

Etude de l'entérotoxémie bovine en Belgique.

III. Comparaison de différents protocoles d'immunisation contre la toxine α de *Clostridium perfringens*

Manteca C.^{1*}, Ginter A.^{2**}, Limbourg B.^{† 3}, Coppe P.^{2***}, Mainil J.¹, Daube G.^{1****}

1 Département des Maladies infectieuses et parasitaires – Bactériologie – Faculté de Médecine vétérinaire
Université de Liège – Sart Tilman, Bât B43a – 4000 Liège

2 Centre d'Economie rurale – Division Immunologie animale – Rue du Carmel, 1 – 6900 Marloie

3 ARSIA Laboratoire de Ciney – Allée des Artisans, 2 – 5590 Ciney

Adresses actuelles :

* CEVA Santé animale – La Ballastière – F33501 Libournes, France

** Bio-X Diagnostics SPRLu – Site du complexe des Postes – Rue J. Wauters, 22 – 5580 Jemelle

*** Biopole – Rue Herman Meganck, 21 – 5032 Les Isnes

**** Département des Sciences des Denrées alimentaires – Microbiologie – Faculté de Médecine Vétérinaire, Bât. B43bis – Université de Liège – Sart Tilman – 4000 Liège

Correspondance : Professeur Jacques Mainil – Tél : 00-32(0)4-366 40 50 – Fax : 00-32(0)4-366 42 61 – Email : JG.Mainil@ulg.ac.be

RESUME : Des études précédentes ont démontré l'association de l'entérotoxémie bovine avec une prolifération de *Clostridium perfringens* toxino-type A. Cette étude a pour but de formaliser les règles essentielles d'utilisation des vaccins dirigés contre la toxine α de *C. perfringens* afin d'optimiser la vaccination des veaux. Les bovins vaccinés étaient de race Blanc Bleu Belge (BBB) ou BBB x Charolais et provenaient de six exploitations qui n'avaient jamais pratiqué de vaccination anti-clostridienne. Cent trent-trois veaux ont reçu le Tasvax[®] et 70 le Miloxan[®], à un et deux mois d'âge, tandis que 94 individus n'ont reçu aucun vaccin. Pour l'étude des séroconversions chez les veaux issus de mères vaccinées ou non, 67 vaches gestantes ont reçu le Tasvax[®] à 7 et 8 mois de gestation. Les veaux de 29 d'entre elles ont ensuite été vaccinés avec le même vaccin, tandis que les 38 autres veaux restaient non vaccinés. Les séroconversions des veaux de ces deux groupes ont été comparées à celles des veaux vaccinés au Tasvax[®] au cours de la première étude et provenant de mères non vaccinées. Les anticorps sériques anti-toxine α ont été dosés par un test ELISA indirect. Les résultats montrent l'existence d'un taux basal naturel d'anticorps anti- α chez le bovin. Ces anticorps sont transférés au veau via le colostrum. Quel que soit l'âge de l'animal, l'injection de vaccin augmente ce taux basal. L'injection de rappel permet d'obtenir un taux d'anticorps encore significativement supérieur. Les séroconversions enregistrées ont une importance proportionnelle à la quantité d'antigène vaccinal injecté. Une injection réalisée à 1 mois chez le veau avec un rappel 4 semaines plus tard est la méthode la plus efficace pour obtenir des taux d'anticorps élevés chez le veau âgé de 2 à 4 mois. Des rappels bi-annuels sont nécessaires pour maintenir ces titres. En cas d'entérotoxémie précoce (< 2 mois) dans l'exploitation, la vaccination des mères aux septième et huitième mois permet d'obtenir chez le veau des anticorps colostraux en quantité importante. Les résultats, cependant, montrent que la vaccination maternelle est incompatible avec une vaccination efficace du veau lui-même.

INTRODUCTION

L'entérotoxémie bovine est une pathologie fréquente du veau viandeux âgé de 2 à 4 mois. Des études précédentes ont démontré l'association nette de cette pathologie avec l'augmentation du nombre de *Clostridium (C.) per-*

fringens de type A (Manteca *et al.*, 2001). La toxine α a été dès lors incriminée dans ce processus pathologique en synergie avec la toxine β_2 dans un grand nombre de cas (Manteca *et al.*, 2002).

