

ESSAIS DE PRÉVENTION DE LA MAMMITE EXPÉRIMENTALE À *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* PAR IMMUNISATION ET INSERTION INTRAMAMMAIRE D'UNE BOUCLE DE POLYÉTHYLÈNE (STÉRILAIT)

B. POUTREL¹, M.J. PAAPE², Catherine LERONDELLE¹ et R. GRAPPIN³

¹ Institut National de la Recherche Agronomique,

Station de Pathologie de la Reproduction, 37380 Nouzilly, France

² USDA, Milk Secretion and Mastitis Laboratory, Beltsville, MD 20705, USA

³ Institut National de la Recherche Agronomique,

Station Expérimentale Laitière, 39800 Poligny, France

Summary

ATTEMPT TO PREVENT STAPHYLOCOCCAL EXPERIMENTAL MASTITIS BY IMMUNISATION AND INSERTION OF AN INTRAMAMMARY POLYETHYLENE DEVICE. — The susceptibility of lactating cows to experimental challenge with two strains of *Staphylococcus aureus* was investigated 30 days after calving. These cows were previously immunized during the dry-period and udder quarters were fitted at drying-off with a polyethylene intramammary device (IMD). Incidence of infection recorded in device-fitted quarters and control quarters was not significantly different.

There was no difference between IMD-fitted and control quarters in milk yield, contents in butterfat and protein. Lactose mean concentration was significantly decreased in milk collected from quarters fitted with polyethylene loop ($P < 0.05$). The somatic cell counts in milk from quarters depended on: a) fraction collected, b) time of sampling, c) presence of intramammary loop, d) result of experimental challenge.

Milk somatic-cell counts determined at mid-lactation for fractions collected before udder stimulation and total milk in IMD fitted quarters were greater than for control quarters ($P < 0.05$). In general these differences were greater in quarters which were experimentally infected than uninfected quarters. The count in total milk collected at mid-lactation for uninfected device-fitted quarters averaged 720 000 cells/ml.

Les méthodes de contrôle des infections mammaires de la vache laitière actuellement préconisées et utilisées visent à réduire la fréquence des nouvelles infections et leur persistance (Dodd *et al.*, 1977). Or ces méthodes ont des limites matérielles et conceptuelles, d'où l'intérêt de stimuler localement un mécanisme

de résistance. La phagocytose par les polynucléaires neutrophiles (PN) est considérée comme le mécanisme essentiel de défense contre les différentes espèces bactériennes impliquées dans les mammites (Paape *et al.*, 1979). Son efficacité est plus grande lorsque les PN préexistent en quantité importante avant

l'entrée des bactéries. Ainsi une concentration cellulaire supérieure à 500 000 cellules/ml de lait constitue une barrière cellulaire capable de prévenir des infections intramammaires expérimentales à *Staphylococcus aureus* (Poutrel et Lerondelle, 1978) ou à *Enterobacter aerogenes* (Schalm *et al.*, 1964). Or dans un lait provenant d'un quartier non-infecté la concentration des PN et des macrophages, qui constituent 80 à 90 % de la population cellulaire totale (Lee *et al.*, 1980) est toujours inférieure à ce seuil. Il a été montré à l'aide d'infections expérimentales réalisées avec un petit nombre de bactéries (Murphy et Stuart, 1953 ; Newbould et Neave, 1965) que la concentration en PN dans le quartier devenait importante 24 h après l'infection, vraisemblablement trop tard pour contrecarrer le développement du processus infectieux. De plus, une concentration cellulaire importante témoigne de l'inflammation, et le seuil de 500 000 cellules/ml est ainsi pris en compte pour estimer l'état sanitaire d'un troupeau et pour décider de la nécessité de l'application des méthodes de contrôle dans un troupeau.

Il a été rapporté (Paape *et al.*, 1981) que l'insertion d'une boucle de polyéthylène dans un quartier (stérilait) soit en lactation, soit au tarissement pouvait induire une légère inflammation se traduisant par une augmentation de concentration cellulaire dans les échantillons de lait recueillis avant stimulation de la mamelle, dans les laits d'égouttage et dans les laits résiduels, donc entre les traites. Par contre, les auteurs n'ont pas mis en évidence de différence significative entre les quartiers avec stérilait et les quartiers témoins pour la numération cellulaire effectuée sur le lait de la traite totale. D'autre part, une infection expérimentale à *Staphylococcus aureus* était établie dans 50 % des quartiers comportant un stérilait, contre 90 % dans les quartiers témoins.

