

Université de Montréal

**Standardisation et validation de techniques luminométriques pour
évaluer la propreté des équipements d'alimentation des veaux en
pré-sevrage**

par Anaïs Chancy

Département de sciences cliniques
Faculté de médecine vétérinaire

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

Août 2023

© Anaïs Chancy, 2023

Université de Montréal
Département de sciences cliniques, Faculté de médecine vétérinaire

Ce mémoire intitulé

Standardisation et validation de techniques luminométriques pour évaluer la propreté des équipements d'alimentation des veaux en pré-sevrage

Présenté par

Anaïs Chancy

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Marie-Lou Gauthier

Présidente-rapporteuse

Sébastien Buczinski

Directeur de recherche

Débora Santschi

Co-directrice

Marion Allano

Membre du jury

Résumé

La contamination des équipements d'alimentation des veaux en pré-sevrage est une préoccupation de santé importante dans l'industrie laitière, et peut être associée à une augmentation des taux de morbidité et de mortalité. Les producteurs laitiers et intervenants ont donc besoin d'un outil pratique, rapide et fiable pour évaluer la propreté des équipements, compte tenu que l'évaluation visuelle seule est insuffisante. Les objectifs de cette étude sont de développer une méthode standardisée pour évaluer la propreté de plusieurs équipements grâce à la luminométrie, d'estimer la prévalence de contamination et décrire les pratiques de gestion recommandées pour le nettoyage. Un total de 7 troupeaux laitiers du Québec a été choisi par convenance. Après l'évaluation visuelle de l'hygiène, la propreté des équipements a été évaluée par écouvillonnage direct pour les seaux et les tétines avec des écouvillons Hygiena UltraSnap®. Une technique de rinçage a été utilisée pour les tubes à gaver, les biberons et les distributrices automatiques de lait (AMF) avec des écouvillons UltraSnap®, AquaSnap® et MicroSnap®. Pour valider la technique d'écouvillonnage direct des seaux, une étape avec le même opérateur et entre plusieurs opérateurs a été réalisée, ainsi qu'une culture bactérienne conventionnelle. Au total, 519 écouvillons ont été prélevés sur 201 équipements. La contamination médiane (intervalle interquartile) en RLU pour le biberon, le tube à gaver, l'AMF, le seau et la tétine est de 2 (1;6), 2 (0;12), 52 (19;269), 886 (128;7,230) et 899 (142;6 928), respectivement. La technique d'écouvillonnage direct, qui consiste à écouvillonner directement la surface d'un équipement, a montré une excellente corrélation pour la fidélité intra-opérateur (corrélation intra-classe (ICC) = 0,93; IC95%: 0,88-0,96). La fidélité inter-opérateur (2 sessions avec 3 opérateurs différents) a montré une corrélation élevée (ICC = 0,88; IC95%: 0,78-0,94 pour la 1^{ère} session et ICC = 0,89; IC95%: 0,79-0,95 pour la 2^e). Le score visuel (qui grade de 1 à 4 la propreté des équipements selon la quantité de matières organiques) des tubes à gaver, de l'AMF et des seaux a été positivement associé aux valeurs du luminomètre. Une corrélation positive entre la culture bactérienne et l'écouvillonnage direct des seaux a été trouvée pour l'UltraSnap (rho de Spearman (r_s) = 0,653; IC95%: 0,283-0,873; P = 0,0003) et le MicroSnap (r_s = 0,569; IC95%: 0,309-0,765; P = 0,002). Cette étude décrit une technique standardisée d'écouvillonnage à la ferme pour évaluer le statut hygiénique des équipements par luminométrie, qui peut être intégrée dans la gestion des problèmes de santé des veaux laitiers en pré-sevrage.

Mots clés : santé des veaux, hygiène, contamination, luminescence, test rapide

Abstract

The contamination of equipment used to feed pre-weaned calves is an important health issue for the dairy industry, which can be associated with increased morbidity and mortality rates. Therefore, dairy producers and consultants need a practical, quick, and reliable tool to assess equipment cleanliness, since visual assessment alone is insufficient. The objectives of this cross-sectional study are to develop a standardized robust method to evaluate the cleanliness of several types of feeding equipment on-farm by using luminometry, with special emphasis on a direct swabbing technique to sample buckets, and to estimate the prevalence of contamination and the recommended management practices for cleaning and describing equipment. A total of 7 Quebec commercial dairy herds were selected conveniently. Following visual hygiene scoring, the cleanliness of available piece of feeding equipment was assessed using direct surface swabbing for buckets and nipples with Hygiena Ultra-Snap® swabs. A liquid rinsing technique was used for esophageal feeders, bottles, and automatic milk feeders (AMF) with UltraSnap®, AquaSnap®, and MicroSnap® swabs. To validate the direct swabbing technique of buckets, a comparison within and between operators was realized, as well as a conventional bacterial culture. A total of 519 swab samples were obtained from 201 pieces of equipment. The median (interquartile range) contamination in RLU for a bottle, esophageal feeder, AMF, bucket and nipple was 2 (1;6), 2 (0;12), 52 (19;269), 886 (128;7,230) and 899 (142;6,928), respectively. The direct swabbing technique, which consists in swabbing directly the surface of an equipment, showed an excellent correlation for inter-rater reliability (intraclass correlation (ICC) = 0.93; 95%CI: 0.88-0.96). The inter-operator (2 sessions with 3 different operators) reliability showed high correlation (ICC = 0.88; 95%CI: 0.78-0.94 for the 1st session, and ICC = 0.89; 95%CI: 0.79-0.95 for the 2nd session). The visual score (who ranks equipment cleanliness from 1 to 4 according to the quantity of organic matter) of esophageal feeders, AMF and buckets was positively associated with luminometer values. A positive correlation between bacterial culture and direct swabbing of buckets was found for the UltraSnap (Spearman's rho (r_s) = 0.653; 95%CI: 0.283-0.873; P = 0.0003) and MicroSnap (r_s = 0.569, 95%CI: 0.309-0.765; P = 0.002). This study describes a standardized and practical on-farm swabbing technique for assessing the hygienic status of feeding equipment by luminometry, which can be integrated in the investigation of preweaning dairy calves' health problems.

Key words: calf health, hygiene, contamination, luminescence, rapid testing

Table des matières

Résumé	3
Abstract	4
Table des matières	5
Liste des tableaux	9
Liste des figures	10
Liste des abréviations	13
Remerciements	14
Introduction	15
1 Chapitre 1 – Revue de littérature	17
1.1 La santé et la régie des génisses de remplacement dans les fermes laitières.....	17
1.1.1 La place de la génisse dans le troupeau laitier	17
1.1.2 Alimentation.....	17
1.1.2.1 Colostrum.....	18
1.1.2.2 Lait et lactoreplaceur.....	19
1.1.2.3 Alimentation solide et eau	19
1.1.3 Les phases de croissance	20
1.1.3.1 La période pré-sevrage.....	20
1.1.3.2 Le sevrage	21
1.1.4 Immunité	22
1.1.4.1 Rôle et définition.....	22
1.1.4.2 Intervention du colostrum dans l’immunité bovine	23
1.1.4.2.1 La particularité de la gestation chez les bovins.....	23
1.1.4.2.2 Le transfert d’immunité passive.....	23
1.1.4.2.3 L’importance d’un transfert d’immunité passive adéquat	24
1.1.5 Principales pathologies rencontrées chez les génisses de remplacement.....	24
1.1.6 L’impact de l’environnement sur la santé des veaux	25
1.1.6.1 Logement	26
1.1.6.2 Ventilation.....	27

1.1.6.3	Alimentation et équipements d'alimentation	28
1.2	Contamination, biosécurité et entretien des équipements d'alimentation	29
1.2.1	L'importance de la qualité du lait et du colostrum sur la santé du veau	29
1.2.2	Normes de biosécurité	31
1.2.3	Les protocoles de nettoyage et de désinfection et leur rôle.....	33
1.2.3.1	Les 7 étapes d'un protocole de nettoyage et désinfection.....	34
1.2.3.1.1	Nettoyage à sec	35
1.2.3.1.2	Trempage et nettoyage avec de l'eau et du produit nettoyant.....	35
1.2.3.1.3	Rinçage	37
1.2.3.1.4	Séchage	37
1.2.3.1.5	Désinfection	38
1.2.3.1.6	Séchage	39
1.2.3.1.7	Test d'efficacité.....	39
1.2.4	Les paramètres et les agents contaminants du matériel et de l'alimentation.....	40
1.2.4.1	Les bactéries.....	40
1.2.4.2	Matière organique résiduelle et biofilm	43
1.2.4.3	Méthodes de nettoyage insuffisantes ou inefficaces	45
1.2.4.3.1	Fréquence de nettoyage.....	45
1.2.4.3.2	Absence de détergents pour le nettoyage ou la désinfection	46
1.2.4.3.3	Température de l'eau inadéquate	46
1.2.4.3.4	Tétines non-dévisées	46
1.2.4.4	Entreposage du colostrum et du lait après la traite	47
1.2.5	Les méthodes pour évaluer la propreté des équipements	48
1.2.5.1	Évaluation visuelle.....	48
1.2.5.2	Analyses bactériologiques	48
1.2.5.3	Autres méthodes.....	49
1.3	Luminométrie	51
1.3.1	Définition	51
1.3.2	Fonctionnement physico-chimique	51
1.3.3	Utilisation	52
1.3.3.1	Types de surfaces échantillonnées	53
1.3.3.2	Types d'écouvillons	53

1.3.3.3	Types de luminomètres	54
1.3.4	Particularités de la luminométrie.....	54
1.3.5	Étapes pour la validation d'une technique fiable et répétable.....	55
1.3.5.1	Évaluation de la répétabilité intra-luminomètre et inter-luminomètre	55
1.3.5.2	Évaluation de la fidélité de l'échantillonnage.....	56
1.3.5.2.1	Standardisation de la technique de collecte	56
1.3.5.2.2	Répétabilité intra-opérateur puis inter-opérateur	56
2	Chapitre 2 – Manuscrit scientifique.....	58
2.1	Abstract.....	59
2.2	Introduction	60
2.3	Materials and methods.....	62
2.3.1	Study design	62
2.3.2	Data collection.....	62
2.3.3	Bucket sampling.....	66
2.3.4	Nipple sampling	66
2.3.5	Esophageal tube feeders and automatic milk feeder line	67
2.3.6	Bottle sampling	67
2.3.7	Luminometer reading reliability (intra and inter-assay repeatability).....	67
2.3.8	Bacterial analysis.....	68
2.3.9	Statistical analysis	68
2.3.10	Reliability of swabbing technique (intra-rater and inter-rater)	68
2.3.11	Sample size calculation	69
2.3.12	Test-retest reliability of the luminometer and comparison of reading over time by the 2 luminometers.....	70
2.3.13	Visual assessment.....	70
2.3.14	Correlation between luminometry and bacteriology, and between luminometry results	70
2.4	Results	71
2.4.1	Descriptive statistics.....	71
2.4.2	Intra and inter operator assessment	72
2.4.3	Intra and inter luminometer assessment	72
2.4.4	Visual assessment.....	73
2.4.5	Bacterial analysis and correlation between swabs	74

2.5	Discussion.....	75
2.6	Conclusions	77
2.7	Acknowledgments	77
2.8	References	78
3	Chapitre 3 – Discussion générale.....	82
3.1	Application des résultats.....	82
3.2	Difficultés et limites	84
3.3	Future orientation de recherche	85
	Conclusion.....	86
	Références bibliographiques	87
	Annexe	101

Liste des tableaux

Tableau 1. - La concentration moyenne d'immunoglobulines (en mg/mL) du sérum et des sécrétions mammaires chez le bovin (Gapper et al., 2007).....23

Manuscrit

Table 1. - Visual hygiene assessment scoring chart used to assess contamination of esophageal feeders and automatic milk feeders63

Table 2. - Median contamination and interquartile range (IQR) of every type of feeding equipment obtained with UltraSnap, AquaSnap and MicroSnap swabs in relative light unit (RLU) for the 7 farms visited.72