Différentes études réalisées chez la

souris démontrent la possibilité d'induire une protection contre l'activité phospholipasique et hémolytique de cette toxine (Titball *et al.*, 1993). Malgré d'évidentes réussites expérimentales (Rose et Edgar, 1936), la vaccination contre cette pathologie

Tableau I: Nombre, moyenne et écart-type décrivant les taux d'anticorps anti-toxine α obtenus avec les différents protocoles vaccinaux (voir Matériels et méthodes). Les prises de sang ont été réalisées à 7 et 8 mois de gestation (M 7m et M 8m) chez les mères ; 48 heures après la naissance (V 48h) et mensuellement pendant 6 mois (V 1m à V 6m).

Groupes		M 7m	M 8m	V 48h	V 1m	V 2m	V 3m	V 4m	V 5m	V 6m
Mère et veau non vaccinés		n = 64	n = 43	n = 25	n = 94	n = 87	n = 58	n = 22	n = 7	n = 7
	$\mu \pm$ e.t.	741 \pm	764 \pm	875 \pm	481 \pm	421 \pm	334 \pm 0	367 \pm	380 \pm 1	288 \pm 11
Mère non vaccinée, veau vacciné ($\alpha = 0,5$ UI/ml)		n = 5	n = 6	n = 4	n = 4	n = 11	n =	n = 4	n =	n =
	$\mu \pm$ e.t.	816 \pm	823 \pm 1	761 \pm 5	495 \pm	648 \pm 0	765 \pm 1	701 \pm	760 \pm	493 \pm
Mère non vaccinée, veau vacciné ($\alpha = 0$ UI/ml)		n =	n = 1	n = 1	n = 0	n =	n = 5	n = 10	n =	n =
	$\mu \pm$ e.t.	682 \pm	672 \pm 5	730 \pm 1	393 \pm 5	520 \pm	648 \pm 0	330 \pm 55	448 \pm 5	319 \pm 1
Mère et veau vaccinés ($\alpha = 0$ UI/ml)		n =	n = 1	n = 1	n = 1	n =	n =	n =	n =	n =
	$\mu \pm$ e.t.	840 \pm 1	1152 \pm 55	1254 \pm 1	854 \pm	398 \pm 11	268 \pm	623 \pm 5	554 \pm 1	451 \pm
Mère vaccinée ($\alpha = 0,5$ UI/ml), veau non vacciné		n =	n =	n =	n =	n =	n = 1	n = 10	n =	n =
	$\mu \pm$ e.t.	895 \pm 0	1087 \pm	1153 \pm	912 \pm 11	644 \pm 5	474 \pm 0	451 \pm 0	474 \pm 5	476 \pm

donne des résultats aléatoires sur le terrain (Manteca et Daube, 1994). Une des explications de ces échecs pourrait être la diversité des protocoles utilisés par les vétérinaires. Cette étude a pour but de formaliser les règles essentielles d'utilisation des vaccins dirigés contre la toxine α de *C. perfringens* afin d'optimiser leur utilisation.

MATERIEL ET METHODES

Vaccins utilisés

Deux vaccins commerciaux ont été utilisés : le Miloxan® (Merial) caractérisé par l'absence d'anatoxine issue de *C. perfringens* type A, mais contenant les anatoxines correspondant aux toxino-types classiques B, C et D (0 UI/ml pour la valence toxine α) et le Tasvax® (Schering-Plough) contenant les anatoxines issues de l'ensemble des toxino-types A, B, C et D (0,5 UI/ml pour la valence toxine α). Ces vaccins ont été utilisés selon les instructions fournies par les firmes tant sur le plan des doses que de la voie d'injection : injection sous-cutanée de 2 ml chez le veau et de 4 ml chez le bovin adulte. Les règles classiques de bonne pra-

tique vaccinale ont été rigoureusement suivies. Un seul lot de vaccin a été utilisé pour chaque série d'expérience. Aucun flacon entamé n'a été utilisé plus de 8 heures après son ouverture.

