of moderate mastitis than mild mastitis were observed in this study. As previously reported (2, 12), a greater proportion of mild mastitis was expected. It is possible that some mild mastitis were not included in the study, even

though producers has been clearly instructed to collect samples from any quarter with abnormal milk, regardless of intention to treat. Thus the number of mild mastitis may be underestimated.

There was the same number of mastitis in the anterior quarters than the posterior quarters. This distribution of affected quarters did not agree with reports of higher incidence in rear quarters for naturally occurring intramammary infections (IMI) (16-20). However, the proportion of each clinical mastitis (mild, moderate and severe) is different in this study as the number of mild clinical mastitis may have been underestimated and as no severe clinical mastitis was included in the study. This difference in the proportion of each clinical mastitis could affect the distribution of affected quarter.

More than 70% of the infected cases were caused by *S. aureus* (40.8%) and by streptococci (31.2%). In a Canadian study (13), *S. aureus* and streptococci were responsible for 21.7% and 26.4% of the infections. However, in their study, severe mastitis were included. The population of bacteria responsible for severe clinical mastitis may be different from the population of bacteria responsible for mild to moderate cases. Moreover, the study of Olde Riekerink et al. (13) was conducted on dairy farms from all over Canada, whereas this study was done in Québec and Ontario. As reported by Olde Riekerink et al., differences in the distribution of bacterial-specific clinical mastitis throughout provinces in Canada exist. Finally, the method used for diagnosis was different, which might change the measured prevalence of each

pathogen. In this study, duplicates of each sample were used, whereas one sample for each time-point were used in Olde Riekerink's study.

No study reported an increase in the delay for a return to normal milk associated with extended therapy. It is very unlikely that ceftiofur could have been irritant for the udder. Even though a type I statistical error cannot be excluded, increased delay is probably related to the fact that producers were not blinded to the treatment. Thus the follow-up could be different in the two groups as producers had to treat for an additional 6 days in the 8d group compared to the 2d group.

The risk of NIMI is one of the drawbacks of extended therapy. Previous reported NIMI were clinical (14-17) or subclinical mastitis (17). In this study, NIMI were all subclinical infections. New intramammary infections have been reported following pirlimycine (14, 15, 17) and cephalosporin (16) extended therapy. With pirlimycine, NIMI were mainly due to *E. coli* and *Klebsiella* spp., whereas NIMI following cephalosporin treatment were all due to yeasts. In our study, only one NIMI was caused by a Gram negative bacteria (*Serratia* spp.) and none were caused by yeasts. Cephalosporin and ceftiofur are members of the cephalosporin group of beta-lactam drugs. Their spectrum is broader than pirlimycine. First generation cephalosporin drugs such as cephalosporin are generally considered to be active against streptococci, staphylococci, *E. coli*, *Klebsiella* spp. and *Proteus* spp., but not against *Enterococcus* spp.. Third generation cephalosporins such as ceftiofur are less active than 1st generation cephalosporins against Gram positive cocci but more active against the enterobacteriaceae including strains producing beta-lactamase. Those differences in

spectrum could explain the differences of incidence of NIMI between molecules. In addition, instructions were given to the producers concerning the infusion technique, to reduce the risk of infusing bacteria in the quarter. Finally, the previously reported NIMI were diagnosed after a treatment for sub-clinical infections, unlike this study. The population of cows having sub-clinical infections could be different from the population of cows having clinical infections in terms of sensibility to new infections. Furthermore, the study reporting NIMI were not performed in the same location. As reported in the study of Olde Riekerink (13), population of cows are different between countries.

In this study, the probability of NIMI varied significantly depending on the affected quarter. The right front quarter seems to be affected more than the others, and the left rear quarter less. Front quarters also seem to be more affected than rear quarters. There is no data available in the literature concerning the distribution of NIMI according to quarter. This distribution of affected quarters does not agree with reports of higher incidence in rear quarters for naturally occurring IMI (16-20). This kind of distribution is thought to be due to the contamination of rear quarter by feces. As the distribution of affected quarter does not follow the distribution of naturally occurring IMI, NIMI following extended therapy may not be caused by a contamination by feces. Introduction of new pathogen in the udder during the infusion could be responsible for NIMI.

In the present study 153 of the 241 cases of mastitis could not be analyzed for the bacteriological cure. Of the 241 samples, 63 were culture negative, which is similar

to what have been reported (18-20). The expected losses of data for other reasons were expected to reach approximately 15% of all samples versus the 37% loss we observed. A recent study (21) reported 41% of loss of data with a protocol less strict than the one in the present study. Requiring 2 samples to have the same bacteriological results probably increased the losses of data of this study. Of the 37 losses of data for bacteriological evaluation 27 were lost because at least one sample could not be analyzed, either because of contamination or because one of the samples was missing. Moreover, taking two samples at each time points increased the workload of the producers, which may account for the loss of data due to non-respect of the protocol. However, even if duplicate sampling increased the numbers of data lost subjects, false negative and false positive results were minimized. This fact and the strict definition of infection and cure aimed to decrease selection bias in the study.

This study reports the clinical and bacteriological efficacy of intramammary extended ceftiofur therapy for naturally occurring mild to moderate clinical mastitis. Bacteriological cure were higher with the extended therapy for all mastitis cases combined and for *S. aureus* mastitis cases. However no difference were found for streptococci infection. Therefore, extended therapy could be considered as an efficient treatment of naturally occurring clinical mastitis and for *S. aureus* clinical mastitis. Further studies are needed concerning the efficacy of extended therapy for treatment of natural streptococci clinical mastitis cases.

Acknowledgments

The authors would like to thank Guy Beauchamp for his help with the statistical analysis, Pfizer Animal Health Canada for funding this study and the 22 producers and their veterinarian.

Bibliography

1. Erskine RJ, Wagner S, and DeGraves FJ. Mastitis Therapy and Pharmacology. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 2003;19 (1): 109-138, vi.
2. Sargeant JM, Scott HM, Leslie KE, Ireland MJ, and Bashiri A. Clinical Mastitis in Dairy Cattle in Ontario: Frequency of Occurrence and Bacteriological Isolates. *Can Vet J* 1998;39 (1): 33-38.
3. DeGraves FJ and Fetrow J. Economics of Mastitis and Mastitis Control. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 1993;9 (3): 421-434.
4. Hogeveen H, Huijps K, and Lam TJ. Economic Aspects of Mastitis: New Developments. *N Z Vet J* 2011;59 (1): 16-23.
5. Hornish RE and Kotarski SF. Cephalosporins in Veterinary Medicine - Ceftiofur Use in Food Animals. *Curr Top Med Chem* 2002;2 (7): 717-731.
6. Oliver SP, Almeida RA, Gillespie BE, Headrick SJ, Dowlen HH, Johnson DL, Lamar KC, Chester ST, and Moseley WM. Extended Ceftiofur Therapy for Treatment of Experimentally-Induced *Streptococcus Uberis* Mastitis in Lactating Dairy Cattle. *J Dairy Sci* 2004;87 (10): 3322-3329.
7. Oliver SP, Gillespie BE, Headrick SJ, Moorehead H, Lunn P, Dowlen HH, Johnson DL, Lamar KC, Chester ST, and Moseley WM. Efficacy of Extended Ceftiofur Intramammary Therapy for Treatment of Subclinical Mastitis in Lactating Dairy Cows. *J Dairy Sci* 2004;87 (8): 2393-2400.
8. Roberson JR. Establishing Treatment Protocols for Clinical Mastitis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 2003;19 (1): 223-234, viii.
9. National Mastitis Council. *Laboratory and Field Handbook on Bovine Mastitis*. 1st ed. Arlington, VA: Natl. Mastitis Council, 1987.
10. Cattell MB. An Outbreak of *Streptococcus Uberis* as a Consequence of Adopting a Protocol of No Antibiotic Therapy for Clinical Mastitis. *Proceeding of the 35th National Mastitis Council Annual Meeting* 1996: 123.