L'efficacité de la phagocytose peut être renforcée par des anticorps opsonisants (Wisniowski *et al.*, 1965 ; Newbould, 1970 ; Guidry *et al.*, 1977), appartenant à la classe des IgG. Chez les bovins les deux sous-classes IgG1 et IgG2 peuvent pénétrer, à partir de la circulation sanguine, dans la glande mammaire, soit par un mécanisme sélectif de transport pour les IgG1 (Lascelles, 1979), soit par adhérence aux PN pour les IgG2 (Watson, 1976), soit passivement pour les deux sous-classes lorsqu'il y a inflammation (Lascelles, 1979). L'insertion d'un stérilait et sa persistance dans la glande mammaire durant la lactation simulent certaines caractéristiques physiologiques observées après la phase aiguë de l'inflammation (Harmon *et al.*,

1976). Il a notamment été rapporté par Paape *et al.*, (1981) une augmentation significative des concentrations en séralbumine bovine et en IgG2. Il est donc concevable d'obtenir localement une meilleure protection par immunisation en mettant à profit l'augmentation du taux de transfert des protéines du sang vers la mamelle due à la présence du stérilait.

Le but de ce travail était :

1. de confirmer l'intérêt éventuel du stérilait, placé au tarissement, en vérifiant notamment son effet sur la numération cellulaire,
2. d'étudier sa valeur lorsqu'il était associé à une immunisation par voie systémique dans un modèle d'infection expérimentale intramammaire à *Staphylococcus aureus*.

Matériel et Méthodes

Schéma général de l'expérience

Au total 14 vaches croisées Holstein-Frisonnes du troupeau expérimental de la Station, dont les quatre quartiers ont été reconnus comme non infectés au moment du tarissement, ont été utilisées.

Quatre groupes ont été constitués selon le type d'intervention prodigué (tabl. 1).

Un tarissement « brutal » était pratiqué sur tous les animaux, deux mois avant la date présumée du vêlage.

Insertion du stérilait

Un fil de polyéthylène de 2 mm de diamètre et de 120 mm de long, formant une boucle de 30 mm de diamètre (stérilait) a été introduit après stérilisation (120 °C, 15 min) au niveau du sinus lactifère, à l'aide d'un cathéter, selon la technique précédemment décrite (Paape *et al.*, 1981). Toutes les vaches des groupes 1 et 2 ont reçu ce stérilait dans deux de leurs quartiers désignés par randomisation, immédiatement après la dernière traite.

Immunisation

Deux souches de *S. aureus* 106-6 et 107-59 précédemment isolées de mammites bovines ont été cultivées en milieu Pattison (Pattison et Matthews, 1975), à 37 °C. Chacune des cultures a été interrompue en phase exponentielle de croissance et le surnageant éliminé par centrifugation (2500 g × 20 min). Les bactéries ont été inactivées par addition de formol à 3 % (4 °C, trois jours) et l'inactivation contrôlée par culture. Après trois lavages en eau physiologi-

Tableau 1. — Schéma général de l'expérimentation

Groupe (nombre de vaches)	Type d'intervention		
	Insertion d'un stérilait	Immunisation	Inoculation d'épreuve
1 (6)	oui	oui	oui
2 (3)	oui	non	oui
3 (3)	non	oui	oui
4 (2)	non	non	oui

que, les inoculums ont été ajustés à 1×10^9 bactéries/ml par mesure de la densité optique (Beckman DB) à 600 nm et conservés sous forme de petites fractions, congelées à -20°C . Au moment de l'emploi, un volume égal d'adjuvant (Arlacel A : 9,9 g ; Tween 20 : 6,6 g ; Bayol « F » QSP 200 ml) était ajouté et le mélange homogénéisé à la seringue (Plommet et Bézard, 1974). Les vaches des groupes 1 et 3 ont reçu deux injections de 2 ml de l'un ou l'autre des inoculums, dans la région du ganglion supra-mammaire, la première deux semaines et la seconde cinq semaines après le tarissement.