Choix des animaux et protocoles vaccinaux

Les bovins vaccinés étaient de race Blanc Bleu Belge (BBB) ou BBB croisés Charolais et provenaient de six exploitations de taille importante qui n'avaient jamais pratiqué de vaccination anti-clostridienne. Pour le suivi des séroconversions chez les veaux, 133 individus ont reçu le Tasvax® et 70 individus le Miloxan® à un et deux mois d'âge et 94 individus n'ont reçu aucune vaccination. Pour l'étude des séroconversions chez les veaux issus de mères vaccinées ou non, 67 vaches gestantes ont reçu le Tasvax® à 7 et 8 mois de gestation. Les veaux de 29 d'entre elles ont ensuite été vaccinés avec le même vaccin et les 38 autres veaux ont servi d'animaux témoins non vaccinés. Les séroconversions des animaux de ces deux groupes ont été comparées à celles des veaux vaccinés au Tasvax® au cours de la première étude et provenant de mères non vac-

cinées. Dans chaque exploitation, les protocoles vaccinaux ont été attribués aléatoirement aux animaux. Les veaux n'ont reçu que le colostrum frais de leur mère.

Application d'un test ELISA indirect de détection de la toxine α

La production de toxine α purifiée ainsi que le développement d'un test ELISA indirect ont été exposés par ailleurs (Ginter *et al.*, 1994). En résumé, les toxines purifiées ont été fixées directement sur microplaques (Nunc maxisorp F16 4/67466) à raison de 10 μ g par ml en PBS (une nuit à 4°C). Les microplaques ont ensuite été saturées par une solution d'hydrolysate de caséine (Merck 2242 caséine selon Hammersten) préparée selon la procédure préconisée par le fournisseur. Les plaques ont ensuite été séchées par lyophilisation et stockées sous vide dans un emballage de plastique. Les sérums sanguins à analyser ont été dilués en hydrolysate de caséine et déposés dans les micropuits. La fixation des anticorps a été mise en évidence par des anticorps spécifiques couplés à la peroxydase. La fixation des anticorps conjugués est révélée

par une solution de Tetra-Méthyl-Benzidine et d'eau oxygénée (KPL TMB Microwell peroxydase Substrate System 50-76-00).

Récolte des sérums

Des prises de sang ont été réalisées chez les mères à 7 et 8 mois de gestation. Au cours de l'étude de la séroconversion des veaux provenant de mères non vaccinées, toutes n'ont cependant pas pu être prélevées. Les prises de sang ont été faites chaque mois pendant 6 mois chez les veaux. Dans la mesure du possible, ils ont également subi une prise de sang 48 heures après leur naissance. Les tubes récoltés ont été centrifugés et les sérums aliquotés et conservés à -70°C . L'ensemble des sérums récoltés a été analysé à la fin de l'essai.

Expression des résultats et statistiques

Les résultats des séroconversions présentés sont des nombres purs issus du rapport entre la densité optique lue lors du test ELISA sur les sérums issus de l'essai et les densités optiques obtenues avec les sérums témoins. L'analyse statistique des résultats a été faite par le test *t de Student* hormis lorsque le nombre de veaux étudiés était inférieur à 10. Le test non paramétrique de *Mann-Whitney* a alors été utilisé.

RESULTATS

Les titres en anticorps et les statistiques descriptives de chaque groupe d'animaux sont donnés dans le tableau 1 et illustrés dans les graphiques 1 et 2. Les résultats des tests statistiques sont présentés dans le tableau 2.

Quel que soit le vaccin utilisé, l'injection initiale et l'injection de rappel provoquent une séroconversion proportionnelle à la quantité d'antigène injecté. Quel que soit le vaccin utilisé, les taux d'anticorps détectables à 6 mois sont équivalents dans les 3 groupes. La vaccination des mères entraîne un enrichissement du colostrum en anticorps anti α , enrichissement également proportionnel à la quantité d'antigène injecté. La vaccination de veaux âgés d'un à deux mois et issus de mères vaccinées entraîne la chute significative d'anticorps circulants chez ces veaux.