11. Dopfer D, Barkema HW, Lam TJ, Schukken YH, and Gaastra W. Recurrent Clinical Mastitis Caused by *Escherichia Coli* in Dairy Cows. *J Dairy Sci* 1999;82 (1): 80-85.
12. Morin DE, Shanks RD, and McCoy GC. Comparison of Antibiotic Administration in Conjunction with Supportive Measures Versus Supportive Measures Alone for Treatment of Dairy Cows with Clinical Mastitis. *J Am Vet Med Assoc* 1998;213 (5): 676-684.
13. Olde Riekerink RG, Barkema HW, Kelton DF, and Scholl DT. Incidence Rate of Clinical Mastitis on Canadian Dairy Farms. *J Dairy Sci* 2008;91 (4): 1366-1377.
14. Gillespie BE, Moorehead H, Lunn P, Dowlen HH, Johnson DL, Lamar KC, Lewis MJ, Ivey SJ, Hallberg JW, Chester ST, and Oliver SP. Efficacy of Extended Pirlimycin Hydrochloride Therapy for Treatment of Environmental *Streptococcus Spp* and *Staphylococcus Aureus* Intramammary Infections in Lactating Dairy Cows. *Vet Ther* 2002;3 (4): 373-380.
15. Middleton JR and Luby CD. *Escherichia Coli* Mastitis in Cattle Being Treated for *Staphylococcus Aureus* Intramammary Infection. *Vet Rec* 2008;162 (5): 156-157.
16. Roy JP, DesCoteaux L, DuTremblay D, Beaudry F, and Elsener J. Efficacy of a 5-Day Extended Therapy Program During Lactation with Cephapirin Sodium in Dairy Cows Chronically Infected with *Staphylococcus Aureus*. *Can Vet J* 2009;50 (12): 1257-1262.
17. Deluyker HA, Oye SNV, and Boucher JF. Factors Affecting Cure and Somatic Cell Count after Pirlimycin Treatment of Subclinical Mastitis in Lactating Cows. *J Dairy Sci* 2005;88: 604-614.
18. Bishop H, Erkelens J, and Van Winden S. Predictors for Successful Bacteriological Culture from Milk Samples. *Vet Rec* 2010;166 (11): 322-324.
19. Bradley AJ, Leach KA, Breen JE, Green LE, and Green MJ. Survey of the Incidence and Aetiology of Mastitis on Dairy Farms in England and Wales. *Vet Rec* 2007;160 (8): 253-257.

20. Ferguson JD, Azzaro G, Gambina M, and Licitra G. Prevalence of Mastitis Pathogens in Ragusa, Sicily, from 2000 to 2006. *J Dairy Sci* 2007;90 (12): 5798-5813.
21. Reyher KK, Dufour S, Barkema HW, Des Coteaux L, Devries TJ, Dohoo IR, Keefe GP, Roy JP, and Scholl DT. The National Cohort of Dairy Farms--a Data Collection Platform for Mastitis Research in Canada. *J Dairy Sci* 2010;94 (3): 1616-1626.

Figure 1. Numbers of included and excluded cases of clinical mastitis for clinical and bacteriological evaluation.

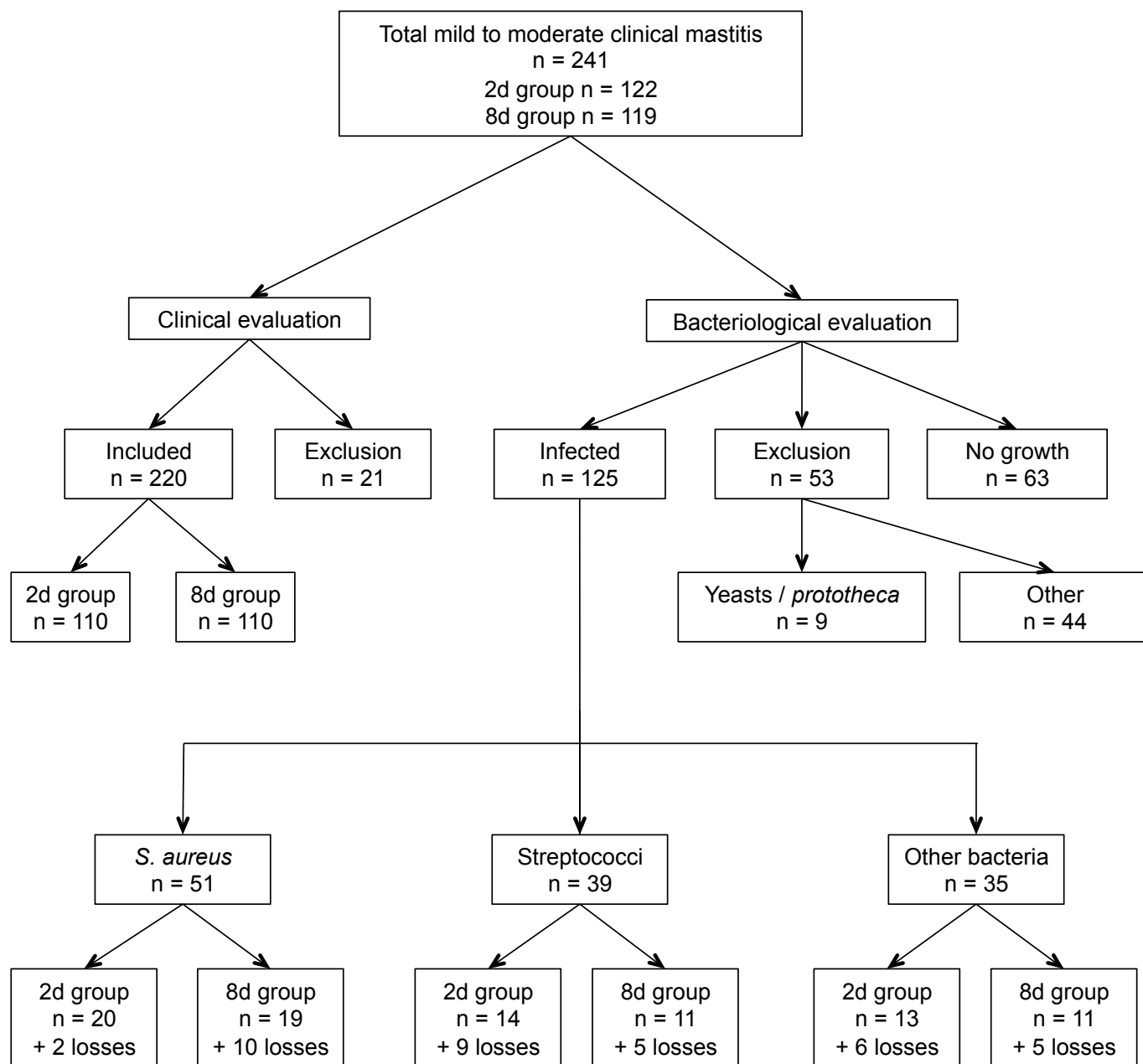


Table 1. Distribution of initial bacteriological culture results among clinical mastitis cases.

Bacterial species	Frequency			Percent
	2d group	8d group	Total	
<i>S. aureus</i> ¹	22	29	51	25.9
Streptococci	23	15	38	19.8
<i>Enterococcus</i> spp.	7	3	10	5.1
<i>E. Coli</i> ²	4	4	8	4.1
<i>Klebsiella</i> spp.	2	3	5	2.5
CNS ³	2	3	5	2.5
Yeasts	3	2	5	2.5
<i>Prototheca</i>	1	3	4	2.0
Mixed infections ⁴	0	2	2	1.0
<i>Enterobacter</i> spp.	1	1	2	1.0
<i>Citrobacter</i> spp.	1	0	1	0.5
<i>Corynebacterium</i> spp.	1	0	1	0.5
<i>Mannheimia</i> spp.	0	1	1	0.5
<i>Pasteurella</i> spp.	1	0	1	0.5
No growth or insignificant growth	32	31	63	32.0
Total	100	97	197	100

1: *S. aureus* stands for *Staphylococcus aureus*

2: *E. coli* stands for *Escherichia coli*

3: CNS stands for coagulase negative staphylococci

4: mixed infections were *S. aureus* / streptococci and *Enterococcus* spp. / *S. aureus* infections

Table 2. Causes of loss of data for bacteriological analysis of infected mastitis cases.

Causes of loss of data	Number	%
Contamination of at least one sample	17	45.9
At least 1 sample missing	10	27.0
Samples not taken at the right time	6	16.2
Other treatments	2	5.4
Monitoring stopped	1	2.7
Cow dried off	1	2.7
Total	37	100

Table 3. Bacteriological cure rates for two ceftiofur intramammary treatment regimens: standard 2-day therapy (2d group) and extended therapy (8d group).

Bacteria	Bacteriological cure rates	
	2d group (n)	8d group (n)
<i>Staphylococcus aureus</i>	0% (0/20) ^a	47.4% (9/19) ^b
Streptococci	64.3% (9/14) ^a	81.8% (9/11) ^a
Overall	31.9% (15/47) ^a	61% (25/41) ^b

^{a, b}: data within the same row with different letters are statistically different ($p < 0.05$).