Liste des figures

Figure 1. - Courbe de croissance des génisses laitières en période de pré-sevrage aux États-Unis (n = 2273) (Urie, 2018).....	20
Figure 2. - Développement de la réponse immunitaire chez le veau, de la conception à la puberté (Morein et al., 2002).....	24
Figure 3. - Les différents facteurs menant à l'apparition et la propagation de maladies chez les génisses laitières (adapté de Dewulf et van Immerseel, 2018).....	26
Figure 4. - Compte bactérien total (total plate count) et compte de coliformes totaux (total coliform count) en log10 pour les échantillons de colostrum prélevés à partir du pis, d'un seau et d'un tube à gaver œsophagien. a,b Les indices diffèrent au sein du groupe de types de bactéries, P < 0,05 (Stewart et al., 2005).	31
Figure 5. - La biosécurité comme outil pour la réduction de l'utilisation des traitements préventifs et curatifs (adapté de Dewulf et van Immerseel, 2018).....	32
Figure 6. - Carte en 2 dimensions représentant différents types d'encrassement et les méthodes de nettoyage recommandées pour les éliminer (Fryer et Asteriadou, 2009).	35
Figure 7. - Étapes recommandées pour le nettoyage adéquat des équipements d'alimentation (Van Driessche et al., 2023).....	40
Figure 8. - Les étapes de formation d'un biofilm bactérien (Tremblay et al., 2014)	45
Figure 9. - Effet de la méthode de stockage dans le temps sur le compte bactérien en log10 dans le colostrum bovin frais. a,b,c,d Les différents indices diffèrent pour une période de stockage donnée, P < 0,05 (Stewart et al., 2005).....	48

Figure 10. - Les techniques microbiologiques et non-microbiologiques permettant d'évaluer l'efficacité du nettoyage et de la désinfection des surfaces (Holah et al., 2016).50

Figure 11. - Réaction enzymatique entre la luciférine et la luciférase à l'origine de l'émission de lumière (Bendouma et al., 2022).52

Figure 12. - Étapes à suivre lors de l'échantillonnage d'une surface par luminométrie (Hygièna, 2023).52

Manuscrit

Figure 1. - Assessment of transparency of dirty (a) and clean tubes (b) trying to read the measure tape graduation in inch to evaluate the visual score of tubes. If the exact reading of the scale through the tube is read, the score is 1. If the reading is within $\pm 1/16$ of an inch, the score is 2. If the reading is within $\pm 1/8$ of an inch, the score is 3, and if it is within $\pm 1/4$ of an inch, the score is 4.64

Figure 2. - Flow diagram representing the different techniques performed, the number of operators, the number of each equipment sampled, and the swabs used for every major step of the study and for every type of equipment. Although not illustrated here, 4 bottles were sampled during the study period. The adjustments for the automatic milk feeder (AMF) and esophageal feeders were reported for a tube of 100-cm length and 0,5-cm radius.65

Figure 3. - Relationship between UltraSnap results in relative light unit (RLU) and visual score attributed for every type of equipment. a,b,c = different letters indicate a significant difference ($P < 0.05$) according to the Dunn test with Benjamini- Hochberg correction for multiple pairwise comparisons. The midline represents the median, the box represents the interquartile range, whiskers are ± 1.5 interquartile range, and the dot is an outlier. AMF = automatic milk feeder. .73

Figure 4. - Relationship between UltraSnap and AquaSnap results (A), UltraSnap and MicroSnap (B) and MicroSnap and AquaSnap (C) in relative light unit (RLU) obtained with the rinsing liquid method used for esophageal feeders and automatic milk feeder (AMF). 74

Liste des abbréviations

AMF : automatic milk feeder

ATP : adénosine tri-phosphate

BRD : bovine respiratory disease

CFU : colony-forming unit

GMQ : gain moyen quotidien

IC : intervalle de confiance

Ig : immunoglobuline

IgM : immunoglobuline de type M

IgG : immunoglobuline de type G

IgA : immunoglobuline de type A

IGF : insulin-like growth factor

MAPAQ : ministère de l'agriculture, des pêcheries et de l'alimentation du Québec

RLU : relative light unit

r_s : Spearman rho

SD : standard deviation

TBC : total bacterial count

TCC : total coliform count

TIP : transfert d'immunité passive

Remerciements

Je suis très reconnaissante du soutien et de l'implication de toutes les personnes et organismes qui ont permis l'aboutissement de ce projet. J'aimerais remercier premièrement mon directeur de recherche Dr Sébastien Buczinski, pour sa générosité et sa patience dans le temps accordé à ma formation, les très nombreuses opportunités d'apprentissage offertes, et sa capacité à transmettre sa passion pour la médecine vétérinaire et à cultiver la curiosité chez ses étudiants. Je remercie aussi ma co-directrice, Débora Santschi, pour sa spontanéité, ses encouragements à mon égard et son regard critique qui ont permis la progression du projet. Également, je remercie Dr Jocelyn Dubuc et Dre Marianne Villetaz-Robichaud, les membres de mon comité conseil, d'avoir été disponibles pour me guider, m'écouter et assurer que le projet prenne la bonne direction.

Cette étude n'aurait pu aboutir sans la participation et la collaboration de l'équipe de vétérinaires et de techniciens de la clinique ambulatoire de la Faculté de médecine vétérinaire. Je remercie particulièrement Laura Van Driessche, Nicolas Barbeau-Grégoire, Caroline Forest et Jean-Philippe Pelletier pour leur implication autant académique que technique. Également, je remercie les producteurs laitiers pour leur participation et le temps qu'ils nous ont accordé.

Je reconnais l'importance du soutien financier que j'ai reçu lors de ma formation, dont le programme agroalimentaire Innov'Action (en partenariat avec le MAPAQ et Agriculture et Agroalimentaire Canada), ainsi que l'Association des Producteurs du lait Québec et les bourses reçues de la Faculté des Études Supérieures et Postdoctorales de l'Université de Montréal.

Enfin, je suis indéfiniment reconnaissante pour le support inébranlable de mes proches, particulièrement celui de mes parents Gilbert et Véronique Chancy, et de mon frère Olivier Chancy, qui m'ont donné tous les outils pour réussir, qui m'ont soutenue dans les bons comme les mauvais moments et qui n'ont jamais douté de ma réussite. Je tiens aussi spécialement à remercier mon copain Christophe Gagné pour son écoute et sa patience infinie, et d'avoir toujours cru (un peu aveuglement) en moi. Merci à mes fidèles amis, Benjamin Fouquette et Simon Gagnon, grâce à qui nous avons noyé les difficultés de la maîtrise à maintes reprises les jeudis soir.

Merci aux membres du jury, Dr Sébastien Buczinski, Débora Santschi, Dre Marion Allano et Dre Marie-Lou Gaucher pour le temps accordé à l'évaluation et à l'amélioration que vous avez permis d'y apporter.

Introduction

Dans l'industrie laitière, les jeunes veaux et les génisses de remplacement constituent l'avenir du troupeau. Il est donc important d'optimiser leurs conditions d'élevage afin d'assurer une croissance et une productivité optimales, et de limiter l'incidence de maladies (Rincker et al., 2011). La période pré-sevrage, lors de laquelle il y a de hauts taux de mortalité et de morbidité, est une étape charnière dans la vie du veau et influence la productivité future du troupeau (Winder et al., 2018). Pendant cette période, la santé des animaux dépend certes de l'alimentation, du transfert d'immunité passive obtenue via un colostrum de bonne qualité reçu en bonne quantité (Mellado et al., 2017), des normes de régie d'élevage, mais aussi du niveau d'hygiène dans lequel ils sont élevés. De plus, le colostrum est un constituant majeur de l'alimentation des veaux et est un paramètre important pour leur santé, notamment pour le transfert d'immunoglobulines maternelles et la source d'énergie et de nutriments qu'il apporte (Georgiev, 2008). Toutefois, il existe de nombreuses sources de contamination à la ferme, dont la contamination des équipements servant à alimenter les veaux, qui peut alors être une source d'introduction de bactéries au niveau du colostrum et du lait (Fecteau et al., 2002).

Compte tenu que des problèmes de santé peuvent conséquemment survenir chez ces jeunes animaux, il est important de connaître quelques techniques permettant d'évaluer la propreté des équipements servant à leur alimentation. Aujourd'hui, il existe différentes méthodes pour contrôler l'efficacité du protocole de nettoyage, dont l'inspection visuelle, qui est la plus fréquente. Celle-ci est pratique et rapide, mais n'est pas forcément fiable lorsque les équipements sont macroscopiquement propres (Renaud et al., 2017). Les analyses bactériologiques sont quant à elles plus objectives et fiables mais nécessitent plus de temps, notamment l'incubation permettant la croissance des bactéries (Lindell et al., 2018). La détection de l'adénosine triphosphate (ATP) par luminométrie représente alors une alternative intéressante pour la quantification de la contamination bactérienne des surfaces à la ferme (Mildenhall and Rankin, 2020). Cette technique, déjà utilisée dans l'industrie agroalimentaire et le monde hospitalier, fonctionne grâce à l'émission d'un signal lumineux émis proportionnellement à la quantité d'ATP présent et transmis en RLU (relative light unit).

Aujourd'hui, les standards sont bien établis pour l'échantillonnage direct de surfaces planes et l'échantillonnage indirect grâce à des liquides de rinçage (Renaud et al., 2017). Cependant, ces

méthodes ne sont pas adaptées pour les équipements d'alimentation (tétine, seau, biberon, tubulure de gaveuse ou de distributrice automatique de lait), qui ont des surfaces irrégulières, non-planes, et qui sont difficiles d'accès. Il est donc nécessaire d'établir une technique directe standardisée et répliquable, permettant d'évaluer objectivement la propreté des équipements servant à nourrir les veaux.

Ainsi, ce mémoire compile des informations concernant la contamination des équipements d'alimentation et leur évaluation par luminométrie. Également, il vise à décrire la propreté des nombreux types d'équipements retrouvés dans les fermes laitières québécoises et à décrire les pratiques de régie recommandées en ce qui a trait au nettoyage et à la désinfection des équipements.

Le mémoire comprend donc en premier lieu une étude bibliographique bâtie à partir de données publiées de la littérature scientifique. La santé et la régie des génisses de remplacement sont d'abord présentées, en insistant sur les grands thèmes de l'alimentation, du sevrage, de l'immunité et de l'environnement dans lequel évoluent les animaux. Ensuite, la contamination, la biosécurité et l'entretien des équipements d'alimentation dans les fermes sont rapportés. Finalement, la luminométrie, son fonctionnement et son utilisation sont présentés. En second lieu, une étude observationnelle traitant de la standardisation et de la validation de la luminométrie pour évaluer la propreté des équipements d'alimentation est exposée.

Chapitre 1 – Revue de littérature

1.1 La santé et la régie des génisses de remplacement dans les fermes laitières

1.1.1 La place de la génisse dans le troupeau laitier

Chez les bovins laitiers, comme chez tout autre mammifère, les femelles doivent être gestantes puis mettre bas afin de produire le lait dont le veau a besoin. La gestation, généralement induite par insémination artificielle, dure neuf mois puis entraîne, après le vêlage, une lactation d'environ 305 jours (Ennuyer et Laumonnier, 2013). Après plusieurs lactations, et par soucis de rentabilité ou de santé, la vache laitière doit être réformée. L'étude d'Haine et ses collaborateurs a révélé que le taux de réforme, pour 432 733 lactations de 156 409 vaches issues de 763 troupeaux, était de 32% (Haine et al., 2017). Autrement dit, les vaches sont réformées après 3 lactations en moyenne. Un tiers du troupeau doit donc être remplacé par de nouvelles génisses chaque année. Ces dernières représenteront, avec les jeunes taures, les animaux de remplacement du troupeau. L'élevage de génisses permet donc, d'une part, d'assurer la production de lait de par leur naissance, assurant ainsi la prospérité économique du troupeau et, d'autre part, de renouveler le cheptel en remplaçant les vaches ayant été réformées. Elles représentent donc l'avenir du troupeau laitier et c'est pourquoi il est primordial d'optimiser leurs conditions d'élevage pour leur assurer une croissance optimale et pour limiter l'incidence de maladies (Rincker et al., 2011).