DISCUSSION

La vaccination contre l'entérotoxémie du bovin a toujours montré des résultats variables (Brown *et al.*, 1976; De Groot *et al.*, 1997; Muller *et al.*, 1998). Cette pathologie étant un archétype de pathologie multifactorielle, la non-maîtrise des facteurs de risque est une explication de certains échecs constatés (Manteca *et al.*, 2000). Le type d'excipient, la voie d'inoculation et le protocole de vaccination mis en œuvre sont autant de facteurs pouvant influencer la réponse

sérologique (Stokka *et al.*, 1994; De Groot *et al.*, 1997; Troxel *et al.*, 2001). Cet essai a pour but de décrire, dans le cadre de vaccins commerciaux, le protocole le plus efficace quant à l'obtention d'une séroconversion haute chez le veau Blanc Bleu Belge élevé sous la mère. Seule l'immunité humorale a été mesurée puisque l'immunité cellulaire ne joue pas de rôle protecteur dans le cas des exotoxines clostridiennes. Dans une étude non publiée, nous avons d'ailleurs démontré que les vaccins anticlostridiens inactivés ne provo-

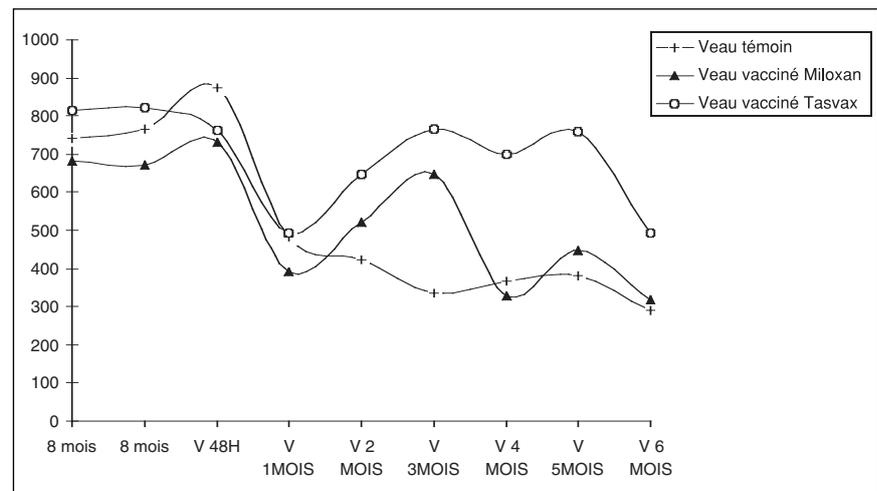


Figure 1. Evolution des moyennes de titres en anticorps anti-toxine α obtenus chez des veaux issus de mères non vaccinées et vaccinées à un et deux mois avec le vaccin Miloxan[®] (titrant 0 UI/ml d'anatoxine α) ($n = 133$) ou le vaccin Tasvax[®] (titrant 0,5 UI/ml d'anatoxine α) ($n = 70$), ou non vaccinés ($n = 94$).