Table 4. Distribution and identification of new intramammary infections for the two intramammary treatment regimens using ceftiofur: standard 2 day therapy (2d group) and extended therapy (8d group) at 7, 14 and 21 days after the end of the treatments.

Treatment group	Follow-up period		
	7 days	14 days	21 days
2d	1 <i>S. aureus</i> ¹	1 <i>Serratia</i> spp.	1 CNS ²
	1 CNS	1 <i>Corynebacterium</i> spp.	1 <i>Enterococcus</i> spp.
	1 <i>Corynebacterium</i> spp.	1 CNS 1 <i>Str. dysgalactiae</i> ³	1 <i>Corynebacterium</i> spp.
8d	1 <i>S. aureus</i>	1 <i>S. aureus</i> 1 CNS	1 <i>Corynebacterium</i> spp. 2 CNS

¹: *S. aureus* stands for *Staphylococcus aureus*

²: CNS stands for coagulase negative staphylococci

³: *Str. dysgalactiae* stands for *Streptococcus dysgalactiae*.

Discussion

Cette étude est, à la connaissances des auteurs, la seule à rapporter une augmentation du pourcentage de guérison bactériologique suite à un traitement prolongé à base de ceftiofur de 8 jours lorsque comparé à un traitement standard de 2 jours pour les mammites cliniques naturelles légères à modérées. Dans cette section, nous comparerons d'abord nos résultats avec ceux de la littérature, puis nous discuterons des forces et faiblesses de notre étude, et enfin du futur de l'étude.

Pourcentage de guérison

Les pourcentages de guérison clinique observés dans les 2 groupes sont excellents et identiques. Le pourcentage de guérison clinique n'était pas rapporté dans l'étude sur le traitement prolongé à base de ceftiofur pour les mammites expérimentales (66). Des guérisons cliniques sans guérison bactériologique à 21 jours post traitement (22/98 dans le groupe 2 jours et 12/98 dans le groupe 8 jours) ont été observées dans notre étude. Cela a déjà été rapporté dans la littérature et peut être à l'origine de récurrence et de haut CCS (28, 29, 72). Dans une de ces études (72), jusqu'à 4,77% des mammites cliniques traitées développaient un an plus tard une infection chronique au même agent pathogène. Ce résultat illustre que, comme tout traitement, la guérison bactériologique devrait être l'objectif du traitement, afin d'éviter les récurrences et le risque de transmission de souches résistantes aux antibiotiques et maximiser les bénéfices du traitement. Un suivi bactériologique serait donc recommandé lors de mammites cliniques récidivantes ou d'utilisation du traitement prolongé.

Le ceftiofur a été étudié dans le cadre du traitement prolongé contre les mammites sub-cliniques (71) et les mammites cliniques expérimentales à *Str. uberis* (66). Nous n'avons pas trouvé de différence significative dans notre étude pour les mammites causées par les streptocoques, contrairement à ce qui est rapporté pour les mammites expérimentales à *Str. uberis*. Ceci pourrait être dû au nombre trop faible de cas de mammites causées par des streptocoques. Comme présenté dans la section « Méthodologie », il aurait fallu environ 30 cas dans chaque groupe pour mettre en évidence une différence de 30% entre les deux groupes, avec une erreur alpha de 5% et beta de 20%. Nous n'en avons eu que 14 et 11 dans le groupe 2 jours et 8 jours respectivement. Il s'agit donc d'une situation d'analyse à faible puissance. D'autre part, l'étude d'Oliver et coll. avait utilisé une seule souche de streptocoques (*Str. uberis* souche UT 888), la dose infectante était standardisée (5 mL d'inoculum contenant *Str. uberis* à 1500 cfu/mL) et seulement 2 troupeaux étaient utilisés. Dans notre étude, les streptocoques sont d'espèces et de souches différentes, la dose infectante n'est probablement pas la même (infections naturelles) et nous avons 22 troupeaux recrutés (diversité génétique et de région). Ces trois points peuvent être responsables d'une plus grande variation au sein des groupes, pouvant masquer une différence entre les groupes.

Le traitement prolongé à base de ceftiofur augmente les pourcentages de guérison bactériologique tous agents pathogènes confondus et lorsque *S. aureus* est l'agent pathogène responsable. Ce traitement pourrait faire partie des choix thérapeutiques contre les mammites cliniques, quelque soit les bactéries en cause, et

notamment dans le cadre des mammites causées par *S. aureus* ou dans les troupeaux ayant une forte prévalence de vaches positives à *S. aureus*.

Distribution des mammites et des agents pathogènes en cause

Aucune étude ne rapporte une proportion de mammite modérée supérieure à la proportion de mammite légère. Dans une étude ontarienne (73), le risque d'incidence pendant une lactation de mammite clinique légère était de 9,8% contre un risque d'incidence pendant une lactation de mammite clinique modérée de 8,2%. Dans une étude américaine (28), 65% des mammites cliniques étudiées étaient classifiées légères, et 11% des mammites cliniques étaient modérées. Contrairement à ces études, nous avons observé plus de mammites modérées que de mammites légères (73% contre 27% respectivement), alors que nous nous attendions à des proportions inverses. Cependant le diagnostic de mammite a été fait par les producteurs, et le calcul du nombre de cas de mammites légères ou modérées a été réalisé à partir du diagnostic des producteurs. Même si tous les cas de mammites légères à modérées auraient dus être inclus, il est possible que certaines mammites légères n'aient pas été traitées par les producteurs. Ceci pourrait concerner par exemple, des cas de mammites récidivantes légères connues par les producteurs comme ne répondant pas aux traitements ou se résolvant cliniquement sans traitement. Dans l'étude ontarienne, le diagnostic était aussi réalisé par les producteurs, mais il s'agissait d'une étude sur la prévalence des différentes bactéries responsables de mammites : toutes les mammites cliniques devaient être échantillonnées et la possibilité de traitement ne

pouvait donc pas interférer avec l'échantillonnage. Dans l'étude américaine, le diagnostic se faisait dans des centres de recherche par des techniciens. Il est donc possible que moins de mammites légères aient été incluses dans notre étude que le nombre de mammites légères réellement présentes dans les 22 élevages.

Les quartiers avant et arrière étaient autant affectés dans cette étude (121 mammites dans les quartiers avant et 120 dans les quartiers arrière). Cette distribution des quartiers affectés ne correspond pas à celle rapportée pour les infections intra-mammaires naturelles, qui sont le plus souvent dans les quartiers arrière (74-78). Dans cette étude, seules les mammites cliniques légères à modérées étaient incluses, contrairement aux études rapportant la distribution des quartiers infectés où toutes les mammites cliniques étaient incluses. Il est possible que la répartition des quartiers affectés soit différente selon le type de mammites cliniques (légères, modérées ou sévères). De plus, comme dit précédemment, il est possible que certaines mammites cliniques légères n'aient pas été incluses dans l'étude, affectant la proportion de mammites légères *versus* modérées. Ces 2 points (absence de mammite sévère et proportionnellement moins de mammites légères) pourraient expliquer partiellement la distribution égale de mammite dans les quartiers avant et arrière.

Parmi les 125 cas infectés, 40,8% (51/125) étaient des infections causées par *S. aureus* et 31,2% (39/125) des infections causées par des streptocoques. Les proportions rapportées des infections causées par *S. aureus* et par les streptocoques étaient de 21,7% et 26,4% respectivement au Québec, dans une étude réalisée sur 26 troupeaux canadiens (38). La proportion observée d'infections à SCN était de 4%

(5/125) dans notre étude, contre une proportion rapportée de 10,7% dans l'étude de Olde Riekerink et coll. (38). De même en ce qui concerne les infections à un *E. coli*, la proportion observée dans notre étude était de 6,4% (8/125) contre une proportion rapportée de 17,6% (38).

Les mammites incluses dans l'étude étaient toutes des mammites légères à modérées, contrairement à celles de l'étude de Olde Riekerink et coll. (38). La distribution des agents pathogènes est différente pour chaque grade de mammite (31, 32, 79). De plus, les populations échantillonnées étaient différentes ainsi que les méthodes d'échantillonnage et d'interprétation des résultats. Dans l'étude de Olde Riekerink et coll., un seul échantillon était récolté, alors que des duplicata ont été prélevés dans la présente étude. Nos critères d'infection et de guérison étaient également plus stricts (i.e. duplicata), ce qui a causé des pertes de données plus importantes qu'attendues. Ces pertes sont discutées par la suite. Les différences mentionnées pourraient expliquer les variations observées de distribution des agents pathogènes entre l'étude de Olde Riekerink et coll. et la nôtre. Malgré ces différences de méthode, la population incluse dans l'étude est probablement représentative des mammites cliniques légères à modérées traitées par les producteurs du Québec et de l'est de l'Ontario.