1.1.2 Alimentation

Avant le sevrage, qui a généralement lieu aux alentours de 8 semaines d'âge (Medrano-Galarza et al., 2017), l'alimentation de la génisse de remplacement est fondamentale pour assurer sa santé, sa croissance, et sa production future. De manière générale, on distingue deux grandes phases d'alimentation pré-sevrage : la période des premières 24 heures de vie lors de laquelle le colostrum est offert au veau, puis la période qui consiste à alimenter le veau avec du lait ou du lait de remplacement jusqu'au sevrage. Le sevrage se définit comme l'arrêt de la phase d'alimentation lactée. Lors de cette étape, il est important d'assurer une transition adéquate entre l'alimentation liquide et solide, qui est généralement introduite dans les 1 à 3 premières semaines suivant la naissance (Medrano-Galarza et al., 2017). Au Canada, le code de pratique des bovins laitiers exige que les veaux aient au moins 8 semaines au sevrage et que la transition pour réaliser le sevrage se

fasse au moins sur une période de 5 jours (Conseil National pour les soins aux animaux d'élevage, 2023).

1.1.2.1 Colostrum

Le colostrum maternel bovin se définit comme étant la première sécrétion mammaire destinée à nourrir le veau à sa naissance. Il est composé de sécrétions lactées et de constituants du sérum sanguin, tels que des immunoglobulines et autres protéines sériques, qui s'accumulent dans la glande mammaire avant la parturition (Foley et Otterby, 1978). Le colostrum joue un rôle crucial pour le développement postnatal, la croissance et la santé de la génisse, et permet de réduire la mortalité, renforcer l'immunité et allonger la durée de vie (Quigley et Drewry, 1998, Rauprich et al., 2000, Yang et al., 2015).

Celui-ci est d'abord un aliment très riche et une source d'énergie vitale pour le jeune veau naissant : il est composé à 23,9% de matières sèches, dont 14% de protéines brutes (caséine, albumine et immunoglobulines), 6,7% de matières grasses, 2,7% de lactose, et 1,1% de minéraux et vitamines. Toutefois, ces proportions varient selon plusieurs paramètres dont la race, la parité, les individus, et l'alimentation pré-partum, entre autres (Foley et al., 1978). Le colostrum contient aussi des facteurs antimicrobiens non-spécifiques tels que le lysozyme, la lactoferrine, le complément et des leucocytes (1 million de cellules somatiques par millilitre) avec 40 % de macrophages, 38 % de neutrophiles, et 23 % de lymphocytes (Duhamel, 1986 et Ennuyer et Laumonier, 2013). Il est également composé de facteurs de croissance (IGF-1 et IGF-2) et d'hormones (insuline, prolactine, cortisol et hormones thyroïdiennes) (Georgiev, 2008). L'énergie fournie par la consommation de colostrum rapidement après la naissance permet donc à la génisse, qui naît avec de très faibles réserves énergétiques, de réguler et de maintenir sa température corporelle (Quigley et Drewry, 1998). Cela permet aussi d'augmenter la capacité d'absorption de l'intestin grêle, ce qui est essentiel pour l'utilisation des nutriments et des immunoglobulines (Georgiev, 2008). Cependant, de par sa composition chimique, le colostrum est aussi un milieu de culture idéal pour la prolifération bactérienne (Fecteau et al., 2002), d'autant plus s'il est maintenu à température ambiante avant d'être distribué aux génisses. Les différentes voies de contamination du colostrum et leurs impacts seront abordés dans la section 1.6.

Le colostrum joue également un rôle prépondérant dans l'immunité des génisses. Davantage d'informations concernant l'immunité transférée par le colostrum seront amenées dans la section 1.4.

1.1.2.2 Lait et lactoreplaceur

Le colostrum administré lors des premières heures de vie est ensuite remplacé par du lait venant de la mère ou d'une autre vache, ou par un lactoreplaceur qui est une poudre de lait et de différents composants à reconstituer, jusqu'à ce que le veau soit sevré. Aujourd'hui, il existe une multitude de systèmes d'alimentation et de régimes alimentaires pour les veaux en période de pré-sevrage. De manière générale, il est préconisé de donner au minimum 2 ou 3 repas, pour un total minimal de 6 à 8 litres de lait par jour (Khan et al., 2011). Le nouveau code de pratiques pour le soin et la manipulation des bovins laitiers exige que les veaux nouveau-nés (de 1 à 28 jours) reçoivent au moins 15% de leur poids de naissance (soit 6L) et au moins 20% de ce même poids (soit 8L) après 28 jours (Conseil National pour les soins aux animaux d'élevage, 2023).

1.1.2.3 Alimentation solide et eau

En complément du lait offert au veau, de l'eau doit être disponible à volonté et ce, dès la naissance (Wickramasinghe et al., 2019). Effectivement, autant pour la vache que pour le jeune veau, l'eau permet la digestion, le métabolisme et le transport des nutriments, l'excrétion des déchets métaboliques, la thermorégulation, et le maintien des équilibres ioniques et liquidiens (Lowe et al., 2022). De plus, plusieurs études ont démontré que la consommation d'eau stimule la prise alimentaire, notamment pour l'alimentation solide, et est étroitement associée au gain moyen quotidien (Thickett et al., 1981; Kertz et al., 1984; Khalili et al., 1992; Wickramasinghe et al., 2019).

En plus du lait et de l'eau, l'alimentation des veaux en pré-sevrage doit être composée d'aliments solides, en majorité des concentrés (comme les grains) et des portions de fibres végétales hachées (fourrages), comme la paille ou le foin (Kertz, 2022). La consommation d'aliments solides se fait progressivement au cours de la croissance et de l'évolution physiologique du système digestif puisqu'à la naissance, seule la caillette est fonctionnelle et permet la digestion du lait. Le rumen se développe peu à peu et devient fonctionnel lorsque l'alimentation se diversifie grâce aux concentrés, qui produisent des acides gras volatils une fois digérés et stimulent la

croissance des papilles ruminales. En bref, un système alimentaire adéquat permet d'assurer une croissance et une santé optimale, tout en réduisant la mortalité et la morbidité (Armengol et Fraile, 2020).

1.1.3 Les phases de croissance

1.1.3.1 La période pré-sevrage

La période de pré-sevrage, qui correspond généralement aux deux premiers mois de vie du veau (66 jours en moyenne) selon l'étude récente du National Animal Health Monitoring System américain réalisée sur 2406 génisses issues de 104 troupeaux, est une phase cruciale pour le développement de celui-ci. Le veau, qui pèse entre 35 et 43 kg à la naissance selon la race, double son poids pendant les 8 premières semaines de vie, pour atteindre en moyenne 89,4 kg au sevrage, ce qui représente un gain moyen quotidien (GMQ) de 730 grammes par jour (Urie et al., 2018).

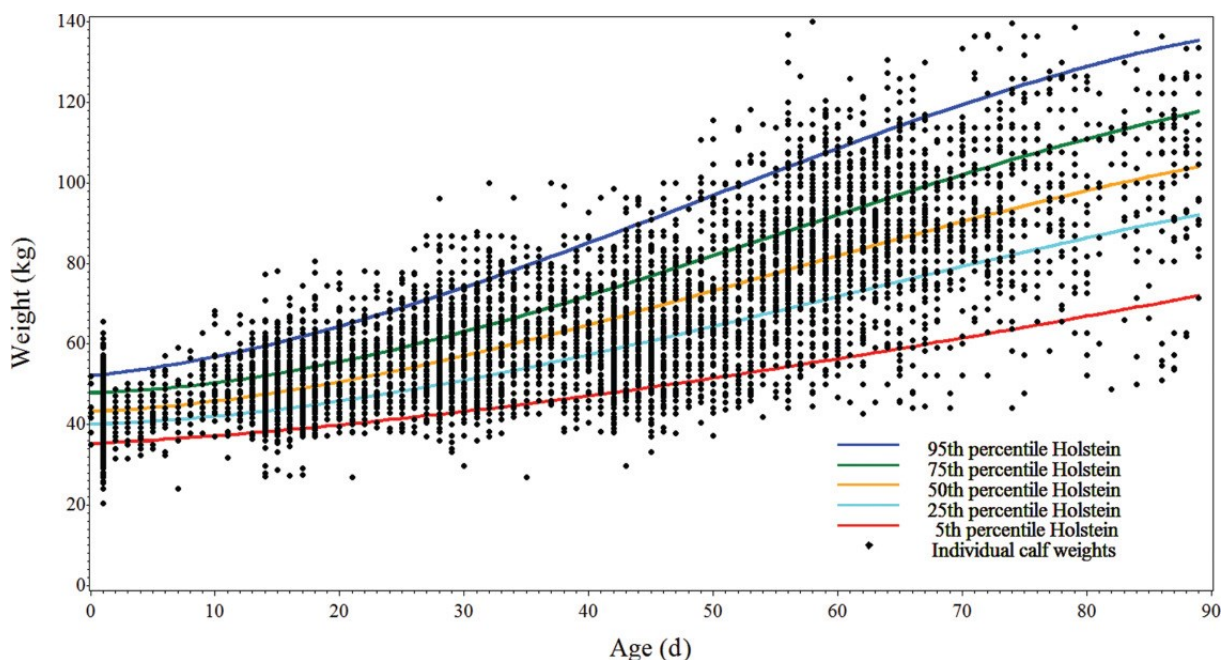


Figure 1. - Courbe de croissance des génisses laitières en période de pré-sevrage aux États-Unis (n = 2273) (Urie, 2018)

L'alimentation du veau, ses conditions de vie, son environnement, et la propreté de ce dernier influenceront, à long terme, son état de santé et sa production de lait. Il a d'ailleurs été

démonstré qu'une alimentation appropriée en période de pré-sevrage favorise une croissance optimale, ce qui permettrait de réduire l'âge au premier vêlage (Duplessis et al., 2015).

Aussi, la période pré-sevrage est d'autant plus cruciale puisque l'élevage de génisses de remplacement représente 15 à 20% du coût total de production d'une ferme laitière, soit la 2^e dépense la plus importante après les coûts liés à l'alimentation des vaches en lactation (Heinrichs, 1993). Les maladies qui surviennent lors de cette période accroissent donc significativement le coût de production, de par les frais engendrés par les mortalités et les traitements médicamenteux, mais aussi les effets potentiels à long terme sur les performances des animaux (Lorenz et al., 2011).

De plus, la survenue de maladies telles que les diarrhées est associée à une baisse de la production laitière lors de la première lactation (Abuelo et al., 2021). Dans cette étude américaine réalisée sur 2 272 veaux issus d'un grand troupeau, les génisses ayant eu un épisode de diarrhée (n = 926) pendant la période pré-sevrage produisaient 325 kg de lait de moins par rapport aux animaux sains lors de leur 1^{ère} lactation (production moyenne sur 305 jours : 16 893 kg de lait (IC 95% : 14 691 – 19 094) vs 17 218 kg (IC 95% : 15 011 – 19 425)). Une étude suédoise a rapporté la même association, soit une diminution de 344 kg pour les génisses ayant eu des épisodes de diarrhée lors des trois premiers mois de vie (Svensson et Hultgren, 2008). Aussi, une méta-analyse de Buczinski et al. (2021) regroupant les résultats de 5 études pour lesquelles la production laitière en 1^{ère} lactation était disponible, a révélé que les génisses ayant été affectées par le complexe respiratoire bovin (BRD), outre leur risque accru de mortalité ou de réforme avant le 1^{er} vêlage, produisaient 121,2 kg (IC 95% : 57,4-184,9) de lait en moins que les animaux non affectés.