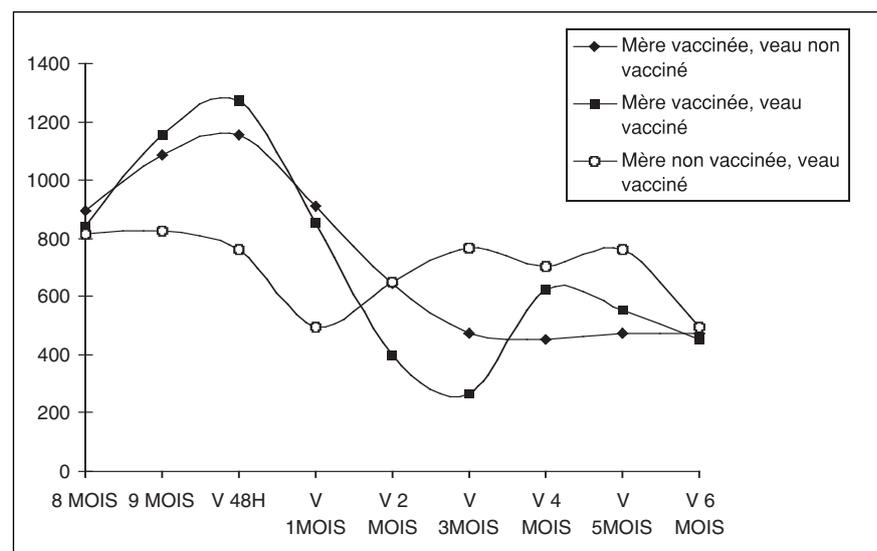


Figure 2. Evolution des moyennes des titres en anticorps anti-toxine α obtenus selon trois protocoles différents de vaccination avec le vaccin Tasvax[®] (titrant 0,5 UI/ml d'anatoxine α) : 70 veaux vaccinés à 1 et 2 mois issus mères non vaccinées; 38 veaux non vaccinés issus de mères vaccinées à 7 et 8 mois de gestation; 29 veaux vaccinés à 1 et 2 mois issus de mères vaccinées à 7 et 8 mois de gestation.

Tableau II: Comparaison 2 à 2 des différents types de protocole vaccinaux quant aux titres d'anticorps anti-toxine α obtenus avec les différents protocoles vaccinaux (voir Matériels et méthodes) chez la mère et chez le veau (voir tableau 1) (test *t de Student* et de *Mann-Whitney*).

Groupes d'animaux à comparer		M 7m	M 8m	V48 h	V1m	V 2m	V 3m	V 4m	V 5m	V 6m
Mère et veau non vaccinés.	Mère non vaccinée., veau vacciné ($\alpha = 0,5$ UI/ml)	NS	NS	NS	NS	***	***	**	**	NS
Mère et veau non vaccinés	Mère non vaccinée., veau vacciné ($\alpha = 0$ UI/ml)	NS	NS	NS	NS	NS	***	NS	NS	NS
Mère non vaccinée., veau vacciné ($\alpha = 0$ UI/ml)	Mère non vaccinée., veau vacciné ($\alpha = 0,5$ UI/ml)	NS	NS	NS	NS	*	**	***	NS	NS
Mère et veau vaccinés. ($\alpha = 0,5$ UI/ml)	Mère vaccinée ($\alpha = 0,5$ UI/ml), veau non vacciné	NS	NS	NS	NS	***	**	NS	NS	NS
Mère vaccinée ($\alpha = 0,5$ UI/ml), veau non vacciné	Mère non vaccinée., veau vacciné ($\alpha = 0,5$ UI/ml)	NS	**	***	***	NS	**	**	NS	NS
Mère et veau vaccinés. ($\alpha = 0,5$ UI/ml)	Mère non vaccinée., veau vacciné ($\alpha = 0,5$ UI/ml)	NS	**	***	***	***	***	NS	NS	NS

NS : différence non significative

* = $p < 0,1$; ** = $p < 0,05$; *** = $p < 0,005$.

quaient aucune stimulation de l'immunité à médiation cellulaire. Les résultats des séroconversions présentés sont exprimés en valeur de densité optique issue du test ELISA. Aucun lien entre cette valeur et le nombre d'Unité Internationale neutralisante chez le bovin ne peut être déduit. Ce lien aurait par ailleurs peu d'objet puisque, par absence de modèle vivant, le taux d'anticorps minimum assurant une protection clinique n'a pu être établi dans l'espèce cible. La valence toxine α a été choisie puisque des recherches préalables avaient démontré que cette toxine était, dans l'état actuel des connaissances, la seule toxine létale majeure de *C. perfringens* produite lors d'entérotaxémie. Une étude parallèle avec la valence ϵ (résultats non montrés) a servis de témoin de vaccination des individus puisque aucun anticorps naturel dirigé contre la toxine ϵ n'est détectable chez les bovins de nos régions.