Délai pour le retour à la normale du lait

Dans notre étude, le temps nécessaire pour que le lait revienne à la normale était significativement plus long dans le groupe de traitement prolongé que dans le

groupe du traitement standard. Aucune étude ne rapporte le délai nécessaire au retour à la normale du lait. Les auteurs proposent 4 hypothèses pour expliquer cela : un biais d'observation, une irritation réelle du quartier suite à la présence prolongée de ceftiofur dans le quartier, un biais de composition de chaque groupe et une erreur de type I. Le suivi entre les 2 groupes aurait pu être différent car les producteurs n'étaient pas en aveugle pour le traitement. De plus, le ceftiofur n'a jamais été rapporté comme potentiellement irritant pour le parenchyme mammaire et les deux groupes n'étaient pas statistiquement différents dans leur composition. L'hypothèse d'une erreur de type I ne peut pas être écartée. L'hypothèse la plus probable est un biais d'observation. Il est donc possible que les animaux étant été traités 8 jours aient été observés plus attentivement que les animaux du groupe 2 jours, notamment en continuant à faire le traitement pendant les 6 jours supplémentaires.

Nouvelles infections intra-mammaires

Le risque de NIIM est un des effets indésirables du traitement prolongé. Les NIIM ont été rapportées après un traitement prolongé à base de pirlimycine (55-58) et de céphapirine (59). Suite à un traitement à base de pirlimycine, les NIIM étaient causées par *E. coli* et *Klebsiella* spp., alors qu'après un traitement à base de céphapirine, elles étaient causées par des levures. Les NIIM ont été rapportées dans les différentes études comme pouvant causer des infections cliniques (55, 57, 59) ou sub-cliniques (56). Toutes les NIIM dans notre étude étaient sub-cliniques. Cependant nous avons observé des récurrences de mammite clinique, mais aucune n'était une NIIM

par définition : les récurrences étaient causées par la même bactérie que celle responsable de la mammite, ou aucune bactérie spécifique ne pouvait être considérée comme responsable de la récurrence selon la grille d'interprétation utilisée. Ces mammites ont été considérées comme des échecs de traitement, mais pas comme des NIIM.

La pirlimycine appartient à la classe des lincosamides et est considérée comme active contre les bactéries Gram+ mais pas contre les bactéries Gram- (54). La céphapirine et le ceftiofur sont deux antibiotiques appartenant au groupe des céphalosporines de la famille des bêta lactames. Leurs spectres sont plus larges que celui de la pirlimycine. Les céphalosporines de première génération, comme la céphapirine, sont considérées comme actives contre les streptocoques, les staphylocoques, *E. coli*, *Klebsiella* et *Proteus*, mais pas contre *Enterococcus* (54). Les céphalosporines de troisième génération, comme le ceftiofur, sont moins actives contre les coques Gram+ mais plus actives contre la famille des *enterobacteriaceae*, incluant les souches produisant des bêta lactamase (54). Ces différences de spectres pourraient expliquer en partie les différences de NIIM : *E. coli* et *Klebsiella* pour la pirlimycine, levures pour la céphapirine et bactéries gram+ pour le ceftiofur. De plus des recommandations ont été données aux producteurs concernant les mesures d'hygiène à respecter pour la réalisation des infusions intra-mammaires, diminuant ainsi le risque d'infuser des bactéries en même temps que le traitement. Enfin, les populations de vaches ne sont pas les mêmes : les NIIM rapportées faisant suite à des infections sub-cliniques, alors que les NIIM de la présente étude faisaient suite à des

mammites cliniques. Or les populations des vaches ayant des mammites sub-cliniques peuvent être différentes de la population des vaches ayant des mammites cliniques. De plus, comme dit précédemment, les populations de vaches sont différentes d'un pays à l'autre. Des populations différentes de vaches, que ce soit par leur origine géographique ou par leur susceptibilité à un type de mammite (clinique ou sub-clinique), pourrait expliquer l'observation de NIIM différentes. L'ensemble de ces trois points (spectre d'action, mesures d'hygiène et populations de vaches différentes) pourrait contribuer à l'observation d'une distribution de NIIM différentes dans notre étude comparée à celles rapportés dans les autres études.

Dans notre étude, la proportion de NIIM variait significativement selon le quartier affecté. Le quartier antérieur droit semblait plus souvent affecté que les autres alors que le quartier arrière gauche l'était moins. Plus globalement, les quartiers antérieurs semblaient plus souvent affectés que les quartiers postérieurs. Il n'y a pas de donnée disponible dans la littérature sur la distribution des NIIM selon les quartiers. Cette distribution des quartiers affectés ne correspond pas à celle rapportée pour les infections intra-mammaires naturelles, qui sont le plus souvent dans les quartiers arrière (74-78). Cette distribution est probablement causée par la contamination des quartiers arrière par des fèces ou de la litière souillée. Comme les NIIM incluses dans cette étude semblent affectées plus souvent les quartiers avant, la cause des NIIM pourrait ne pas être la contamination des quartiers par des fèces. L'introduction d'agents pathogènes lors de l'infusion de l'antibiotique est une

hypothèse plausible, mais plus de travail (identification génétique des souches par exemple) est nécessaire pour connaître l'origine exact des ces NIIM.

Forces et faiblesses de l'étude

Une des forces de notre étude est l'utilisation de critères d'infection et de guérison stricts. Nous avons utilisé les normes du NMC pour les critères d'infection. Comme discuté précédemment (cf. Revue de littérature 2.2.2), ces normes sont utilisées dans la plupart des articles évaluant l'efficacité des traitements intramammaires. Cependant, il existe une certaine imprécision dans ces normes. Un score de 4 correspond à un résultat hautement significatif, un score de 1 à un résultat non significatif, mais les scores 2 et 3 sont dit « questionnables » et « probablement significatifs » respectivement. Aucun auteur ne donne son interprétation des scores 2 et 3. Nous avons considéré le score 3 comme significatif et le score 2 comme non interprétable pour la définition d'infection et de guérison. De plus, nous avons utilisé des duplicatas afin d'être plus strict dans nos critères d'infection et de guérison bien qu'il n'existe pas de consensus sur l'utilisation de duplicata. Enfin nous avons décidé de lire les duplicata en série, afin d'être plus strict dans nos critères d'infection et de guérison. Comme le conseillent certains auteurs (1) nous avons décidé d'être stricts dans notre méthodologie car l'objectif était d'obtenir des résultats les plus significatifs possibles. Le manque de transparence dans les autres études empêche de pouvoir comparer totalement notre méthodologie, limitant ainsi le développement des connaissances.

Lors de mise en place du protocole expérimental et de la réalisation de l'étude, la publication sur les sensibilités et spécificité des différentes définitions d'infection (50) n'existait pas. Le choix des critères de guérison et d'infection a été fait par l'ensemble des vétérinaires impliqués dans le projet. Il serait intéressant de choisir des critères d'infection pour notre projet en choisissant une définition par pathogène d'intérêt favorisant une valeur prédictive positive élevée pour les infections et une valeur prédictive négative élevée pour les critères de guérison. Il est cependant peu probable que les résultats soient altérés de façon significative. La majorité des infections de l'étude contenait déjà plus de 10 colonies, et la majorité des guérisons ne contenait plus la bactérie d'intérêt.

Comme expliqué précédemment, en décidant d'étudier des mammites cliniques naturelles et en choisissant de faire faire les manipulations par les producteurs, nous avons inclus une source de biais dans l'étude. Cependant nos résultats sont représentatifs de ce qui serait obtenu dans une réalité de terrain, où les infections sont naturelles et la décision de traitement revient, pour les mammites légères à modérées, aux producteurs.

Un point faible de l'étude a été le nombre de cas recrutés. Nous espérions avoir 400 cas de mammites cliniques au total, mais seulement 241 ont été recrutés. De plus, une grande proportion de cas n'a pas pu être incluse dans l'analyse bactériologique à 21 jours post-traitement. Une grande partie de ces pertes est due à notre méthode d'analyse (duplicata et critères d'infection stricts). Cela a fortement diminué la puissance des tests statistiques. L'analyse de guérison bactériologique pour les

mammites causées par des streptocoques est une situation d'analyse statistique à faible puissance. De plus nous n'avons pas pu étudier tous les agents pathogènes que nous voulions obtenir au début de l'étude (notamment *E. coli*). Au total, 63,5% des résultats pour la guérison bactériologique ont été perdus au cours de notre étude. Les causes de pertes de données observées dans notre étude sont résumées dans le tableau 10 pour les résultats de guérison bactériologique (pertes à M0 et pertes pendant le suivi).