1.1.3.2 Le sevrage

Par définition, le sevrage, qui survient généralement autour de la huitième semaine de vie pour la génisse laitière de remplacement, consiste à diminuer progressivement l'alimentation lactée offerte à la génisse et à la remplacer par une alimentation solide. Aujourd'hui, il existe de très nombreuses méthodes de sevrage dont le détail dépasse le cadre de cette revue de littérature. Cependant, le principe est toujours sensiblement le même. Lors de la préparation au sevrage, il est préconisé de diminuer l'apport en lait durant les deux dernières semaines précédant le sevrage dans le but de favoriser la consommation d'aliments solides comme les fourrages ou les concentrés (Ennuyer et Laumonier, 2013). Il est primordial que l'animal à sevrer soit capable de consommer suffisamment de concentrés pour se passer de l'apport du lait. On recommande généralement une

consommation minimale de 1,4 kg de concentrés par jour pendant au moins 3 jours consécutifs (Conseil National pour les soins aux animaux d'élevage, 2023). L'accès continu à l'eau et un renouvellement fréquent des aliments solides permettent, entre autres, de stimuler la consommation. La phase de sevrage est, elle aussi, très importante puisqu'elle peut également impacter la santé et la productivité de la génisse à court et long terme (Kertz et al., 2017). Le stress généré par ce changement alimentaire est en effet propice à la survenue de maladies et à des altérations de croissance (Curtis et al., 1988; Svensson et al., 2003)

1.1.4 Immunité

1.1.4.1 Rôle et définition

L'immunité désigne la capacité d'un organisme à se défendre face à des éléments étrangers tels que des agents infectieux. Les immunoglobulines (Ig) sont parmi les principaux agents qui participent à la protection de l'organisme (Grappier et al., 2007). Ces glycoprotéines, de type gamma-globuline, identifient et neutralisent les microorganismes pathogènes pour protéger l'hôte, et sont présentes dans le sérum, la lymphe et les fluides biologiques, dont le colostrum et le lait (Butler, 1983). Chez les bovins, il existe plusieurs classes d'Ig, soit les immunoglobulines G (IgG), les immunoglobulines M (IgM), et les immunoglobulines A (IgA), en proportion respective de 85-90%, 7% et 5% (Larson et al., 1980). Les IgG sont divisées en deux sous-catégories : les IgG₁ et les IgG₂. Le colostrum et le lait bovin sont constitués en majorité d'IgG₁ à 75-90% (Butler, 1983). Les IgG ont de nombreuses fonctions, notamment l'activation du complément, l'opsonisation et l'agglutination des bactéries, et se lient à des sites spécifiques à la surface des agents infectieux pour les inactiver ou réduire l'infection (Lilius et al., 2001). Le tableau I ci-dessous représente les concentrations moyennes de chaque classe et sous-classe d'Ig dans le sérum, le colostrum, et le lait bovin.

Tableau 1. - La concentration moyenne d'immunoglobulines (en mg/mL) du sérum et des sécrétions mammaires chez le bovin (Gapper et al., 2007).

Immunoglobuline	Concentration (en mg/mL)		
	Sérum	Colostrum	Lait
IgG total	25,0	32-212	0,72
IgG ₁	14,0	20-200	0,60
IgG ₂	11,0	12,0	0,12
IgA	0,4	3,5	0,13
IgM	3,1	8,7	0,04

1.1.4.2 Intervention du colostrum dans l'immunité bovine

1.1.4.2.1 La particularité de la gestation chez les bovins

Chez les bovins, la placentation est de type cotylédonaire synépithéliochorial (Peter, 2013). Cette particularité anatomique empêche l'échange de sang et le transfert d'Ig entre la mère et le fœtus lors de la gestation. Cette barrière structurale a l'avantage d'éviter une éventuelle transmission d'agents infectieux au fœtus, mais rend les veaux naissants agammaglobulinémiques (Delhez et al., 2021). Ils sont donc entièrement dépendants du colostrum qui outre son rôle nutritif fournit un apport rapide et vital en IgG au moment où l'intestin du veau y est perméable (dans les 24 à 36 premières heures de vie (Weaver et al., 2008)).

1.1.4.2.2 Le transfert d'immunité passive

Le transfert d'immunité passive (TIP) se définit comme étant le transfert d'Ig (présentes en grande quantité dans le colostrum maternel) au sérum du ruminant nouveau-né, lui conférant un système de défense temporaire, jusqu'à ce que son propre système immunitaire devienne mature (Butler, 1983; Korhonen et al., 2000). Ce terme est utilisé en opposition à l'immunité active via laquelle les différents composants du système immunitaire du veau deviennent fonctionnels, indépendamment de la mère. Ce processus survient entre 2 et 4 semaines d'âge (Chase et al., 2008).

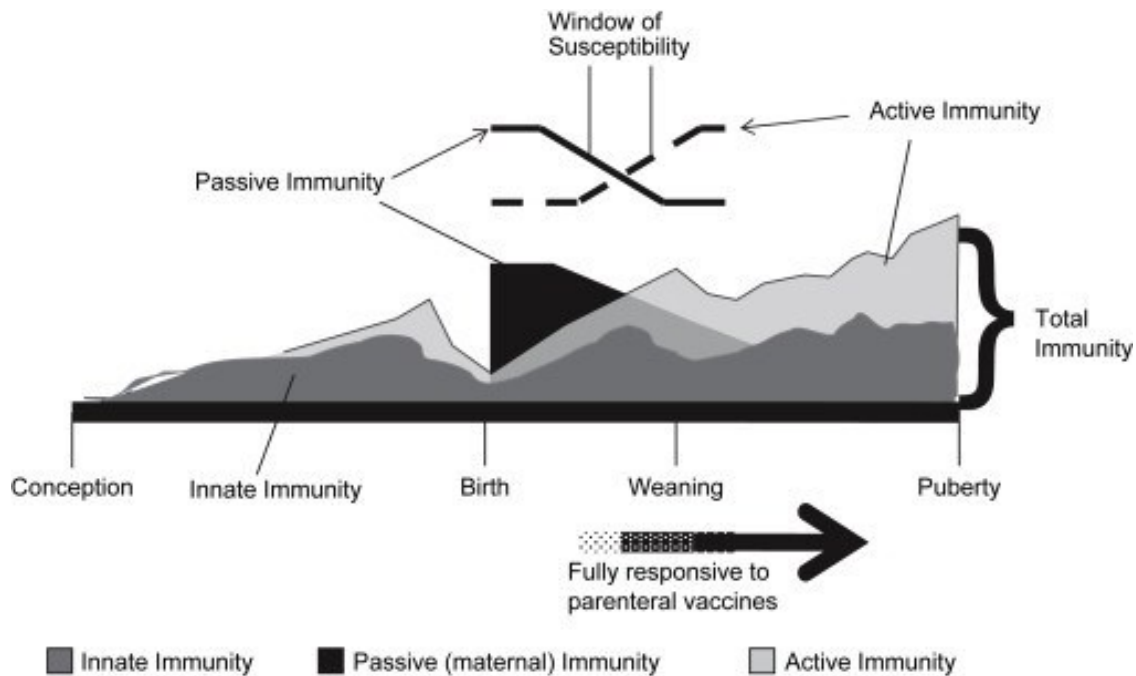


Figure 2. - Développement de la réponse immunitaire chez le veau, de la conception à la puberté (Morein et al., 2002)

1.1.4.2.3 L'importance d'un transfert d'immunité passive adéquat

Le TIP est déterminé comme étant satisfaisant lorsque la concentration en IgG sérique chez les veaux est supérieure à 10 g/L (Vogels et al., 2013; Elshohaby et Keefe, 2015). Les veaux qui consomment ou absorbent une quantité insuffisante d'IgG colostrales sont ainsi prédisposés à plusieurs maladies infectieuses néonatales et à une perte de productivité à long terme (Fecteau et al., 2013). Aussi, un défaut de TIP se traduit par une augmentation du taux de réforme chez les animaux en première lactation (Tyler et al., 1996b; Godden, 2008), une diminution du gain moyen quotidien (Robison et al., 1988), et une augmentation de la mortalité, de la morbidité et des coûts de production (Morin et al., 1997; Jaster, 2005). Aujourd'hui, la prévalence d'échec de TIP, correspondant généralement à une concentration d'IgG sérique inférieure à 10 g/L, chez les veaux laitiers en Amérique du Nord s'élève à 12% (Lombard et al., 2020; NAHMS Dairy 2014).

1.1.5 Principales pathologies rencontrées chez les génisses de remplacement

Indépendamment de la protection conférée par l'immunité, la période de pré-sevrage représente une période à risque pour le développement de maladies et pour la santé des génisses

puisque c'est lors des trois premières semaines de vie du veau que la mortalité est la plus élevée : les maladies entériques touchent 19% des génisses, alors que les maladies respiratoires touchent 11% d'entre elles (Urie et al., 2018). D'autres affections (citons les affections ombilicales, articulaires, ou liées à une septicémie/bactériémie) sont également rencontrées (Dachrodt et al., 2021). Toutefois, malgré les connaissances actuelles, la mortalité moyenne chez les veaux en pré-sevrage s'élevait à 6,4% et chutait à 2,4% après le sevrage, avec une forte variabilité, selon une étude pan-canadienne récente réalisée dans 1373 fermes (Winder et al., 2018). Ces pourcentages de mortalité représentent donc une perte économique importante pour les producteurs et laissent place à amélioration. Cela démontre l'importance de cette étape charnière qu'est la période de pré-sevrage dans la vie d'un veau, et de l'attention particulière qui devrait y être accordée.

1.1.6 L'impact de l'environnement sur la santé des veaux

Bien que l'immunité joue un rôle crucial sur la santé du veau, l'environnement et le logement dans lesquels vont évoluer les animaux ont une importance tout aussi capitale puisque ces paramètres exercent une influence sur les maladies néonatales (Lago et al., 2006; McGuirk, 2008). Au sein de l'environnement direct du veau, il existe différents éléments pouvant être à l'origine d'une pression infectieuse qui peut excéder les capacités de défense du système immunitaire immature de la génisse, tel que représenté à la Figure 3. Nous nous concentrerons principalement sur la contamination des équipements servant à l'alimentation des veaux après un survol des autres paramètres composant leur environnement.