Inoculation d'épreuve

Tous les animaux de l'expérimentation ont reçu une inoculation d'épreuve dans les quatre quartiers, 30 jours après le vêlage, le groupe 4 constituant le groupe témoin. La préparation de l'inoculum (100 bactéries/0,2 ml) et la technique d'inoculation dans les quartiers ont été précédemment décrites (Poutrel et Lerondelle, 1978). Chaque vache a été éprouvée avec les deux souches (106-6 et 107-59) de telle manière que les animaux des groupes 1 et 2 ayant deux quartiers comportant un stérilait recevaient l'une ou l'autre des deux souches dans ces quartiers. La sélection des quartiers pour les animaux des groupes 3 et 4 a été effectuée par randomisation.

Prélèvements des fractions de lait

Pour analyser l'influence du stérilait sur la concentration cellulaire, cinq types de fractions de lait, collectées 15, 150 et 270 jours après le vêlage, ont été considérées. Une première fraction d'environ 10 ml était collectée avant stimulation de la mamelle par lavage. La deuxième fraction d'environ 20 ml était prélevée immédiatement après lavage et stimulation de la mamelle. Un aliquot de la traite totale du quartier, réalisée avec une machine permettant la traite

par quartier, constituait la troisième fraction. La quatrième fraction était constituée du lait d'égouttage. Le lait résiduel correspondant à la cinquième fraction était obtenu par injection d'ocytocine (10 UI) dans la veine caudale.

Comptage des cellules somatiques et analyses bactériologiques

Le comptage des cellules totales a été réalisé dans les différentes fractions avec un Coulter Counter selon la méthode recommandée par la Fédération Internationale de Laiterie (1979). Le comptage a également été réalisé sur les premiers jets de lait de quartier recueillis aseptiquement après désinfection de l'extrémité des trayons avec de l'éthanol à 70 %, aux périodes suivantes : 30 et 15 jours avant le tarissement, le jour du tarissement, le jour du vêlage 2, 4, 10, 15, 20 et 30 jours après le vêlage, puis tous les 30 jours jusqu'au tarissement suivant.

Les examens bactériologiques ont été effectués par ensemencement d'un aliquot (25 μl) de ces échantillons avec une anse calibrée sur une gélose au sang de mouton incubée 48 h à 37°C .

Les comptages cellulaires et les analyses bactériologiques ainsi réalisés ont permis d'avoir un suivi du statut infectieux des quartiers entrant dans l'expérience tout au long de la lactation.

Composition du lait

Les teneurs en matière grasse, protéines

$$(N \text{ total} - \text{NPN}) \times 6,39$$

et lactose des échantillons de lait constitués d'un aliquot de la traite totale du soir de chaque quartier ont été déterminées par spectrophotométrie infrarouge à l'aide d'un appareil Milko-Scan 203 B (Foss-Electric, Hillerød, Danemark) dont le calibrage a été vérifié par rapport aux méthodes de référence (Grappin et Jeunet, 1976).

Tableau 2. — Comparaison de la production et de la composition (concentrations moyennes) des laits prélevés 15 jours après le vêlage entre les quartiers avec et sans stérilait.

	Quartiers avec stérilait	Quartiers sans stérilait
Production (kg)	2,54 ± 0,54 a	2,72 ± 0,73 a
<i>Composants</i>		
lactose (g/l)	47,37 ± 3,13 a	49,1 ± 2,17 b
matière grasse (g/kg)	43,09 ± 8,67 a	42,4 ± 7,19 a
protéines totales (g/kg)	33,11 ± 6,5 a	32,93 ± 3,92 a

a, b : les moyennes arithmétiques qui, sur une même ligne, ne sont pas affectées de la même lettre différent entre elles (test t ; P < 0,05).

Résultats et Discussion

Production et composition du lait (tabl. 2)

L'insertion d'un stérilait n'a pas modifié la production laitière ni les concentrations en matière grasse et en protéines totales. Ces résultats confirment ceux obtenus précédemment par Paape *et al.* (1981). Par contre, la teneur en lactose des quartiers avec stérilait est inférieure à celle des quartiers témoins. Bien que statistiquement significative cette diminution n'est pas importante en valeur absolue (3,5 %) et l'ensemble de ces résultats indique que le stérilait n'exerce pas une action inhibitrice importante sur l'activité sécrétoire de la glande mammaire.

Concentrations cellulaires des différentes fractions de lait (tabl. 3 et 4)

Aussi bien dans les quartiers infectés que dans les quartiers non infectés, qu'ils comportent ou non un stérilait, la concentration cellulaire dépend de la fraction de lait considérée. Les fractions ayant généralement les concentrations les plus élevées sont les laits recueillis avant stimulation de la mamelle, les laits d'égouttage et les laits résiduels.