Tableau 10. Causes et proportion des pertes de données observées pour l'évaluation bactériologique.

Cause des pertes de données	Nombre de pertes cas restants		
Total des mammites	241	-	241
Pas d'agent pathogène isolé	63	26,14%	178
Un échantillon ou plus contaminés	31	12,86%	147
Bactériologie non concordante entre les 2 duplicata	21	8,71%	126
Perte d'échantillon	19	7,88%	107
Mammite à levure ou <i>Prototheca</i>	9	3,73%	98
Erreur de date	6	2,49%	92
Autres traitements pendant le projet	2	0,83%	90
Arrêt de la prise de données	1	0,41%	89
Tarissement avant la fin du projet	1	0,41%	88

Les pertes de données ne sont pas publiées dans les articles concernant l'évaluation de l'efficacité du traitement prolongé. Un article (80) concernant la mise

en place d'une banque de données sur la mammite au Canada a observé une proportion de perte de données à l'échantillonnage des mammites cliniques de 41%, ainsi que 27% d'échantillons négatifs à la bactériologie. Le protocole d'échantillonnage était moins strict que celui de la présente étude : 1 échantillon le jour du diagnostic et 2 après le traitement entre 2 à 3 semaines puis 4 à 5 semaines après le diagnostic. L'étude de Reyher et coll. (80) a été publiée après la présente étude et ces données n'ont donc pas pu être utilisées pour établir la proportion de pertes attendues. En se basant sur les autres projets de recherche, nous avons estimé des pertes de données de l'ordre de 25% pour les échantillons négatifs à la bactériologie, et de l'ordre de 15% à l'échantillonnage. Ce dernier groupe a dépassé nos estimations principalement pour les 3 raisons suivantes : les non respects du protocole (échantillon manquant, arrêt de la prise de données ou autres traitements), les pertes par contamination, et les bactériologies non concordantes.

Notre méthode d'analyse des duplicata (les deux duplicata doivent être compatibles sinon l'échantillon est considéré comme une perte) est probablement responsable de la forte proportion de perte par contamination ou non concordance des échantillons. En effet si au moins un des 2 échantillons du duplicata était contaminé, le résultat était considéré comme contaminé. De plus si les 2 échantillons ne donnaient pas les mêmes résultats (autre que contamination), le résultat était considéré comme une perte à cause de la non concordance des échantillons. Il n'existe pas de consensus pour l'utilisation des duplicata. Nous avons choisi de limiter les faux positifs et les faux négatifs. Cela nous a donné une meilleure évaluation du traitement,

mais a aussi causé beaucoup de perte de données. Cela a probablement créé un biais pour la distribution des agents pathogènes ou pour les pourcentages de guérison. Cependant ce biais affecte de façon égale les 2 groupes ce qui en diminue l'impact.

L'exigence du protocole (durée du suivi de 21 jours et 2 échantillons à prendre à chaque temps notamment) a probablement aussi participé à augmenter les pertes, notamment celles dues au non respect du protocole. Les autres études publiées sur le traitement prolongé ont probablement eu des pertes de données au cours de la période d'observation à cause du non respect du protocole mais cela n'est jamais rapporté, seuls le nombres de cas à la fin de la période est donné. Même si le nombre et les causes de pertes étaient rapportés dans les études sur le traitement prolongé, les mammites étudiées sont sub-cliniques ou expérimentales. L'exigence du protocole est donc moins importante car le suivi peut se faire sans l'intervention du producteur. Les pertes causées par l'exigence du protocole sont donc difficilement évaluables en l'absence d'étude similaire.

Le manque de transparence (aucune information sur les duplicata ou les critères d'infection ou de guérison, ni sur le nombre de pertes) dans la littérature au moment de la réalisation du protocole expérimental et lors de la réalisation de l'étude, a probablement participé à notre sous-estimation des pertes lors de la création du protocole expérimental.

Critique de l'étude

Nous espérons avoir 400 cas de mammites cliniques au total, mais seulement 241 ont été recrutés et 63% de ces 241 cas ont été perdus pour l'analyse bactériologique. *A posteriori* nous aurions dû : recruter plus de fermes, améliorer le recrutement des cas, notamment pour les mammites légères, ou faire l'étude sur une plus longue période. Nous garderions probablement notre méthode d'analyse car, comme discuté précédemment, nous avons décidé d'être plus stricts dans notre interprétation afin d'obtenir une meilleure évaluation du traitement, bien que cela cause plus de perte de données. L'amélioration du recrutement des cas aurait pu se faire en augmentant la compensation monétaire accordée pour chaque cas ou en allant faire les échantillonnages après le traitement (M1, M2 et M3) nous-mêmes à la ferme ou en augmentant la fréquence de nos visites, mais cela aurait augmenté le coût total de l'étude.

L'étude n'a pas été réalisée en aveugle pour les producteurs contrairement à l'analyse bactériologique. Cela a pu avoir un impact sur l'évaluation clinique des animaux, notamment pour la guérison clinique. Réaliser l'étude en aveugle représente un coût supplémentaire : lait jeté 6 jours de plus pour le groupe de traitement contrôle et préparation de seringues non marquées contenant soit le véhicule de l'antibiotique seul, soit la préparation commerciale de ceftiofur. De plus augmenter le nombre de traitements intra-mammaires aurait pu augmenter le nombre de NIIM pour les individus du groupe contrôle. Les conclusions concernant l'aspect clinique

(guérison clinique et délai pour le retour à la normale) auraient cependant été potentiellement moins biaisées.

Le coût du traitement prolongé est un des désavantages du traitement prolongé. L'analyse économique dépasse le cadre de ce mémoire. Cependant les différences observées dans le pourcentage de guérison sont en faveur du traitement prolongé. Le coût supplémentaire du traitement prolongé (antibiotique et perte de lait) est-il compensé par l'augmentation du pourcentage de guérison? Le coût par guérison du traitement prolongé est comparé à celui du traitement standard dans le tableau 11. Le coût est calculé pour une vache moyenne produisant 30kg de lait par jour. Les autres paramètres pronostiques (âge, valeur de la vache, niveau de production, pression d'infection dans le troupeau, etc...) ne sont pas pris en compte.

Tableau 11. Coût par guérison des traitements standards et prolongés pour toutes les infections ou pour les infections causées par *Staphylococcus aureus* et les streptocoques.

Bactéries/catégories	Groupe de traitement	
	2 jours	8 jours
Toutes bactéries		
Pourcentage de guérison	32%	61%
Coût par guérison	468 \$	491 \$
<i>Staphylococcus aureus</i>		
Pourcentage de guérison	0%	47.4%
Coût par guérison	∞	632 \$
Streptocoques		
Pourcentage de guérison	64.3%	81%
Coût par guérison	233 \$	370 \$

Mis à part pour les infections à *S. aureus*, le coût du traitement prolongé est plus élevé que celui du traitement standard. Cependant d'autres paramètres sont à prendre en considération pour choisir le traitement : âge, parité, stade de lactation, CCS, niveau de production, hygiène du pis, statut nutritionnel, génétique, présence d'autres infections, historique de la vache, environnement et saison (32). De plus, ce calcul ne prend pas en compte les risques de récurrences s'il y a guérison clinique sans guérison bactériologique, ni le coût d'autres traitements nécessaires pour obtenir une guérison après un échec ou une récurrence, ni le risque accru de contagion si le

traitement ne fonctionne pas. Ces derniers points diminueraient le coût relatif du traitement prolongé.