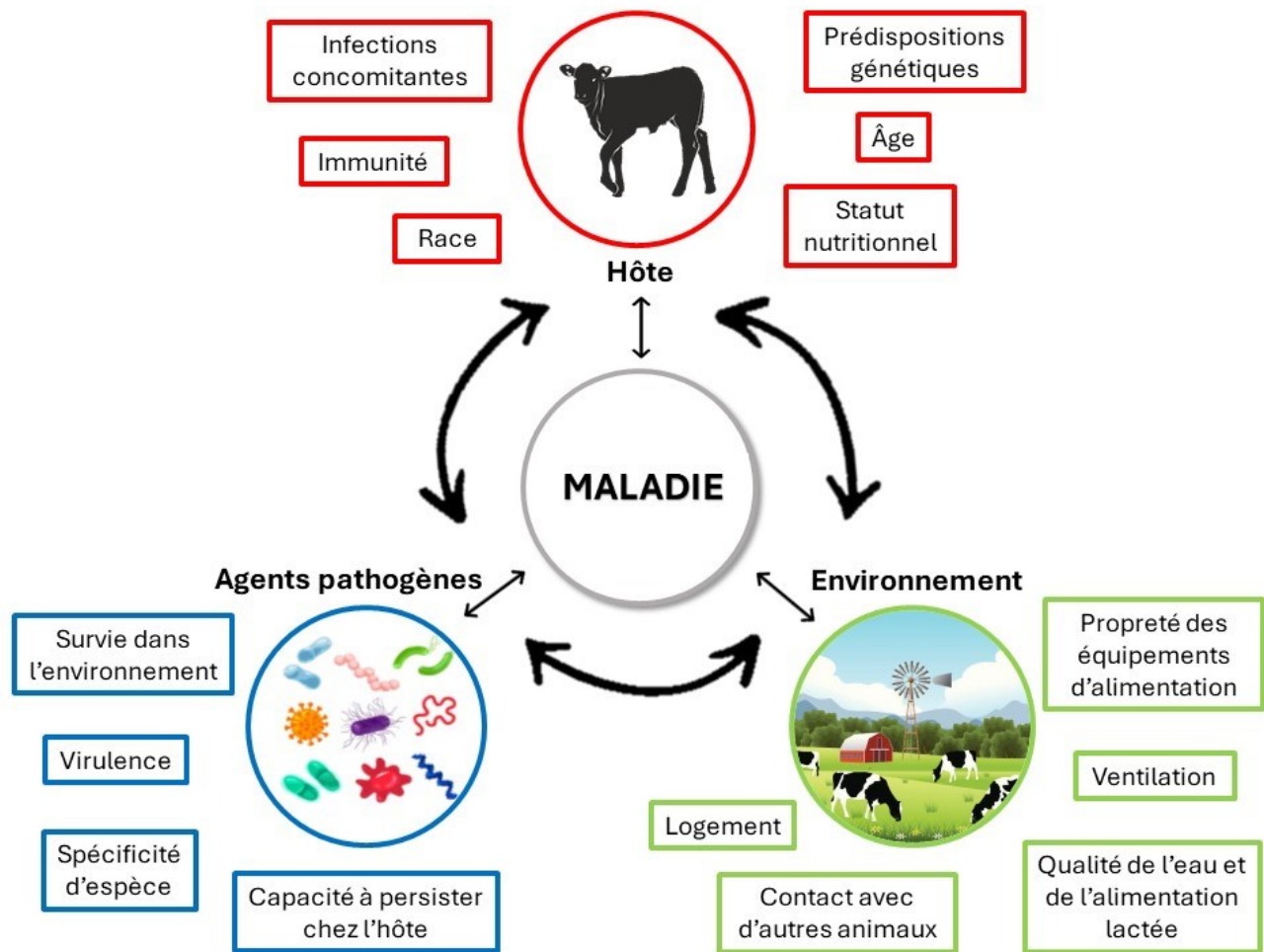


Figure 3. - Les différents facteurs menant à l'apparition et la propagation de maladies chez les génisses laitières (adapté de Dewulf et van Immerseel, 2018).

1.1.6.1 Logement

Un des principaux facteurs dont va dépendre la santé et le bien-être de la génisse est le logement, au sens large du terme, dans lequel elle évoluera. Plusieurs paramètres sont à prendre en considération concernant le logement des veaux : un logement individuel ou en groupe, un type de litière plutôt qu'un autre et sa gestion, ou encore le genre de logement en lui-même (type de cloisonnement pour le délimiter, matériaux utilisés, positionnement et capacité à être correctement ventilé, etc.). Lors d'une étude menée sur 24 veaux aux États-Unis, il a été montré que comparativement au logement individuel, le logement en paire (qui consiste à loger les veaux en groupe de deux) des génisses laitières pendant la période de pré-sevrage permet de répondre aux besoins sociaux naturels du veau, et qu'il est bénéfique pour la prise de poids et la consommation

d'aliments solides pendant la période de pré-sevrage (Knauer et al., 2021; Costa et al., 2016). Toutefois, concernant les effets du logement en groupe sur la santé du veau, certaines études montrent qu'il existe un risque plus important pour l'apparition de maladies, tandis que d'autres études ne notent aucune différence, voire une meilleure santé des animaux lorsqu'ils sont en groupe (Costa et al., 2016). L'effet principal du logement en groupe est qu'il favorise la socialisation des veaux et diminue donc leur stress lorsqu'ils sont ensuite mis en grand groupe, suite au sevrage. Les veaux en groupe consomment aussi plus de concentrés, ce qui rend le stress physiologique du sevrage moindre, en comparaison avec les veaux gardés seuls (Bach et al., 2010).

De plus, concernant le type de logement et de litière utilisés, une autre étude américaine réalisée sur 70 veaux a rapporté que les animaux logés dans un enclos avec de la paille ont un gain moyen quotidien supérieur et présentent moins de jours de diarrhée que les veaux couchés sur du sable et dans des huches ou des enclos. Les auteurs ont aussi rapporté que les concentrations de bactéries en suspension dans l'air et l'humidité étaient plus faibles dans les enclos que dans les huches (Hill et al., 2011). Ces différences peuvent s'expliquer en partie par la qualité de la ventilation variable d'une étable à une autre et à des caractéristiques d'échange d'air avec le reste de l'étable ou l'extérieur.

Également, les enclos ou parcs de vêlage ne devraient jamais être utilisés pour loger des animaux malades afin de limiter le risque de contamination de ces derniers. Il est aussi suggéré que ces logements devraient être nettoyés et désinfectés avant et après chaque mise-bas (Gorden et Plummer, 2010).

1.1.6.2 Ventilation

La ventilation des étables peut elle aussi exposer les veaux à des bactéries et autres agents pathogènes, particulièrement lorsqu'il n'existe qu'une ventilation naturelle (Lago et al., 2006; Ollivett et al., 2020). Il a été ainsi démontré par une étude réalisée dans 13 fermes ventilées naturellement, qu'une augmentation des débits de ventilation améliore la qualité microbiologique de l'air. Aussi, des comptes bactériens élevés dans l'air des enclos étaient associés à une augmentation de la prévalence des veaux atteints de maladies respiratoires (Lago et al., 2006). Différentes recommandations existent afin de contrôler au mieux ce paramètre mais dépassent le cadre de cette revue (Nordlund et Halbach, 2019).

1.1.6.3 Alimentation et équipements d'alimentation

Aujourd'hui, nous savons que le colostrum et le lait, qui composent principalement l'alimentation des génisses en pré-sevrage, représentent également un vecteur de contamination possible dans l'environnement immédiat des animaux, et que leur qualité a un impact déterminant sur leur santé (Armengol et Fraile, 2016; Hyde et al., 2020). Effectivement, le lait et le colostrum peuvent être une source de transmission d'agents infectieux lorsque les équipements qui servent à faire boire les génisses sont eux-mêmes contaminés, par exemple (Fecteau et al., 2002; Heinemann et al., 2021). Dans le cadre d'une étude québécoise réalisée dans 6 fermes et totalisant 234 échantillons de colostrum, 94,4% des échantillons comprenaient au moins 1 type de micro-organismes et plus d'un tiers des échantillons avaient un compte de bactéries aérobies total (TBC) supérieur à 100 000 CFU/mL (Fecteau et al., 2002). Les seuils généralement utilisés pour quantifier une contamination bactérienne significative pour le lait et le colostrum sont $> 100\ 000$ CFU/mL pour les bactéries aérobies totales et $> 10\ 000$ CFU/mL pour les coliformes totaux (TCC) (McGuirk et Collins, 2004).

Une étude irlandaise, menée dans 66 fermes, s'est également intéressée à l'impact du nettoyage de différents équipements d'alimentation sur leur niveau de contamination. Celle-ci a été rapportée en termes de TVC (Total Viable Count), TCC (Total Coliform Count) et en dénombrement d'*Escherichia coli* comme indicateurs d'hygiène. Ainsi, il a été observé que les échantillons de lait de remplacement provenant des louves (distributeur automatique de lait) étaient plus susceptibles de se situer dans l'intervalle cible ($< 4.0 \log_{10}$ CFU/mL) de TVC (probabilité de 0,63, $P < 0,1$) que ceux préparés manuellement (probabilité de 0,34, $P < 0,1$). Ceci suggère donc que certains équipements d'alimentation sont moins susceptibles d'être contaminés et d'altérer la qualité du lait. Quant au nettoyage, il a été remarqué que lorsque les équipements d'alimentation tels les biberons sont nettoyés après chaque repas, il y a une plus grande probabilité d'être dans l'intervalle cible de TVC ($P < 0,05$, probabilité de 0,47 en comparaison à 0,23 lorsqu'ils ne sont pas nettoyés après chaque repas) (Brown et al., 2023).

De plus, une étude américaine réalisée sur 49 veaux a étudié un premier groupe alimenté par du colostrum n'ayant pas reçu de traitement thermique ($n = 24$) et un autre par du colostrum traité thermiquement ($n = 25$). Il a ensuite été démontré que lorsque le colostrum n'est pas traité par la chaleur et qu'il est contaminé, entre autres par des équipements mal nettoyés, une moins

bonne absorption des IgG est observée (18,07 mg/mL d'IgG (IC 95% : 10,01-30,6) en moyenne dans le sérum 24h après l'alimentation pour le colostrum non-traité, et 22,34 mg/mL (IC 95% : 13,0-31,0) pour le colostrum traité). Cela entraîne ainsi un moins bon TIP (Johnson et al., 2007), bien que d'autres éléments tel que le volume de colostrum offert au veau soient impliqués également.

Les recherches menées par Armengol et Fraile (2016 et 2020), réalisées sur 261 veaux, ont permis de tirer les mêmes conclusions. La pasteurisation du lait et du colostrum pendant les 21 premiers jours de vie du veau permet de réduire la mortalité et la morbidité associées au BRD pendant la première année de vie (morbidité de 10,4% pour les veaux avec une alimentation pasteurisée vs. 21,8% pour les autres, $P = 0,02$), ainsi que la morbidité associée à la diarrhée pendant les 180 premiers jours de vie (4,7% pour les veaux avec une alimentation pasteurisée vs. 12,7% pour les autres, $P = 0,03$).

La pasteurisation est également associée à une augmentation du poids au vêlage lors des 3 premières lactations ($531,7 \pm 3,8$ kg au 1^{er} vêlage pour les veaux avec l'alimentation pasteurisée vs. $492,6 \pm 3,8$ kg pour les autres, $P < 0,01$) et une augmentation de la production de lait pendant la première lactation ($10\ 147 \pm 161$ kg pour le groupe ayant reçu une alimentation pasteurisée vs. 9574 ± 209 kg pour les autres, $P = 0,04$).

En bref, un colostrum ou un lait de bonne qualité microbiologique et donc exempt de contamination est un atout pour la santé du veau à court et long terme. Toutefois, lorsque le colostrum est récolté dans de bonnes conditions, la pasteurisation n'est pas forcément l'option à prioriser en raison du microbiote présent dans le colostrum non-traité thermiquement et qui est bénéfique pour le veau (Lima et al., 2017).

1.2 Contamination, biosécurité et entretien des équipements d'alimentation

1.2.1 L'importance de la qualité du lait et du colostrum sur la santé du veau

Fournir une alimentation lactée exempte de contamination peut parfois s'avérer un défi puisque les étapes entre la traite ou la préparation du lait et l'ingestion de celui-ci par le veau sont nombreuses et nécessitent la manipulation de plusieurs équipements. Chacune d'entre elles peut

donc altérer la qualité du lait et du colostrum. Comme il le sera décrit ci-dessous, le lait peut d'abord être contaminé dès sa sortie du pis, suite à sa préparation, ou encore lors de sa distribution.

Effectivement, le non-respect des règles d'hygiène personnelle telle la propreté des mains des employés peut être un vecteur passif pour la contamination par contact indirect avec le lait offert aux veaux. Le statut infectieux de la mère joue aussi un rôle sur la qualité microbiologique du lait, notamment si un ou plusieurs de ses quartiers sont affectés par une mammite, par exemple (Dewulf et van Immerseel, 2018).

La qualité de l'eau est importante, puisqu'elle permet le nettoyage et le rinçage des équipements d'alimentation, mais aussi la préparation du lactoreplaceur. D'ailleurs, une étude ontarienne s'intéressant au sujet a prélevé des échantillons d'eau de robinets et de tuyaux d'arrosage des laiteries (servant à laver les équipements) dans 5421 fermes différentes et a déterminé que des bactéries telles qu'*E.coli* et des coliformes étaient présents dans 13,6% et 53,8% des échantillons d'eau, respectivement (Perkins et al., 2009).