Par contre, les résultats démontrent clairement l'existence d'un taux basal naturel d'anticorps anti α chez le

bovin. Ces anticorps sont transférés au veau via le colostrum. Quel que soit l'âge de l'animal, l'injection de vaccin augmente ce taux basal. L'injection de rappel permet d'obtenir un taux d'anticorps encore significativement supérieur. Les séroconversions enregistrées ont une importance proportionnelle à la quantité d'antigène vaccinal injecté. Dans une étude non publiée, nous avons démontré qu'avec un vaccin inactivé contenant plus de 0,5 UI/ml pour la valence α , la quantité d'anticorps produit était encore supérieure à celle entraînée par le Tasvax®. L'utilisation du vaccin commercial disponible contenant la plus grande quantité d'anatoxine α permettra donc d'obtenir les séroconversions les plus élevées. Une injection réalisée à 1 mois chez le veau avec un rappel 4 semaines plus tard semble la méthode la plus efficace pour obtenir des taux d'anticorps élevés chez le veau âgé de 2 à 4 mois. Cette période est considérée comme la période à risque majeur (Manteca *et al.*, 2000). L'enrichissement du colostrum par la vaccination des mères à 7 et 8 mois permet

d'obtenir un taux d'anticorps circulant chez le veau plus important que chez les veaux témoins durant le premier mois de vie au moins. Il semble que la vaccination des mères doublée de la vaccination des veaux à 1 mois d'âge entraîne une chute majeure du taux d'anticorps anti α circulant. On peut avancer l'hypothèse d'une neutralisation des anticorps d'origine colostrale par les antigènes vaccinaux. Quoiqu'il en soit, cette chute est défavorable à l'obtention d'un taux d'anticorps élevé entre 2 et 3 mois. Le protocole double visant à la fois le veau et sa mère semble donc une solution à rejeter sous peine de reculer la primo injection au veau de plusieurs semaines. Le type de protocole choisi dépendra donc fortement de la période d'apparition des entérotaxémies dans une exploitation donnée. Il est remarquable que dès le cinquième ou le sixième mois d'âge, les taux d'anticorps circulant chez les veaux vaccinés aient rejoint ceux obtenus chez les veaux témoins. Ce dernier résultat indique que les injections de rappel devraient être réalisées au moins deux

fois par an pour maintenir un taux d'anticorps circulant élevé.

L'obtention de titre élevé en anticorps dirigés contre la toxine alpha durant la période à risque majeur d'entérotoxémie (entre 2 et 4 mois) pourra être réalisé par vaccination du veau à 1 mois avec une injection de rappel 4 semaines plus tard. Des rappels bi-annuels sont nécessaires pour maintenir ces titres. En cas d'entérotoxémie précoce dans l'exploitation, la vaccination des mères aux septième et huitième mois permet d'obtenir chez le veau des anticorps colostraux en quantité importante. Cette vaccination maternelle semble incompatible avec une vaccination précoce du veau.

La protection apportée par les vaccins anticlostridiens est partiellement tributaire de la gestion rigoureuse des facteurs de risque de l'entérotoxémie et est donc difficile à déterminer sur de petites populations. Une objectivation de cette efficacité sur diverses pathologies et dans diverses espèces animales est en cours de réalisation sur de plus grandes populations. Les résultats obtenus à ce jour dans différents pays d'Europe, dont la Belgique (avec un vaccin contenant plus d'1 UI/ml d'antitoxine α) engagent à l'optimisme.

Bovine enterotoxaemia in Belgium. III. Comparison of different protocols of immunisation against the α toxin of *Clostridium perfringens*.

SUMMARY

Previous surveys demonstrated the association between the bovine enterotoxaemia syndrome and proliferation of *Clostridium perfringens* toxintype A. The purpose of this study was to establish rules for vaccination of calves against the α toxin. Bovines were Belgian Blue (BBB) or BBB x Charolais originating from 6 farms with no history of clostridial vaccination. One hundred and thirty-three calves were injected with Tasvax® and 70 with Miloxan® at one and two months of age, while 94 calves received no vaccine. To study sero-conversion in calves born from vaccinated dams, 67 cows were vaccinated with Tasvax® at 7 and 8 months pregnancy. Twenty-nine calves born from these cows were vaccinated at one and two months of age with the same vaccine while 38 calves