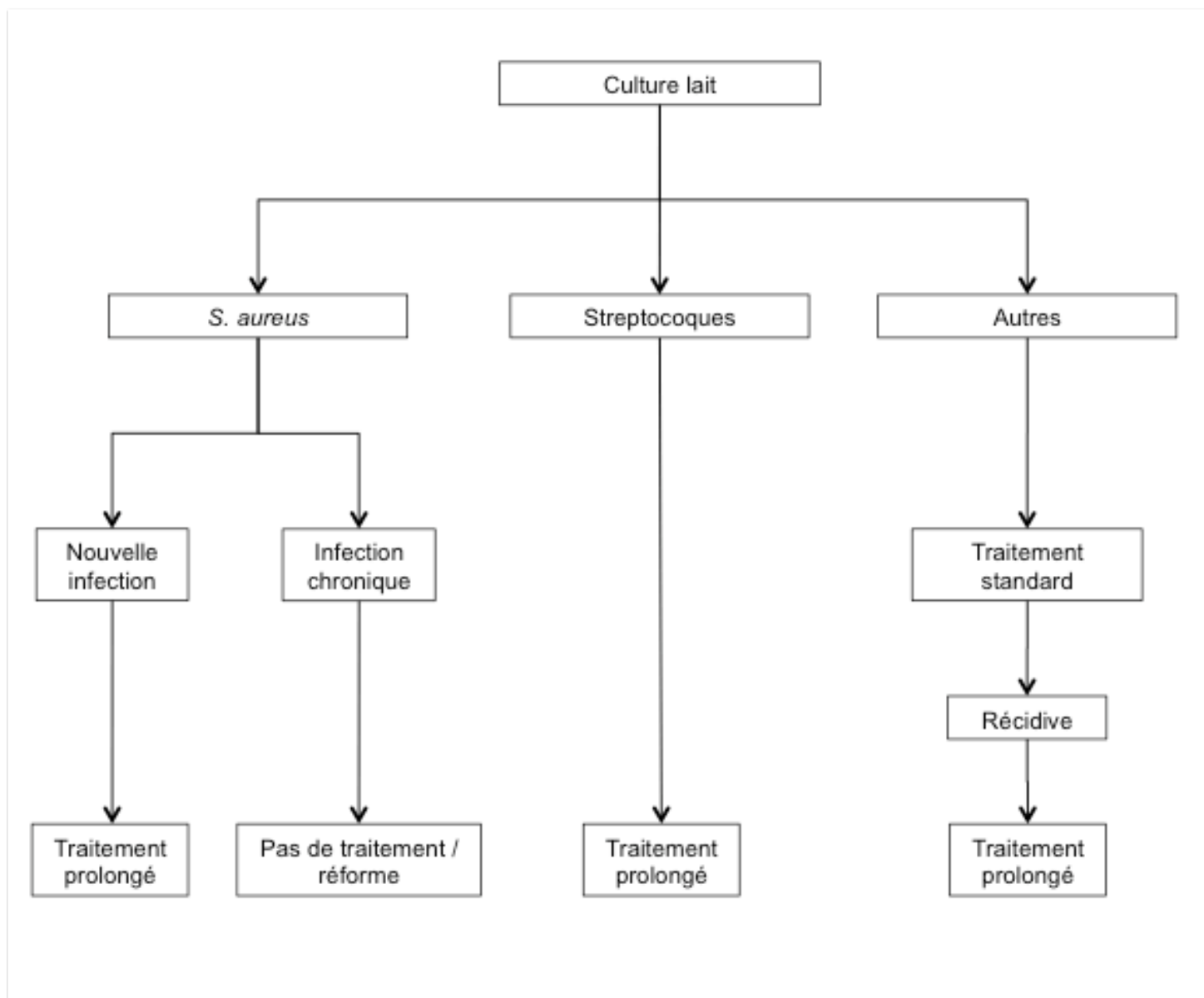
Comme détaillé dans la revue de littérature (section 3.2.3), deux études ont exploré l'analyse économique du traitement prolongé. Une dans le cadre des mammites cliniques (61) et l'autre dans le cadre des mammites sub-cliniques à *Str. uberis* et *Str. dysgalactiae* (60). Les conclusions de ces études étaient que le traitement prolongé n'est pas à utiliser comme une première ligne pour toutes les mammites, et devrait donc être réservé pour certains individus seulement. Cependant les populations étudiées et le contexte économiques ne sont pas similaires à notre étude. La distribution des étiologies, la production estimée, le prix du lait et des vaches sont notamment différents. Une distribution différente des étiologies des mammites pourrait faire varier la réponse globale au traitement antibiotique, et diminuer ou augmenter la différence de pourcentage de guérison, et donc la différence de coût, entre le traitement standard et le traitement prolongé. De plus le risque de contagion associé à certaines bactéries serait plus ou moins important selon la proportion initiale des différentes étiologies. Le prix du lait est supérieur en moyenne au Québec comparé aux chiffres utilisés dans l'étude sur les mammites cliniques. Une augmentation de coût du traitement prolongé serait donc attendue, ce qui serait en défaveur du traitement prolongé. Cependant le prix des vaches est plus élevé au Québec. L'augmentation de coût associé aux réformes serait en faveur de l'utilisation du traitement prolongé. Il serait intéressant de connaître la conclusion d'une étude économique complète faite au Québec concernant l'utilisation du traitement prolongé.

Il serait alors intéressant de tenir compte de la chronicité de l'infection (premier cas de mammites *versus* récurrence), ce qui n'a pas été fait dans les autres études.

Étant donné les chiffres estimés dans le tableau 11 et la réalité économique des élevages québécois, on estime que la différence de 23\$ total entre le coût des 2 types de traitements pour toutes bactéries confondues serait compensée par la diminution du risque de contagion et de récurrence et l'augmentation de la production laitière. Cependant, c'est une analyse très partielle qui mériterait d'être confirmée par des études appropriées.

En attendant qu'une étude économique démontre que le traitement prolongé est une solution viable pour toutes les mammites cliniques, le traitement prolongé peut être utilisé contre certaines mammites cliniques pour lesquelles il a été démontré comme efficace. L'arbre décisionnel présenté dans la figure 6 est proposé en fonction des résultats des études sur le traitement prolongé, l'importance relative des différentes espèces bactériennes dans la physiopathologie des mammites et de l'expérience clinique. Le résultat de culture de lait pourrait se faire au moyen de test diagnostique à la ferme tel que les Petrifilm et les Minnesota triplate. Le producteur peut réaliser le test, attendre le résultat le lendemain si la mammite n'est pas sévère et commencer le traitement en fonction du résultat. Le choix de l'antibiotique peut se faire en fonction de la littérature, mais devra être adapté en fonction de l'historique de traitement de l'élevage et des résultats de culture.

Figure 6. Arbre décisionnel pour le traitement des mammites cliniques légères à modérées.



Conclusion

Il s'agit de la première étude rapportant l'utilisation du traitement prolongé à base de ceftiofur pour le traitement des mammites cliniques naturelles légères à modérées. Les résultats indiquent que le traitement prolongé est plus efficace que le traitement standard pour les mammites cliniques légères à modérées, tous agents pathogènes confondus et pour les mammites cliniques légères à modérées causées par *S. aureus*. L'étude n'a pas mis en évidence de différence significative pour le traitement des mammites cliniques causées par des streptocoques.

Le traitement prolongé est un traitement coûteux, et son impact économique devrait être étudié plus précisément pour justifier ou non son utilisation de façon systématique. Pour le moment, l'utilisation du traitement prolongé devrait se faire au cas par cas en prenant en compte l'agent pathogène identifié. Bien qu'elles n'aient pas pu être prises en compte dans notre étude, la revue de littérature a montré que les caractéristiques individuelles et de troupeau doivent aussi être considérées lors de la mise en place d'un plan de traitement.

Le traitement prolongé à base de ceftiofur apparaît donc être une option thérapeutique intéressante pour les mammites cliniques naturelles légères à modérées.

Bibliographie

1. Erskine RJ, Wagner S, et DeGraves FJ. Mastitis therapy and pharmacology. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 2003;19 (1): 109-138, vi.
2. DeGraves FJ et Fetrow J. Economics of mastitis and mastitis control. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 1993;9 (3): 421-434.
3. Fetrow J, Mann D, Butcher K, et McDaniel B. Production losses from mastitis: carry-over from the previous lactation. *J Dairy Sci* 1991;74 (3): 833-839.
4. Lightner JK, Miller GY, Hueston WD, et Dorn CR. Estimation of the costs of mastitis, using National Animal Health Monitoring System and milk somatic cell count data. *J Am Vet Med Assoc* 1988;192 (10): 1410-1413.
5. Smith BP. Large animal internal medicine. 4th ed. St. Louis, Mo.: Mosby Elsevier, 2009:xlvi, 1821 p.
6. Constable PD et Morin DE. Treatment of clinical mastitis. Using antimicrobial susceptibility profiles for treatment decisions. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 2003;19 (1): 139-155.
7. Gehring R et Smith GW. An overview of factors affecting the disposition of intramammary preparations used to treat bovine mastitis. *J Vet Pharmacol Ther* 2006;29: 237-241.
8. Frandson RD. Anatomy And Physiology of Farm Animals. sixth edition ed: Lippincott Williams & Wilkins, 2003.
9. McManaman JL et Neville MC. Mammary physiology and milk secretion. *Adv Drug Deliv Rev* 2003;55 (5): 629-641.
10. Ziv G. Drug selection and use in mastitis: systemic vs local therapy. *J Am Vet Med Assoc* 1980;176 (10 Spec No): 1109-1115.
11. Gruet P, Maincent P, Berthelot X, et Kaltsatos V. Bovine Mastitis and intramammary drug delivery : review and perspectives. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2001;50: 245-259.
12. Akers RM. Lactation and the Mammary glands: Iowa State Press, 2002.