De plus, tel que mentionné à la section précédente, la propreté des équipements qui servent à alimenter les veaux, tels les biberons, tétines, et chaudières, occupe une place tout aussi grande, puisque ceux-ci sont au contact direct du lait que les animaux consomment. Dans une étude réalisée au Royaume-Uni dans 56 fermes, des échantillons de colostrum étaient récoltés directement du pis de la vache (n = 58 échantillons), alors que d'autres étaient prélevés à partir des équipements dans lesquels le colostrum est collecté et servi aux veaux (n = 270 échantillons) (Hyde et al., 2020). Cette comparaison a mis en lumière que seulement 6,9% des échantillons provenant directement des vaches dépassaient les seuils maximaux de TBC ou de TCC mentionnés ci-dessus (section 1.6.3), alors que 37% et 34,4% des échantillons venant des équipements dépassaient ces seuils, respectivement. Cela suggère donc que la contamination bactérienne du colostrum est, dans ce cas-ci, peu susceptible de venir de la vache, mais plutôt des équipements mal nettoyés qui servent à fournir ce lait, de la période entre laquelle le colostrum est récolté et servi, et/ou du risque de contamination lié aux manipulations du pis (Hyde et al., 2020; Stewart et al., 2005). Il est donc primordial d'avoir des équipements d'alimentation propres pour assurer une bonne qualité du colostrum et du lait, et par le fait même, optimiser les conditions d'élevage des veaux. Après avoir examiné les mesures de biosécurité visant à prévenir la contamination à la ferme, la suite de la revue de littérature s'attardera particulièrement sur ce dernier point.

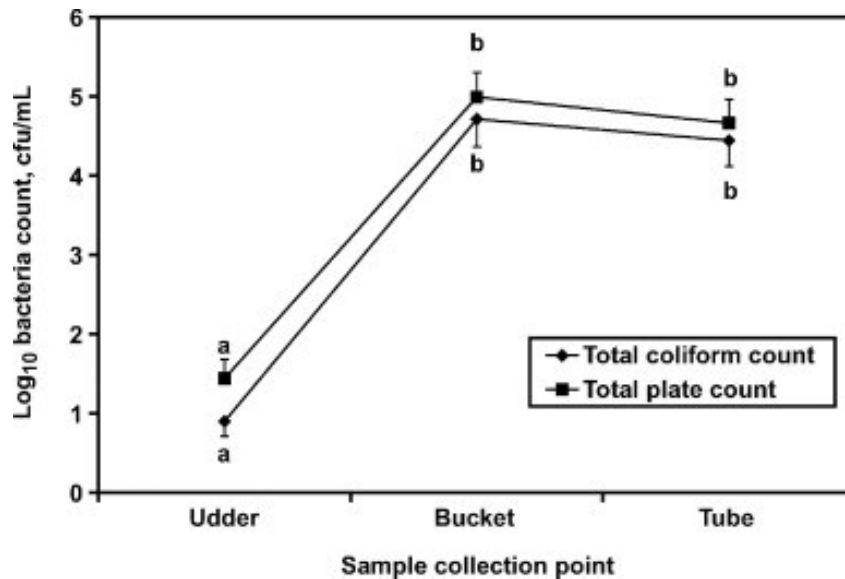


Figure 4. - Compte bactérien total (total plate count) et compte de coliformes totaux (total coliform count) en log₁₀ pour les échantillons de colostrum prélevés à partir du pis, d'un seau et d'un tube à gaver œsophagien. a,b Les indices diffèrent au sein du groupe de types de bactéries, P < 0,05 (Stewart et al., 2005).

1.2.2 Normes de biosécurité

Le maintien d'un environnement propre, permettant d'avoir des équipements d'alimentation les moins contaminés possible, passe donc par la mise en place de normes de biosécurité à la ferme. D'abord, la biosécurité se définit comme étant un ensemble de plusieurs mesures mises en place dans le but de réduire le risque d'introduction (biosécurité externe) et de propagation d'agents pathogènes (biosécurité interne) (Barcelo et Marco, 1998 ; Amass et Clark, 1999). Ces mesures sont assez diverses et peuvent varier d'un type de production à un autre, ou même d'un troupeau ou d'un animal à un autre, selon les restrictions ou problématiques rencontrées. Globalement, elles ont pour but d'améliorer la santé animale, humaine et environnementale, et doivent être adoptées par tous les partis impliqués dans l'élevage pour être efficaces (producteurs, employés, vétérinaires, intervenants, etc.) (Dewulf et van Immerseel, 2018).

La biosécurité a une importance majeure puisque c'est sur celle-ci que les programmes de prévention et de contrôle des maladies sont bâtis. Ainsi, si les fermes ne misent pas ou peu sur les mesures préventives et de biosécurité, les troupeaux sont plus souvent exposés à des pathogènes et sont plus souvent malades. L'aspect curatif prend alors une place majeure au niveau de la régie

(figure 5, à droite). À l'inverse, si la biosécurité et les mesures de prévention sont bien établies (figure 5, à gauche), cela permet de réduire l'utilisation de traitements curatifs pour les animaux, et de rendre les mesures préventives (vaccination, utilisation d'additifs alimentaires, etc.) plus efficaces (Dewulf et van Immerseel, 2018). En réduisant ainsi la pression d'infection, cela permet également de diminuer l'utilisation des antibiotiques (aussi bien en prophylaxie qu'en thérapie curative) et d'améliorer la santé et la productivité des animaux (Lindberg et Houe, 2005; Laanen et al., 2013; Oliveira et al., 2017). Une étude regroupant 232 troupeaux porcins répartis entre la Belgique, la France, l'Allemagne et la Suède a utilisé un système de notation pondérée pour évaluer l'importance de la biosécurité. Il a ainsi été démontré que la fréquence de traitement contre certains symptômes respiratoires ou gastrointestinaux (utilisée comme indicateur de l'incidence de maladies) est significativement moindre dans les fermes avec des normes de biosécurité plus élevées ($P = 0,03$) (Postma et al., 2016). Bref, en réduisant l'introduction et la propagation de maladies, la biosécurité permet de diminuer les taux de mortalité et de morbidité et est donc un outil pour la gestion quotidienne de la santé des troupeaux.

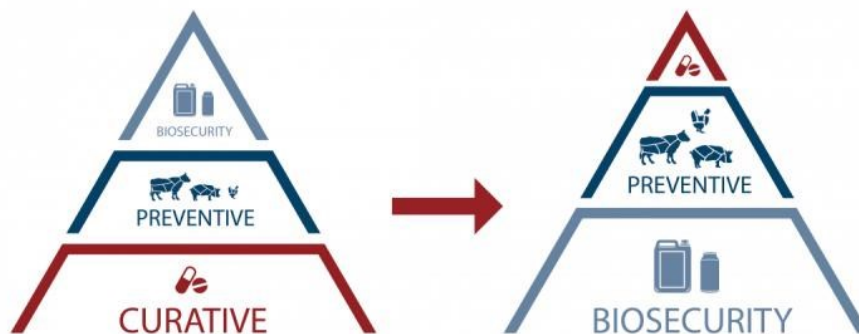


Figure 5. - La biosécurité comme outil pour la réduction de l'utilisation des traitements préventifs et curatifs (adapté de Dewulf et van Immerseel, 2018).

Concrètement, il existe de nombreuses normes de biosécurité qu'il est possible d'implanter en production laitière, tel que récemment décrit par Denis-Robichaud et al. (2019). Le dépistage de maladies, l'isolement de nouveaux animaux intégrant le troupeau, le contrôle de l'accès des visiteurs, l'obligation de porter des vêtements et chaussures dédiés uniquement à la ferme, ou encore la mise en place d'enclos utilisés exclusivement pour les animaux malades sont des exemples de mesures applicables rapportées dans la littérature (Moore et al., 2010; Sarrazin et al.,

2014; Emanuelson et al., 2018; Denis-Robichaud et al., 2019). Également, l'instauration d'un protocole de nettoyage et de désinfection adéquat du matériel d'alimentation des veaux est un autre exemple de norme de biosécurité. C'est sur cet aspect que nous développerons notre revue de façon plus détaillée.

1.2.3 Les protocoles de nettoyage et de désinfection et leur rôle

Dans tout milieu visant à contrôler l'apparition et la propagation d'infections, comme les hôpitaux, les cliniques vétérinaires, les refuges pour animaux ou encore les fermes laitières, les protocoles de nettoyage et de désinfection jouent un rôle essentiel (Aceto, 2015). L'objectif premier est de diminuer la charge microbienne sur les surfaces et dans l'air de façon à ce que la majorité, et idéalement la totalité, des agents pathogènes et zoonotiques soient éliminés. Le nettoyage permet l'élimination physique de la matière organique et du biofilm afin d'exposer les microorganismes au désinfectant qui est ensuite utilisé (Dewulf et van Immerseel, 2018).

Dans le domaine des productions animales, les protocoles et normes de nettoyage et de désinfection peuvent varier selon le type de production (porcine, aviaire, laitière, etc.) et selon les établissements. Par exemple, il est rapporté qu'en productions porcine et avicole, le concept « tout-plein tout-vide » est largement implanté. Cela consiste à élever les animaux d'un même stade physiologique, d'un même poids et d'un même âge dans le même bâtiment, et de les faire progresser ensemble jusqu'à leur sortie de la production, afin de minimiser la propagation d'infections entre différents lots (Maes et al., 2008; Hémonic et al., 2010). Le nettoyage et la désinfection des locaux entièrement vides se fait alors plus efficacement et permet aux prochains lots de jeunes animaux d'arriver dans un environnement avec peu ou pas de pathogènes et avec une pression d'infection très basse (Alarcón et al., 2021; de Gussem et al., 2013). Toutefois, dans les élevages où les animaux restent à plus long terme dans la production, comme dans la filière laitière, le nettoyage et la désinfection ne peuvent être appliqués aussi aisément et doivent donc être réalisés partiellement et graduellement (Dewulf et van Immerseel, 2018). On doit également bien distinguer le nettoyage et la désinfection des bâtiments d'élevage par rapport aux équipements servant à distribuer l'alimentation. Nous nous focaliserons plus spécifiquement sur ce dernier aspect qui est au cœur de notre projet de recherche.

Aujourd'hui, afin d'assurer des conditions d'élevage optimales, il est rapporté qu'un protocole de nettoyage et de désinfection adéquat doit comporter sept grandes étapes qui seront

décrites ci-dessous (Dewulf et van Immerseel, 2018). Ces étapes doivent ensuite être adaptées au type de surface ou de matériel qui est sélectionné.

1.2.3.1 Les 7 étapes d'un protocole de nettoyage et désinfection

Les premières étapes de nettoyage jouent un rôle capital dans l'efficacité du protocole et sont tout aussi importantes que la désinfection. En effet, le nettoyage permet bien sûr l'élimination physique de la matière organique, mais permet aussi une réduction plus importante de la contamination microbienne que la simple désinfection. C'est ce qui a récemment été démontré par Luyckx et al. (2015a) dans une étude réalisée dans 6 poulaillers industriels. Grâce à l'utilisation de la luminométrie (voir la section 1.3) et d'analyses microbiologiques, il a été observé que les comptes bactériens aérobies diminuaient de 2 log CFU/625 cm² (passage de $7,7 \pm 1,4$ à $5,7 \pm 1,2$ log CFU/625 cm²) après le nettoyage, et de 1,5 log CFU/625 cm² (passage de $5,7 \pm 1,2$ à $4,2 \pm 1,6$ log CFU/625 cm²) après la désinfection (Luyckx et al., 2015a). Un nettoyage adéquat permet donc la réduction de la contamination microbienne et de la quantité de matière organique, mais assure également que la désinfection subséquente soit efficace et ciblée quant aux microorganismes encore présents. En effet, l'action des agents désinfectants usuels est limitée en présence d'une grande quantité de matière organique (Araujo et al., 2013). De plus, il existe un large éventail de types de souillure et de dépôts d'encrassement, requérant différents types de nettoyage, tel que représenté sur la figure 6. Pour la suite, le protocole de nettoyage plus spécifiquement décrit s'appliquera particulièrement aux équipements d'alimentation retrouvés dans les fermes (souillés principalement par le type 3 sur la figure ci-dessous).