— Quartiers non infectés (tabl. 3)

Dans tous les quartiers non infectés il y a une augmentation significative des concentrations cellulaires des échantillons recueillis à mi-lactation comparées à ceux recueillis en début de lactation pour les fractions suivantes : avant stimulation, premiers jets et traite totale. L'influence du stade de lactation sur la numération cellulaire effectuée sur les premiers jets a déjà été rapportée (Blackburn, 1966).

Pour un stade de lactation donné, l'insertion d'un stérilait se traduit par quasiment un doublement du nombre de cellules dans les laits

recueillis avant stimulation, les premiers jets et les laits de traite totale. Les différences ainsi relevées dans ces fractions entre les quartiers insérés et les quartiers témoins sont plus accentuées à mi-lactation. L'effet du stérilait sur l'augmentation de la concentration cellulaire est donc un phénomène durable, ce qui est essentiel si l'on vise la prévention des infections durant toute la lactation. Cependant si la moyenne relevée au 15^e jour de lactation pour la traite totale des quartiers avec stérilait (230 000/ml) apparaît compatible avec le seuil (500 000/ml) pris en considération par la Fédération Internationale Laitière (1979) pour définir un lait normal, il n'en est pas de même pour la valeur trouvée à mi-lactation (720 000/ml). Alors que Paape *et al.* (1981) avaient mis en évidence des différences significatives entre quartiers avec stérilait et quartiers témoins pour toutes les fractions considérées, excepté le lait de la traite totale, Brooks et Barnum (1982) relèvent des différences uniquement entre les laits d'égouttage et non entre les premiers jets. Ces discordances, outre le stade de lactation dont nous avons souligné l'influence dans ce travail, peuvent être le reflet de différences importantes entre les animaux, tant sur les plans génétique que pathologique et physiologique.

— Quartiers infectés expérimentalement par *Staphylococcus aureus* (tabl. 4)

L'établissement de l'infection se traduit par une augmentation importante du nombre de cellules totales. Les laits des premiers jets et de la traite totale des quartiers sans stérilait ont des numérations cellulaires moyennes supérieures à 700 000 cellules/ml à mi-lactation, sensiblement équivalentes à celles trouvées pour les quartiers non infectés et comportant un stérilait.

Pour toutes les fractions analysées, excepté le lait résiduel, les quartiers infectés avec stéri-

lait ont des concentrations cellulaires significativement plus élevées que celles des quartiers infectés sans stérilait, et ce, quel que soit le stade de lactation considéré. Les différences entre les numérations cellulaires des quartiers avec et sans stérilait se trouvent amplifiées par rapport à celles observées pour ces quartiers lorsqu'ils ne sont pas infectés. Ainsi l'infection et le stérilait semblent avoir un effet synergique sur la numération cellulaire. Nous n'avons cependant dans cette expérience jamais noté une réaction cellulaire d'une intensité telle qu'il puisse y avoir des modifications de l'aspect du lait et/ou des signes cliniques de mammites.

L'influence du stade de lactation sur la numé-

ration cellulaire déjà observée dans les quartiers non infectés, se trouve confirmée pour les premiers jets et les laits de traite totale.

Inoculation intramammaire d'épreuve par Staphylococcus aureus (tabl. 5)

Dans cette étude les quartiers comportant un stérilait n'offrent pas une protection supérieure aux quartiers témoins pour la prévention des infections expérimentales à *Staphylococcus aureus* puisque l'infection s'est établie respectivement dans 79 et 86 % des quartiers. Ces résultats sont moins favorables que ceux rapportés d'une part par Paape *et al.* (1981) et par Brooks et Barnum (1982) qui obtiennent une

Tableau 3. — Evolution au cours de la lactation des moyennes des numérations cellulaires des différentes fractions de lait recueillies dans les quartiers non-infectés, avec ou sans stérilait.

Fractions de lait analysées	Numérations cellules ($\times 10^3$ /ml)			
	Quartiers avec stérilait lactation (jours)		Quartiers sans stérilait lactation (jours)	
	15	150	15	150
Avant stimulation	313 b,c	1095 a	134 c	413 b
Premiers jets	160 b	391 a	113 c	232 a,b
Traite totale	230 b	720 a	134 c	291 b
Egouttage	571 a	896 a	653 a	438 a
Résiduel	1145 a	961 a	1133 a	528 a

a, b, c, : les moyennes arithmétiques qui, sur une même ligne, ne sont pas affectées de la même lettre différent entre elles (test t ; $P < 0,05$).