13. Ehinger AM et Kietzmann M. Tissue Distribution of benzyl-penicillin after intramammary administration in the isolated perfused bovine udder. *J Vet Pharmacol Ther* 2000;23: 303-310.
14. Ehinger AM et Kietzmann M. Tissue Distribution of oxacillin and ampicillin after intramammary administration in the isolated perfused bovine udder. *journal of veterinary Medicine A, Physiology, Pathology, Clinical Medicine* 2000;47: 157-168.
15. Ziv G et Sulman FG. Absorption of antibiotics by the bovine udder. *J Dairy Sci* 1975;58 (11): 1637-1644.
16. Ziv G. Practical pharmacokinetics aspects of mastitis therapy - 3 : intramammary treatment. *Veterinary Medicine/Small Animal Clinician* 1980;75: 657-670.
17. Mercer HD, Geleta JN, Porteous LA, et Condon RJ. Excretion of penicillin G and dihydrostreptomycin from quarters of cows with experimentally induced staphylococcal mastitis. *Am J Vet Res* 1974;35: 1191-1196.
18. Lintner TJ et Eberhart RJ. Effects of antibiotics on phagocyte recruitment, function, and morphology in the bovine mammary gland during the early nonlactating period. *Am J Vet Res* 1990;51 (4): 533-542.
19. Nickerson SC, Paape MJ, et Dulin AM. Effect of antibiotics and vehicles on bovine mammary polymorphonuclear leukocyte morphologic features, viability, and phagocytic activity in vitro. *Am J Vet Res* 1985;46 (11): 2259-2265.
20. Mercer HD, Geleta JN, Schultz EJ, et Wright WW. Milk-out rates for antibiotics in intramammary infusion products used in the treatment of bovine mastitis : relationship of somatic cell counts, milk production level and drug vehicle. *Am J Vet Res* 1970;31: 1549-1460.
21. Whittam T. Pharmacokinetics and milk discard times of pirlimycine after intramammary infusion : a population approach. *J Vet Pharmacol Ther* 1999;22: 41-51.

22. Smith GW, Gehring R, Riviere JE, Yeatt JL, et Baynes RE. Elimination kinetics of Ceftiofur hydrochloride after intramammary administration in lactating dairy cows. *J Am Vet Med Assoc* 2004;224: 1827-1830.
23. Owens WE et Nickerson SC. Treatment of Staphylococcus aureus Mastitis with Penicillin and Novobiocin : Antibiotic Concentrations and Bacteriologic Status in Milk and Mammary Tissue. *J Dairy Sci* 1990;73: 115-124.
24. Sweeney RW, Fennell MA, Smith CM, et Bardalaye PC. Systemic absorption of gentamycin following intramammary administration to cows with mastitis. *J Vet Pharmacol Ther* 1996;19: 155-157.
25. Jacobs J, Klasens M, et Penning A. Elimination of penicillin from normal and mastitic udder quarters after intramammary treatment. *Tijdschrift der Diergeneskunde* 1971;96: 721-730.
26. Vilim A, Larocque L, et Macintosh A. Depletion of brilliant blue F.C.F. penicillin G and dihydrostreptomycin in milk treated does with experimentally induced mastitis. *Journal of Food Protection* 1980;43: 356-359.
27. Van Eenennaam AL, Gardner IA, Holmes J, Perani L, Anderson RJ, Cullor JS, et Guterbock WM. Financial analysis of alternative treatments for clinical mastitis associated with environmental pathogens. *J Dairy Sci* 1995;78 (9): 2086-2095.
28. Morin DE, Shanks RD, et McCoy GC. Comparison of antibiotic administration in conjunction with supportive measures versus supportive measures alone for treatment of dairy cows with clinical mastitis. *J Am Vet Med Assoc* 1998;213 (5): 676-684.
29. Cattel MB. An outbreak of streptococci uberis as a consequence of adopting a protocol of no antibiotic therapy for clinical mastitis. *Proceeding of the 35th National Mastitis Council Annual Meeting* 1996: 123.
30. Hillerton JE et Semmens JE. Comparison of treatment of mastitis by oxytocin or antibiotics following detection according to changes in milk electrical conductivity prior to visible signs. *J Dairy Sci* 1999;82 (1): 93-98.

31. Morin DE. Mammary Gland Health and Disorders. In: BP Smith, ed. Large Animal Internal Medicine. fourth ed. St. Louis, Mo.: Mosby Elsevier, 2009.
32. Radostits OM, Done SH, et Blood DC. Veterinary medicine : a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats. 10th ed. New York: Elsevier Saunders, 2007:xxii, 2156 p.
33. Makovec JA et Ruegg PL. Results of milk samples submitted for microbiological examination in Wisconsin from 1994 to 2001. J Dairy Sci 2003;86 (11): 3466-3472.
34. Hogan JS, Smith KL, Hoblet KH, Schoenberger PS, Todhunter DA, Hueston WD, Pritchard DE, Bowman GL, Heider LE, Brockett BL, et et al. Field survey of clinical mastitis in low somatic cell count herds. J Dairy Sci 1989;72 (6): 1547-1556.
35. Bradley AJ, Leach KA, Breen JE, Green LE, et Green MJ. Survey of the incidence and aetiology of mastitis on dairy farms in England and Wales. Vet Rec 2007;160 (8): 253-257.
36. Koivula M, Pitkälä A, Pyörälä S, et Mäntysaari E. Distribution of bacteria and seasonal and regional effects in a new database for mastitis pathogens in Finland. Acta Agric Scand A 2007;57: 89-96.
37. Nevala M, Taponen S, et Pyörälä S. Bovine Etiology of bovine clinical mastitis - Data from Saari Ambulatory Clinic in 2002-2003. Suomen Eläinlääkärilehti (Finnish Vet J) 2004;110: 363-369.
38. Olde Riekerink RG, Barkema HW, Kelton DF, et Scholl DT. Incidence rate of clinical mastitis on Canadian dairy farms. J Dairy Sci 2008;91 (4): 1366-1377.
39. Eberhart RJ, Natzke RP, Newbould FHS, et Nonnecke B. Coliform Mastitis - A Review. J Dairy Sci 1979;62 (1): 1-22.
40. Smith KL, Todhunter DA, et Schoenberger PS. Environmental mastitis: cause, prevalence, prevention. J Dairy Sci 1985;68 (6): 1531-1553.
41. Sears PM. Shedding pattern of Staphylococcus aureus from bovine intramammary infections. J Dairy Sci 1990;73.

42. Dinsmore RP, English PB, Gonzalez RN, et Sears PM. Use of augmented cultural techniques in the diagnosis of the bacterial cause of clinical bovine mastitis. *J Dairy Sci* 1992;75 (10): 2706-2712.
43. Schukken YH, Grommers FJ, Smit JA, Vandegeer D, et Brand A. Effect of freezing on bacteriologic culturing of mastitis milk samples. *J Dairy Sci* 1989;72 (7): 1900-1906.
44. McCarron JL, Keefe GP, McKenna SL, Dohoo IR, et Poole DE. Evaluation of the University of Minnesota Tri-plate and 3M Petrifilm for the isolation of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus* species from clinically mastitic milk samples. *J Dairy Sci* 2009;92 (10): 5326-5333.
45. McCarron JL, Keefe GP, McKenna SL, Dohoo IR, et Poole DE. Laboratory evaluation of 3M Petrifilms and University of Minnesota Bi-plates as potential on-farm tests for clinical mastitis. *J Dairy Sci* 2009;92 (5): 2297-2305.
46. Silva BO, Caraviello DZ, Rodrigues AC, et Ruegg PL. Evaluation of Petrifilm for the isolation of *Staphylococcus aureus* from milk samples. *J Dairy Sci* 2005;88 (8): 3000-3008.
47. Koskinen MT, Wellenberg GJ, Sampimon OC, Holopainen J, Rothkamp A, Salmikivi L, van Haeringen WA, Lam TJ, et Pyorala S. Field comparison of real-time polymerase chain reaction and bacterial culture for identification of bovine mastitis bacteria. *J Dairy Sci* 2010;93 (12): 5707-5715.
48. Taponen S, Salmikivi L, Simojoki H, Koskinen MT, et Pyorala S. Real-time polymerase chain reaction-based identification of bacteria in milk samples from bovine clinical mastitis with no growth in conventional culturing. *J Dairy Sci* 2009;92 (6): 2610-2617.
49. Andersen S, Dohoo IR, Olde Riekerink R, et Stryhn H. Diagnosing intramammary infections: evaluating expert opinions on the definition of intramammary infection using conjoint analysis. *J Dairy Sci* 2010;93 (7): 2966-2975.