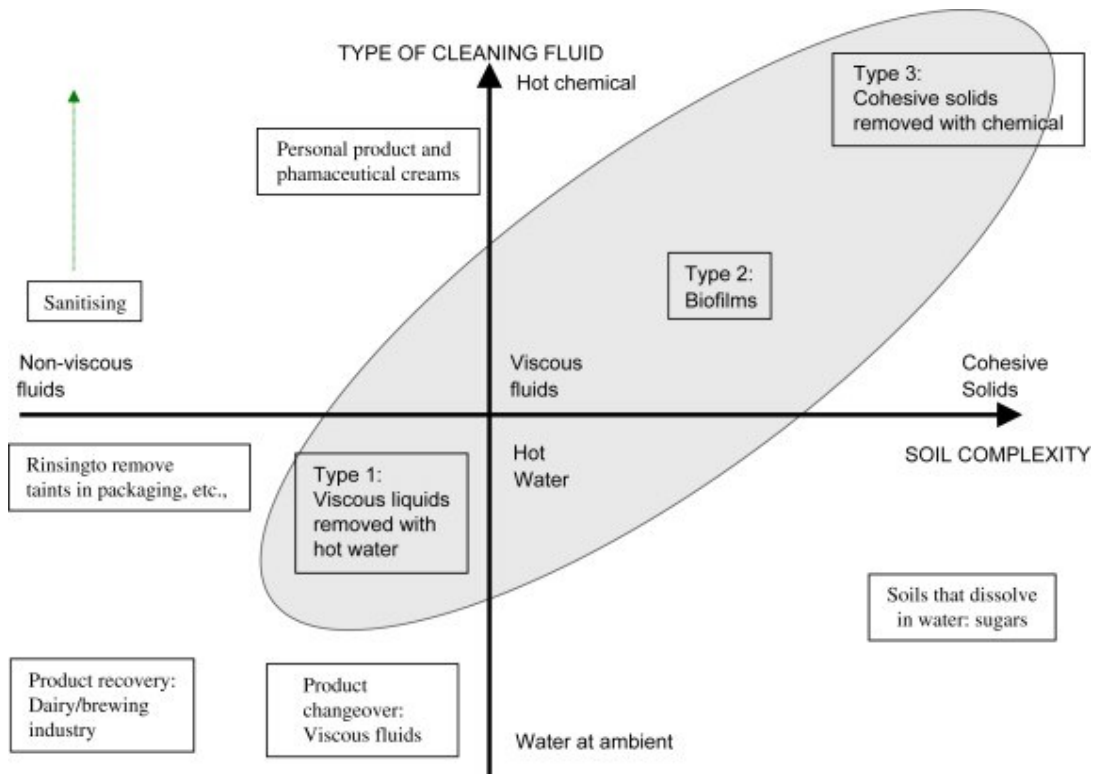


Figure 6. - Carte en 2 dimensions représentant différents types d'encrassement et les méthodes de nettoyage recommandées pour les éliminer (Fryer et Asteriadou, 2009).

1.2.3.1.1 Nettoyage à sec

Cette première étape consiste à retirer toute la litière encore présente, ainsi que toutes saletés visibles, comme le fumier, la poussière, les restes de nourriture, etc. La totalité de la surface de la ferme doit être nettoyée, ce qui inclut le sol, les plafonds, les murs, les rebords de fenêtre, et les surfaces de tout équipement présent. Les outils de nettoyage appropriés pour cette étape peuvent être des pelles, des racloirs, des balais, ou des brosses. Ni eau ni produit détergent n'est encore utilisé à ce stade (Dewulf et van Immerseel, 2018; Cramer, 2022). Dans le cadre des équipements spécifiques à l'alimentation des veaux, les résidus de lait ou de contamination organiques (ex : litière présente dans un seau) devraient être retirés par exemple à l'aide d'une raclette.

1.2.3.1.2 Trempage et nettoyage avec de l'eau et du produit nettoyant

Ensuite, il est recommandé de mouiller toutes les surfaces avec de l'eau et un produit nettoyant détergent, afin de mettre en solution et ramollir toute la matière organique encore présente (Dewulf et van Immerseel, 2018). Faire tremper les équipements au préalable dans de

l'eau à température ambiante et du détergent avant de les nettoyer est bénéfique puisque cela permet une diminution plus importante de la charge bactérienne que lorsqu'il n'y a pas de trempage, et cela permet aussi une réduction de la consommation d'eau et du temps de travail lors du nettoyage et du rinçage (Luyckx et al., 2015b). En effet, dans cette étude belge réalisée dans 12 parcs de poulaillers industriels répartis sur 5 fermes, des analyses microbiologiques ont permis de rapporter que pour les protocoles de nettoyage et désinfection incluant une étape de trempage, les comptes bactériens aérobies passaient de $7,6 \pm 1,7$ avant le nettoyage à $5,8 \pm 1,5$ après le nettoyage (en log CFU/625 cm²). Les protocoles sans trempage ont permis de rapporter des comptes bactériens (transformés en valeur logarithmique) passant de $7,3 \pm 2,0$ à $6,0 \pm 1,5$, ce qui représente une différence significative quant à la charge bactérienne lorsque le trempage est réalisé.

Aussi, il est recommandé d'utiliser des nettoyeurs alcalins chlorés ou une combinaison d'agents oxydatifs et d'acides, comme le peroxyde d'hydrogène ou l'acide peracétique, afin de briser les liaisons chimiques des résidus alimentaires comme le lait. Le produit choisi doit également être appliqué pour une durée minimale de cinq minutes, sans toutefois le laisser sécher, afin qu'il puisse agir sur la couche de matière organique la plus superficielle et l'infiltrer (Cramer, 2022). Il est aussi recommandé d'utiliser périodiquement un nettoyeur acide afin de permettre la dissolution de cristaux de calcium qui peuvent se former sur les équipements et les tâcher (Cleaning calf feeding equipment, 2008).

De plus, une action mécanique ou l'agitation est suggérée puisque cela représente le moyen le plus efficace pour éliminer le biofilm (qui sera abordé à la section 2.4.3), et cela permet aussi d'éliminer en grande partie les différentes couches de matière organique (Bricher, 2005). Cependant, l'action mécanique appliquée ne doit pas être excessive ou être réalisée avec des accessoires trop abrasifs pour ne pas endommager la surface des équipements, ce qui rendrait propice le développement de biofilms (Cramer, 2022).

Finalement, la température de l'eau devrait se situer entre 50 et 55°C pour dissoudre les graisses, mais sans dépasser 60°C pour prévenir la formation de dépôts de calcaire, ainsi que la « cuisson » et la fixation des dépôts alimentaires, ce qui rend l'élimination de biofilm plus ardue (Cramer, 2022). Toutefois, l'équipe de Luyckx et al. (2015b, déjà mentionnée plus haut) a constaté qu'il n'y a aucune différence significative pour la réduction des comptes bactériens aérobies et la

contamination à *Enterococcus* spp. entre les protocoles de nettoyage utilisant de l'eau froide ou chaude. En effet, pour le protocole utilisant de l'eau chaude, les comptes de bactéries aérobies passent (en log CFU/625 cm²) de 7,6 ± 1,7 avant le nettoyage à 5,8 ± 1,5 après celui-ci, et passent de 7,4 ± 1,8 avant le nettoyage à 6,0 ± 1,5 après un nettoyage à l'eau froide. Quant à la luminométrie, les valeurs d'ATP à la suite du nettoyage et de la désinfection étaient de 2,4 ± 1,0 et 2,5 ± 0,9 log RLU pour les protocoles utilisant de l'eau chaud et de l'eau froide, respectivement (Luyckx et al., 2015b). Malgré l'absence de différence sur la contamination in fine, l'utilisation d'eau chaude permet tout de même un meilleur confort de travail pour les personnes responsables du protocole de nettoyage et de désinfection, et permet aussi de réduire, de par sa rapidité d'action, la quantité d'eau utilisée (Luyckx et al., 2015a). Il est toutefois important de mentionner que dans un contexte d'équipements d'alimentation lactée, les protéines résiduelles sont présentes en très grandes quantités, ce qui fait de la température de l'eau un paramètre plus important que pour d'autres surfaces ou environnements où les résidus peuvent être de nature et de quantité différente de ceux rencontrés en production laitière.

1.2.3.1.3 Rinçage

Une fois que le trempage et le nettoyage ont permis de ramollir et déloger les premières couches de matière organique, le rinçage (qui peut notamment se réaliser à haute pression) permet d'éliminer le reste des débris organiques et le détergent, afin de ne pas interférer avec l'action du désinfectant. La pression recommandée se situe entre 50 et 120 atm et la température de l'eau ne doit pas non plus excéder 60°C (Dewulf et van Immerseel, 2018). Dans le cas spécifique des équipements servant à l'alimentation lactée des génisses, le rinçage est généralement pratiqué plus simplement en utilisant le débit de robinetterie standard.

1.2.3.1.4 Séchage

Cette étape consiste à laisser sécher toutes les surfaces et équipements à l'air libre pour s'assurer qu'il n'y ait plus d'eau, qui pourrait alors diluer la concentration du désinfectant ensuite appliqué (Dewulf et van Immerseel, 2018). Les équipements d'alimentation peuvent par exemple être mis à l'envers sur un séchoir pour sécher adéquatement (Calf barn and equipment cleaning, 2020).

Les grands principes décrits ici sont applicables à différents équipements ou bâtiments d'élevage, avec certaines spécificités toutefois. D'un point de vue pratique, concernant notamment les équipements d'alimentation lactée en période de pré-sevrage, ces différentes étapes peuvent se réaliser de façon différente selon les fermes et le nombre d'équipements à nettoyer. En pratique, le nettoyage manuel ou automatique peut être effectué. Par exemple, l'utilisation d'un lave-vaisselle est un compromis intéressant qui permet d'obtenir de bons résultats de façon systématique (Gull, 2022).

1.2.3.1.5 Désinfection

Alors que les étapes précédentes visent à éliminer la matière organique et réduire la charge microbienne, la désinfection a pour rôle d'éliminer la majorité des microorganismes encore présents. Puisque l'efficacité du désinfectant est réduite par la présence de matière organique, il est important que les étapes précédentes n'aient pas été négligées. Aussi, parmi différents types de désinfectants qui existent aujourd'hui sur le marché, le désinfectant en mousse a l'avantage d'être plus pénétrant, notamment pour les surfaces poreuses, d'offrir un temps de contact plus important et d'être visible lorsqu'appliqué afin de n'oublier aucune surface. De plus, le désinfectant doit être en contact avec la surface suffisamment longtemps pour tuer les bactéries présentes. Le temps de contact peut varier selon le désinfectant et les bactéries ciblées, mais une période de 20 à 30 minutes est généralement suffisante pour que celui-ci puisse agir efficacement (Dewulf et van Immerseel, 2018, Cramer, 2022).

Les désinfectants les plus couramment utilisés sont le formaldéhyde, les dérivés chlorés, les ammoniums quaternaires, l'acide peracétique, le glutaraldéhyde, ou encore le peroxyde d'hydrogène (Maertens et al., 2018). En milieu contaminé, il est conseillé d'utiliser deux désinfectants en combinaison ou de désinfecter en deux étapes pour obtenir de meilleurs résultats, comme l'a démontré Maertens et al. Cette étude, menée dans des poulaillers industriels, a permis de fournir des scores d'hygiénogramme, qui reflètent le statut hygiénique et la bonne exécution du nettoyage et désinfection (plus le score est bas, meilleure est l'hygiène). Le score lorsqu'un seul désinfectant est utilisé est de 0,834 (déviation standard ou écart-type (SD) : 0,543), alors qu'il est de 0,683 (SD : 0,502) lorsqu'au moins deux désinfectants sont utilisés de manière séquentielle. Par exemple, lorsqu'un désinfectant chloré est utilisé, un score de 0,984 (SD : 0,555) est obtenu, tandis que la combinaison d'ammonium quaternaire, de glutaraldéhyde et de formaldéhyde permet

d'avoir un score de 0,653 (SD : 0,509). D'autres facteurs peuvent influencer l'efficacité des désinfectants (la concentration, la température, la présence de matière organique, des résidus de produits nettoyants, etc.) et peuvent donc avoir un effet sur le score d'hygiénogramme (Maertens et al., 2018). Dans le cas spécifique des équipements destinés à l'alimentation des veaux, il est fondamental d'utiliser des désinfectants qui ne soient pas délétères lorsque l'équipement sera à nouveau utilisé pour nourrir ces derniers. L'utilisation d'une solution chlorée (type eau de javel) est communément conseillée (Calf barn and equipment cleaning, 2020). Aussi, d'un point de vue pratique et réaliste, et dans un contexte d'équipements utilisés pour faire boire quotidiennement les génisses, la désinfection peut être réalisée moins systématiquement si le nettoyage est fait adéquatement, et s'il n'y a pas d'épisodes de morbidité rapportés. Il est également important de contrôler l'usure des équipements puisque certains désinfectants peuvent interagir avec la surface, l'user prématurément et créer ainsi des porosités pouvant altérer l'efficacité de la désinfection.