were not vaccinated. The results of these 67 calves were also compared to the results obtained from the calves born from non-vaccinated cows and vaccinated with Tasvax®. Anti- α toxin antibodies were measured using an indirect ELISA assay. Anti- α toxin antibodies are naturally present in the serums of non vaccinated animals and are transferred to the newborn calf by the colostrum. The two vaccinal injections cause sero-conversions in proportion of the total amount of immunogen received. The best protocol for calf vaccination is a first injection at one month of age, followed by a booster injection four weeks later. Boosters every six months are necessary to maintain a high level of antibody. In case of early problems (< 2 months of age) of enterotoxaemia in a farm, high antibody titres are obtained only following the vaccination of the pregnant cow and colostrum transfer. Unfortunately this protocol is not compatible with vaccination of the calf itself.

BIBLIOGRAPHIE

- BROWN K.K., PARIZK R.E., STEWART R.C. Prevention of clostridial disease in cattle and sheep by vaccination with a multivalent bacterin-toxoid. *Vet. Med. Small Anim. Clin.*, 1976, **71**, 1717-1722.
- DE GROOT B., DEWEY C.E., GRIFFIN D.D., PERINO L.J., MOXLEY R.A., HAHN G.L. Effect of booster vaccination with a multivalent clostridial bacterin-toxoid on sudden death syndrome mortality rate among feedlot cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1997, **211**, 749-753.
- GINTER A., RENIER K., COLLARD A., LIMBOURG B., DAUBE G., SIMON P., MANTECA C., COPPE P. Caractérisation et typage de souches de *Clostridium perfringens* par la méthode ELISA. In : El Hassane Diop P., Kaeckenbeeck A. (Eds), Biotechnologies du diagnostic et de la prévention des maladies animales. John Libbey Eurotext : Paris, 1994, 31-48.
- MANTECA C., DAUBE G. L'entérotoxémie en Belgique : I. Introduction et contexte bibliographique. *Ann. Méd. Vét.*, 1994, **138**, 155-164.
- MANTECA C., DAUBE G., JAUNIAUX T., LINDEN A., PIRSON V., DETILLEUX J., GINTER A., COPPE P., KAECKENBEECK A., MAINIL J.G. A role for the *Clostridium perfringens* β 2 toxin in bovine enterotoxaemia ? *Vet. Microbiol.*, 2002, **86**, 191-202.
- MANTECA C., DAUBE G., PIRSON V., LIMBOURG B., KAECKENBEECK A., MAINIL J.G. Bacterial intestinal flora associated with enterotoxaemia in Belgian Blue calves. *Vet. Microbiol.*, 2001, **81**, 21-32.
- MANTECA C., DAUBE G., JAUNIAUX T., LIMBOURG B., KAECKENBEECK A., MAINIL J.G. L'entérotoxémie en Belgique. II. Epizootiologie élémentaire et pathologie descriptive. *Ann. Méd. Vét.*, 2000, **144**, 75-82.
- MULLER W., ZUCKER B.A., SANCHEZ A.R., ULMER S., YOUNAN M. Bovine Paraplegic Syndrome (Mal de Aquidaban) in Paraguay caused by *Clostridium perfringens* toxovar D. *Berl. Munch. Tierarztl. Wschr.*, 1998, **111**, 214-216.
- ROSE A.L., EDGAR G. Enterotoxaemic jaundice of sheep and cattle. *Aust. Vet. J.*, 1936, **12**, 212-220.
- STOKKA G.L., EDWARDS A.J., SPIRE M.F., BRANDT R.T. Jr, SMITH J.E. Inflammatory response to clostridial vaccines in feedlot cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1994, **204**, 415-419.

TITBALL R.W., FEARN A.M., WILLIAMSON E.D
Biological and immunological properties of the C-terminal domain of the alpha-toxin of *Clostridium perfringens*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1993, **110**, 45-50.

TROXEL T.R., GADBERRY M.S., WALLACE W.T.,
KREIDER D.L., SHOCKEY J.D., COLBURN E.A.,
WIDEL P., NICHOLSON I. Clostridial antibody
response from injection-site lesions in beef cattle, long-term response to single or multiple doses, and response in newborn beef calves. *J. Anim. Sci.*, 2001, **79**, 2558-2564.