50. Dohoo IR, Smith J, Andersen S, Kelton DF, et Godden S. Diagnosing intramammary infections: evaluation of definitions based on a single milk sample. *J Dairy Sci* 2011;94 (1): 250-261.
51. Schukken YH, Wilson DJ, Welcome F, Garrison-Tikofsky L, et Gonzalez RN. Monitoring udder health and milk quality using somatic cell counts. *Vet Res* 2003;34 (5): 579-596.
52. Pyorala S et Pyorala E. Accuracy of methods using somatic cell count and N-acetyl-beta-D-glucosaminidase activity in milk to assess the bacteriological cure of bovine clinical mastitis. *J Dairy Sci* 1997;80 (11): 2820-2825.
53. Wilson CD. The control of bovine mastitis. *Vet Rec* 1952;64 (36): 525-530.
54. Prescott JF, Baggot JD, et Walker RD. *Antimicrobial Therapy*. 3rd edition ed: Iowa State University Press, 2000.
55. Gillespie BE, Moorehead H, Lunn P, Dowlen HH, Johnson DL, Lamar KC, Lewis MJ, Ivey SJ, Hallberg JW, Chester ST, et Oliver SP. Efficacy of extended pirlimycin hydrochloride therapy for treatment of environmental *Streptococcus* spp and *Staphylococcus aureus* intramammary infections in lactating dairy cows. *Vet Ther* 2002;3 (4): 373-380.
56. Deluyker HA, Oye SNV, et Boucher JF. Factors affecting cure and somatic cell count after pirlimycin Treatment of subclinical mastitis in lactating cows. *J Dairy Sci* 2005;88: 604-614.
57. Middleton JR et Luby CD. *Escherichia coli* mastitis in cattle being treated for *Staphylococcus aureus* intramammary infection. *Vet Rec* 2008;162 (5): 156-157.
58. Munoz M, Zurakowski M, et Schukken Y. Coliform Mastitis Outbreak associated with the extended Pirlimycine-based intramammary therapy. *NMC Annual Meeting Proceedings* 2009;48: 142-143.
59. Roy JP, DesCoteaux L, DuTremblay D, Beaudry F, et Elsener J. Efficacy of a 5-day extended therapy program during lactation with cephapirin sodium in dairy

- cows chronically infected with *Staphylococcus aureus*. *Can Vet J* 2009;50 (12): 1257-1262.
60. Swinkels JM, Rooijendijk JGA, Zadoks RN, et Hogeveen H. Use of partial budgetting to determine the economic benefits of antibiotic treatment of chronic sub-clinical mastitis caused by *Streptococcus uberis* or *Streptococcus dysgalactiae*. *Journal of Dairy Research* 2005;72: 75-85.
 61. Pinzon-Sanchez C, Cabrera VE, et Ruegg PL. Decision tree analysis of treatment strategies for mild and moderate cases of clinical mastitis occurring in early lactation. *J Dairy Sci* 2011;94 (4): 1873-1892.
 62. Hornish RE et Kotarski SF. Cephalosporins in veterinary medicine - ceftiofur use in food animals. *Curr Top Med Chem* 2002;2 (7): 717-731.
 63. Jones RN et Pfaller MA. Bacterial resistance: a worldwide problem. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1998;31 (2): 379-388.
 64. Owens WE, Xiang ZY, Ray CH, et Nickerson SC. Determination of milk and mammary tissue concentrations of ceftiofur after intramammary and intramuscular therapy. *J Dairy Sci* 1990;73 (12): 3449-3456.
 65. Yancey RJ, Jr., Kinney ML, Roberts BJ, Goodenough KR, Hamel JC, et Ford CW. Ceftiofur sodium, a broad-spectrum cephalosporin: evaluation in vitro and in vivo in mice. *Am J Vet Res* 1987;48 (7): 1050-1053.
 66. Oliver SP, Almeida RA, Gillespie BE, Headrick SJ, Dowlen HH, Johnson DL, Lamar KC, Chester ST, et Moseley WM. Extended ceftiofur therapy for treatment of experimentally-induced *Streptococcus uberis* mastitis in lactating dairy cattle. *J Dairy Sci* 2004;87 (10): 3322-3329.
 67. Oliver SP, Almeida RA, Gillespie BE, Ivey SJ, Moorehead H, Lunn P, Dowlen HH, Johnson DL, et Lamar KC. Efficacy of extended pirlimycin therapy for treatment of experimentally induced *Streptococcus uberis* intramammary infections in lactating dairy cattle. *Vet Ther* 2003;4 (3): 299-308.
 68. Hillerton JE et Kliem KE. Effective treatment of *Streptococcus Uberis* Clinical Mastitis to minimize the Use of Antibiotics. *J Dairy Sci* 2002;85: 1009-1014.

69. Deluyker HA, Michaenek P, Wuyts N, VanOye SN, et Chester ST. We Treat Sick Cows Don't We ? The Case of Subclinical Mastitis. National Mastitis Council Annual Meeting Proceedings 2001: 170-174.
70. Taponen S, Dredge K, Henriksson B, Pyyhtia AM, Suojala L, Junni R, Heinonen K, et Pyorala S. Efficacy of intramammary treatment with procaine penicillin G vs. procaine penicillin G plus neomycin in bovine clinical mastitis caused by penicillin-susceptible, gram-positive bacteria--a double blind field study. *J Vet Pharmacol Ther* 2003;26 (3): 193-198.
71. Oliver SP, Gillespie BE, Headrick SJ, Moorehead H, Lunn P, Dowlen HH, Johnson DL, Lamar KC, Chester ST, et Moseley WM. Efficacy of extended ceftiofur intramammary therapy for treatment of subclinical mastitis in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 2004;87 (8): 2393-2400.
72. Dopfer D, Barkema HW, Lam TJ, Schukken YH, et Gaastra W. Recurrent clinical mastitis caused by *Escherichia coli* in dairy cows. *J Dairy Sci* 1999;82 (1): 80-85.
73. Sargeant JM, Scott HM, Leslie KE, Ireland MJ, et Bashiri A. Clinical mastitis in dairy cattle in Ontario: frequency of occurrence and bacteriological isolates. *Can Vet J* 1998;39 (1): 33-38.
74. Adkinson RW, Ingawa KH, Blouin DC, et Nickerson SC. Distribution of clinical mastitis among quarters of the bovine udder. *J Dairy Sci* 1993;76 (11): 3453-3459.
75. McDougall S. Efficacy of two antibiotic treatments in curing clinical and subclinical mastitis in lactating dairy cows. *N Z Vet J* 1998;46 (6): 226-232.
76. McDougall S, Agnew KE, Cursons R, Hou XX, et Compton CR. Parenteral treatment of clinical mastitis with tylosin base or penethamate hydriodide in dairy cattle. *J Dairy Sci* 2007;90 (2): 779-789.
77. Miltenburg JD, de Lange D, Crauwels AP, Bongers JH, Tielen MJ, Schukken YH, et Elbers AR. Incidence of clinical mastitis in a random sample of dairy herds in the southern Netherlands. *Vet Rec* 1996;139 (9): 204-207.

78. Petrovski KR, Heuer C, Parkinson TJ, et Williamson NB. The incidence and aetiology of clinical bovine mastitis on 14 farms in Northland, New Zealand. *N Z Vet J* 2009;57 (2): 109-115.
79. Roberson JR. Establishing treatment protocols for clinical mastitis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 2003;19 (1): 223-234, viii.
80. Reyher KK, Dufour S, Barkema HW, Des Coteaux L, Devries TJ, Dohoo IR, Keefe GP, Roy JP, et Scholl DT. The National Cohort of Dairy Farms--a data collection platform for mastitis research in Canada. *J Dairy Sci* 2010;94 (3): 1616-1626.