Tableau 4. — Evolution au cours de la lactation des moyennes des numérations cellulaires des différentes fractions de lait recueillies dans les quartiers avec ou sans stérilait, infectés expérimentalement par *Staphylococcus aureus*.

Fractions de lait analysées	Numérations cellules ($\times 10^3$ /ml)			
	Quartiers avec stérilait lactation (jours)		Quartiers sans stérilait lactation (jours)	
	150	270	150	270
Avant stimulation	5409 a	4445 a	1832 b	1906 b
Premiers jets	1626 a	2955 b	705 c	1303 a
Traite totale	1863 a	3766 b	778 c	1385 a
Egouttage	4851 a	4292 a	1554 b	1565 b
Résiduel	2957 a	4041 a	2138 ab	1611 b

a, b, c, : les moyennes arithmétiques qui, sur une même ligne, ne sont pas affectées de la même lettre différent entre elles (test t ; $P < 0,05$).

Tableau 5. — Etablissement de l'infection dans les quartiers avec ou sans stérilait d'animaux immunisés ou non immunisés, après une inoculation d'épreuve avec *Staphylococcus aureus*.

Souche d'épreuve	Nombre de quartiers infectés / Nombre de quartiers éprouvés		
	Quartiers avec stérilait	Quartiers sans stérilait	Total (%)
<i>Vaches immunisées</i>			
106-6	5/6	9/11	14/17 (82)
107-59	5/7	11/12	16/19 (84)
<i>Vaches non-immunisées</i>			
106-6	2/3	4/6	6/9 (67)
107-59	3/3	6/6	9/9 (100)
Total (%)	15/19 (79)	30/35 (86)	45/54 (83)

protection de l'ordre de 50 %. Dans ces travaux le stade de lactation auquel est réalisé l'inoculation d'épreuve n'est pas précisé et les résultats précédents indiquent qu'il constitue un facteur critique quant à l'influence du stérilait sur la numération cellulaire. Nous avons réalisé l'infection expérimentale un mois après le vêlage alors que la numération cellulaire moyenne des premiers jets était inférieure à 300 000 cellules/ml. Or les études précédentes (Schalm *et al.*, 1964 ; Poutrel et Lerondelle, 1978) ont montré qu'une concentration cellulaire préexistante à l'infection et supérieure à 500 000 cellules/ml était nécessaire pour constituer une barrière efficace. Ainsi, il est possible que des résultats plus favorables auraient été enregistrés si l'infection expérimentale avait été réalisée à un stade plus avancé de la lactation. Néanmoins, compte tenu que 50 % des nouvelles infections se produisent dans les trois premiers mois de lactation (Rainard et Poutrel, 1982), il apparaît indispensable d'avoir une bonne prévention dès le vêlage.

L'immunisation réalisée dans la région du ganglion supramammaire pendant la période de tarissement avait pour but d'augmenter la quantité d'opsonines dans le lait des quartiers comportant un stérilait. Une efficacité accrue de la phagocytose aurait ainsi pu compenser le déficit en PN observé en début de lactation. En effet, d'une part une augmentation de l'immunité locale a été auparavant observée après injection d'antigène par cette voie (Chang *et al.*, 1981) et d'autre part, la présence du stérilait augmente, en raison de la légère inflammation qu'il initie, le transfert des IgG2 du sang vers la mamelle (Paape *et al.*, 1981). Or l'immunisation

n'a conféré aucune protection quelle que soit la souche d'épreuve utilisée, homologue ou hétérologue. Selon Watson (1982a) la protection conférée par l'immunisation dans la région du ganglion rétro-mammaire est imputable à la lésion inflammatoire chronique de la glande mammaire due à ce mode d'immunisation, qui facilite le transfert des immunoglobulines du sang vers le lait, et/ou, à une synthèse locale liée à la présence d'un granulome. Le stérilait pouvait prétendre réaliser cette inflammation persistante, comme l'indiquent les résultats des numérations cellulaires. Dans la seconde hypothèse, l'induction d'un granulome dépend notamment de la nature de l'antigène et de l'adjuvant qui lui est associé. Toutes les tentatives de vaccination contre les infections à *Staphylococcus aureus* réalisées jusqu'à maintenant ont échoué (Anderson, 1978) et les corps bactériens inactivés après culture que nous avons utilisés ne constituent vraisemblablement pas le meilleur matériel antigénique, dans la mesure où certains antigènes n'apparaissent qu'*in vivo* (Watson, 1982b), au cours du processus infectieux.

Les conditions d'épreuve de la protection que nous avons utilisées peuvent être considérées comme très sévères puisque dans notre modèle expérimental d'infection les microorganismes sont déposés au niveau de la citerne. Dans les mêmes conditions d'épreuve, nous avons cependant obtenu une protection de l'ordre de 80 % pour les quartiers préalablement infectés par les staphylocoques coagulase-négative (Poutrel et Lerondelle, 1980). Les expériences réalisées sur le terrain par Kortum (1980) n'ont pas permis de mettre en évidence une diminu-

tion des infections « naturelles » pour les vaches dont les quartiers comportaient un stérilait. Il est concevable que l'utilisation du stérilait puisse dans l'avenir, associée à une immunisation réalisée dans des conditions optimales de stimulation de l'immunité, contribuer à une meilleure protection de la mamelle. Cependant, le préalable indispensable à son utilisation sur

le terrain, est qu'il n'affecte pas la numération cellulaire dans des limites incompatibles avec les normes actuellement établies de qualité du lait, quels que soient le stade et le nombre de lactation des animaux.

Accepté pour publication, le 26 septembre 1982.

Résumé

La sensibilité de vaches en lactation vis-à-vis d'infections expérimentales réalisées avec deux souches de *Staphylococcus aureus*, 30 jours après le vêlage a été étudiée. Ces vaches avaient été immunisées précédemment pendant la période de tarissement et une boucle de polyéthylène en plastique (stérilait) avait été placée dans leurs quartiers.

Aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre les fréquences d'infection des quartiers avec stérilait et les quartiers témoins que les animaux soient immunisés ou non.

La production de lait et les teneurs en matière grasse et en matière protéique totale n'ont pas été modifiées dans les quartiers avec stérilait, alors qu'une diminution de la concentration en lactose a été notée ($P < 0,05$).

A mi-lactation, les numérations cellulaires moyennes des fractions de lait recueillies avant stimulation de la mamelle ou de traite totale étaient significativement plus élevées ($P < 0,05$) pour les quartiers avec stérilait, comparées aux quartiers témoins. En général, les différences ainsi observées étaient plus importantes dans les quartiers infectés expérimentalement que dans les quartiers non infectés.

Une numération cellulaire moyenne de 720 000 cellules/ml de lait a été obtenue à mi-lactation pour les quartiers non infectés comportant un stérilait.

Références

- ANDERSON J.C., 1978. The problem of immunization against staphylococcal mastitis. *Br. Vet. J.*, **134**, 412-420.
- BLACKBURN P.S., 1966. The variation in the cell-count of cows milk throughout lactation and from one lactation to the next. *J. Dairy Res.*, **33**, 193-198.
- BROOKS B.W., BARNUM D.A., 1982. The use of polyethylene intramammary device in protection of the lactating bovine udder against experimental infection with *Staphylococcus aureus* or *Streptococcus agalactiae*. *Can. J. Comp. Med.*, **46**, 267-269.
- CHANG C.C., WINTER A.J., NORCROSS N.L., 1981. Immune response in the bovine mammary gland after intestinal, local and systemic immunization. *Infect. Immun.*, **31**, 650-659.
- DODD F.H., WESTGARTH D.R., GRIFFIN T.K., 1977. Strategy of mastitis control. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, **170**, 1124-1128.
- FÉDÉRATION INTERNATIONALE DE LAITERIE, 1979. *Somatic cells in milk. Their significance and recommended methods for counting*. Doc. 114, Bruxelles, Belgique.
- GUIDRY A.J., PAAPE M.J., PEARSON R.E., 1977. The effect of local immunization of the mammary gland on phagocytosis and intracellular kill of *Staphylococcus aureus*. *J. Dairy Sci.*, **60**, (Suppl. 1), 135.
- GRAPPIN R., JEUNET R., 1976. Essais de l'appareil Milk-Scan 300 utilisé pour le dosage en série de la matière grasse et des protéines du lait. *Lait*, **56**, 498-520.
- HARMON R.J., SCHANBACHER F.L., FERGUSON L.C., SMITH K.L., 1976. Changes in lactoferrin in milk, immunoglobulin G, bovine serum albumin and α -lactalbumin during acute experimental and natural coliform mastitis in cows. *Infect. Immun.*, **13**, 533-542.
- KORTUM W., 1980. Criteria for intramammary device (IMD) placement for mastitis prevention in a dairy herd. *J. Dairy Sci.*, **63**, (Suppl. 1), 120-121.
- LASCELLES A.K., 1976. The immune system of the ruminant mammary gland and its role in the control of mastitis. *J. Dairy Sci.*, **62**, 154-160.

- LEE C.S., WOODING F.B.P., KEMP P., 1980. Identification properties and differential counts of cell populations using electron microscopy of dry cow secretions, colostrum and milk from normal cows. *J. Dairy Res.*, **47**, 39-50.
- MURPHY J.M., STUART O.M., 1953. The effect of introducing small number of *Streptococcus agalactiae* (Cornell 48 strain) directly into the bovine teat cavity. *Cornell Vet.*, **43**, 290-310.
- NEWBOULD F.H.S., 1970. Enhancement of phagocytosis in bovine milk leukocytes *in vitro*. *Can. J. Comp. Med.*, **34**, 261-264.
- NEWBOULD F.H.S., NEAVE F.K., 1965. The recovery of small numbers of *Staphylococcus aureus* infused into the bovine teat cistern. *J. Dairy Res.*, **32**, 157-162.
- PAAPE M.J., WERGIN W.P., GUIDRY A.J., PEARSON R.E., 1979. Leukocytes. Second line of defense against invading pathogens. *J. Dairy Sci.*, **62**, 135-153.
- PAAPE M.J., SCHULTZE W.D., GUIDRY A.J., KORTUM W.M., WEINLAND B.T., 1981. Effect of an intramammary polyethylene device on the concentration of leukocytes and immunoglobulins in milk and on the leukocyte response to *Escherichia coli* endotoxin and challenge exposure with *Staphylococcus aureus*. *Am. J. Vet. Res.*, **42**, 774-783.
- PATTISON I.H., MATTHEWS P.R.J., 1975. Observation on the serological identification of bovine coagulase-positive staphylococci. *J. Pathol. Bacteriol.*, **74**, 335-346.
- PLOMMET M., BEZARD G., 1974. Immunisation antistaphylococcique de la brebis par anatoxines et adjuvants. II. Adjuvants huileux *Ann. Rech. Vét.*, **5**, 29-39.
- POUTREL B., LERONDELLE C., 1978. Induced staphylococcal infections in the bovine mammary gland. Influence of the month of lactation and other factors related to the cow. *Ann. Rech. Vét.*, **9**, 119-128.
- POUTREL B., LERONDELLE C., 1980. Protective effect in the lactating bovine mammary gland induced by coagulase-negative staphylococci against experimental *Staphylococcus aureus* infections. *Ann. Rech. Vét.*, **11**, 327-332.
- RAINARD P., POUTREL B., 1982. Dynamics of subclinical bovine intramammary infections with major and minor pathogens. *Am. J. Vet. Res.*, **43**, 2143-2146.
- SCHALM O.W., LASMANIS J., CARROLL E.J., 1964. Effects of pre-existing leukocytosis on experimental coliform (*Aerobacter aerogenes*) mastitis in cattle. *Am. J. Vet. Res.*, **25**, 83-89.
- WATSON D.L., 1976. The effect of cytophilic IgG2 on phagocytosis by bovine polymorphonuclear leukocytes. *Immunology*, **31**, 159-165.
- WATSON D.L., 1982a. The influence of site antigen deposition on the local immune response in the mammary gland of the ewe. *Microbiol. Immunol.*, **26**, 423-430.
- WATSON D.L., 1982b. Virulence of *Staphylococcus aureus* grown *in vitro* or *in vivo*. *Res. Vet. Sci.*, **32**, 311-315.
- WISNIEWSKI J., ROMAIUNKOWA K., GRAJEWSKI H., 1965. Phagocytosis phenomenon in the mammary glands of cows. I. The opsoning factor and the phagocytic activity of leukocytes in milk and blood. *Bull. Vet. Inst. Pulawy*, **9**, 140-144.