1.2.3.1.6 Séchage

Suite à la désinfection, une autre étape de séchage à l'air libre est nécessaire afin qu'aucune surface ou équipement ne reste humide, et pour empêcher que les animaux n'ingèrent des résidus de désinfectant. Il est toutefois nécessaire de rincer les équipements permettant de boire suite à la désinfection, tels les biberons, seaux, tubes à gaver, etc. (Dewulf et van Immerseel, 2018).

1.2.3.1.7 Test d'efficacité

Vérifier l'efficacité du protocole de nettoyage et de désinfection est une étape primordiale et à part entière dans le protocole. Plusieurs techniques existent aujourd'hui, dont les analyses microbiologiques, l'inspection visuelle, ou encore la luminométrie (Dewulf et van Immerseel, 2018, Cramer, 2022). Ces techniques, appliquées aux équipements d'alimentation des veaux en phase de présevrage, seront couvertes aux sections 2.5 et 3. de cette revue. De plus, il faut mentionner que les connaissances actuelles en ce qui concerne le nettoyage et les techniques d'inspection viennent principalement des études de nettoyage des bâtiments ou des équipements de traite, mais peu encore du domaine laitier. Ainsi, la fréquence optimale d'application de la désinfection suite aux différentes étapes de nettoyage reste présentement à déterminer.



Figure 7. - Étapes recommandées pour le nettoyage adéquat des équipements d'alimentation (Van Driessche et al., 2023)

1.2.4 Les paramètres et les agents contaminants du matériel et de l'alimentation

Au sein d'une ferme, malgré la mise en place de mesures de biosécurité expliquées dans les sections précédentes, les sources de contamination qui peuvent nuire à la propreté du matériel d'alimentation sont multiples, d'autant plus si le nettoyage et la désinfection ne sont réalisés adéquatement. Les sections suivantes serviront donc à résumer de manière non-exhaustive les types de contaminants les plus souvent impliqués lorsque les normes d'hygiène ne sont pas rencontrées.

1.2.4.1 Les bactéries

Bien que la plupart des bactéries soient inoffensives ou même bénéfiques aux fonctionnements physiologique et métabolique des mammifères, d'autres sont pathogènes et peuvent être à l'origine de différentes maladies lorsqu'elles sont en milieu propice. Il est donc important de connaître les caractéristiques qui favorisent leur croissance afin de contrôler au mieux leur présence, leur prolifération et leur élimination (Cramer, 2022).

En production laitière, les bactéries pathogènes pouvant nuire à la santé des veaux qui sont le plus souvent retrouvées dans l'environnement sont *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* O157:H7, *Campylobacter jejuni*, *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*, *Bacillus cereus* et *Clostridium perfringens* (McAuley et al., 2014; Toth et al., 2013).

Outre leur pathogénicité, les bactéries peuvent être classées selon plusieurs critères en différents groupes. Elles peuvent être classées selon leur forme : forme sphérique (coque), forme de bâtonnet (bacille), et forme de spirale ou d'hélice (spirochète). Elles peuvent également être classées selon leur besoin en oxygène (aérobie pour celles nécessitant de l'oxygène ou anaérobie pour les autres), et selon la couleur que prennent les colonies après une coloration chimique de Gram (Gram positif ou Gram négatif), en lien avec la composition de leur paroi (Baron, 1996). De plus, certaines bactéries, appelées coliformes, sont regroupées selon leur utilité microbiologique. En effet, ces bactéries sont présentes naturellement dans le tractus gastro-intestinal des animaux et des humains (coliformes fécaux), et dans l'environnement (végétaux, sol et eau). Elles sont anaérobies facultatives, Gram négatives, non-sporulantes, appartiennent à la famille des *Enterobacteriaceae*, et les 5 espèces principales qui composent ce groupe sont *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, et *Citrobacter freundii*. Les bactéries coliformes sont utilisées comme des organismes « indicateurs », notamment pour la contamination fécale de l'eau, du lait et de l'alimentation. Effectivement, puisque la concentration d'agents pathogènes est plus faible et moins facile à identifier que les bactéries coliformes, il est plus pratique de détecter et quantifier les coliformes lors d'analyses bactériologiques (Dewulf et van Immerseel, 2018). Leur présence indique de manière indirecte la présence d'autres bactéries pathogènes, puisque de nombreux pathogènes et les coliformes proviennent des mêmes sources (Halkman et Halkman, 2014). Tel qu'indiqué plus tôt dans cette revue, les seuils généralement utilisés pour quantifier une contamination bactérienne significative pour le lait et le colostrum sont > 100 000 CFU/mL pour les bactéries aérobies totales (TBC : Total Bacterial Count) et > 10 000 CFU/mL pour les coliformes totaux (TCC : Total Coliform Count) (McGuirk et Collins, 2004). Ces seuils restent cependant des seuils empiriques ou références dont la valeur n'a pas été validée scientifiquement. On ne sait pas si ces seuils sont également applicables à la détermination de la contamination des surfaces ayant été au contact du lait ou de colostrum.

Indépendamment de la nomenclature et des particularités de chaque groupe, toutes les bactéries ont des besoins primaires plus ou moins semblables, nécessaires à leur croissance et leur survie dans un milieu. D'abord, l'eau est indispensable à la survie des bactéries, particulièrement l'eau libre, qui se traduit par le paramètre a_w (« water activity ») et qui quantifie la biodisponibilité de l'eau dans un aliment. Connaître le a_w d'un aliment fournit donc une indication quant au potentiel de croissance des bactéries (Cramer, 2022). Les valeurs sont comprises entre 0 et 1, et plus elles sont élevées, plus la teneur en eau est importante (1 = eau pure). Par exemple, le lait et les poudres de lait ont respectivement un a_w de 0,99 et de 0,70, ce qui en font d'excellents substrats pour la croissance bactérienne (Wei et al., 2020; Rüeegg, 1985; Dairy processing Handbook, 2015). La plupart des bactéries ont besoin d'une température entre 4 et 60°C pour vivre (bactéries mésophiles), bien que certaines préfèrent les températures plus élevées (bactéries thermophiles) ou moins élevées (bactéries cryophiles). Il est donc important de maintenir la nourriture et l'alimentation lactée à des températures qui accéléreront le moins possible la croissance bactérienne, tout en ciblant des températures de distribution proches des températures du lait dont se nourrit en temps normal un veau (i.e. température du pis de la mère qui est aux alentours de 38°C). L'oxygène est également nécessaire pour certaines bactéries, nommées aérobies (dont nombreuses sont pathogènes, comme *Listeria*) pour le processus énergétique qu'est la respiration cellulaire. Le pH joue aussi un rôle, et doit être neutre (entre 7,2 et 7,6) pour permettre le développement de bactéries. Finalement, les bactéries ont besoin de nutriments, principalement une source de carbone, qui peut être obtenue de la matière organique retrouvée dans l'environnement (Kumar, 2015; Cramer, 2022). Ces nutriments sont bien sûr disponibles en grande quantité dans les résidus de lait ou de colostrum (Marchand et al., 2012).

Bien que chaque genre bactérien ait des exigences de croissance spécifiques, les bactéries sont très fréquemment détectées au sein des fermes laitières. Par exemple, une étude américaine réalisée dans 13 fermes laitières a analysé par PCR un total de 120 échantillons (provenant de matière fécale, eau, litière, lait, etc.) et a déterminé que 12 des 13 fermes étaient positives pour au moins une bactérie pathogène, alors que 5 fermes étaient positives pour 3 pathogènes (Toth et al., 2013). De plus, une étude australienne réalisée dans 7 fermes laitières (3 bovines, 3 caprines et 1 ovine) abonde dans le même sens. Des 120 échantillons (prélevés également au niveau de la matière fécale, du lait, du sol, de l'eau, etc.), *Bacillus cereus* et *Clostridium perfringens*, les 2 bactéries prévalentes, ont été détectées dans 41% et 38% des échantillons, respectivement. *Staphylococcus*

aureus a été détecté dans le lait et les filtres à lait de 6 des 7 fermes (McAuley et al., 2014). Également, l'équipe de Renaud et al. (2017) s'est intéressée à la contamination des équipements en élevage laitier et à sa détection en utilisant la luminométrie. Les équipements étaient rincés avec de l'eau saline stérile puis des écouvillons plongés dans l'eau de rinçage servaient à la détection d'ATP. Ainsi, il a été rapporté que 59% des échantillons avaient un compte de bactéries totales > 100 000 CFU/mL et que 21% avaient un compte de coliformes totaux > 10 000 CFU/mL. Les bactéries représentent donc un type de contamination important au sein des fermes laitières, et plus particulièrement au niveau de l'alimentation et des équipements d'alimentation qui sont utilisés pour les veaux.

1.2.4.2 Matière organique résiduelle et biofilm

La présence de matière organique, comme du fumier, du lait ou des résidus alimentaires, sur les surfaces des équipements représente une source de nutriments pour les microorganismes. Son accumulation témoigne de l'échec du protocole de nettoyage et désinfection et permet de créer un environnement auquel les bactéries peuvent adhérer (Cramer, 2022; Dewulf et van Immerseel, 2018). C'est ce qu'a démontré Ruano et al. (2001) lors d'une étude sur l'efficacité de plusieurs désinfectants utilisés à différentes concentrations en production avicole. En absence de matière organique et selon les recommandations du fabricant pour le temps de contact (i.e. 10 minutes), 10 des 16 désinfectants ont été efficaces et ont inhibé la croissance des 5 souches bactériennes testées. Cependant, en présence de matière organique, seulement 2 désinfectants sur 16 ont inhibé la croissance bactérienne et ont nécessité des temps de contact ou des concentrations plus importants pour être efficaces. Il est donc recommandé (tel que décrit à la section 2.3.1) de retirer la matière organique de la surface des équipements pour éliminer les nutriments utilisables par les bactéries et ainsi limiter leur prolifération (Ruano et al., 2001; Gehan et al., 2009).

Lorsque les bactéries présentes sur une surface ont suffisamment de nutriments, que les conditions de l'environnement leur conviennent et que le nettoyage est insuffisant, elles se multiplient et peuvent alors éventuellement former un biofilm. Un biofilm est défini comme étant un amas structuré de bactéries qui adhèrent entre elles et aux surfaces, et qui sont recouvertes d'une matrice polymérique qu'elles sécrètent et qui les protège (Tremblay et al., 2014; Molitz et al., 2005). La formation commence par l'adhésion de quelques bactéries, qui forment alors une couche mince, résistante et invisible (figure 8). Puis, au fur et à mesure, les bactéries se multiplient et

s'attachent de manière irréversible. Elles piègent des débris, des nutriments et d'autres cellules et bactéries, permettant au biofilm de s'étendre et forment alors des microcolonies. Ensuite, lors de la maturation, les bactéries vont sécréter un polysaccharide extracellulaire qui permet l'adhésion des bactéries dans le biofilm et leur protection contre les nettoyants et désinfectants. Le biofilm alors mature, qui se nourrit grâce à la matière organique qui circule autour de lui, est une structure complexe et irréversible qui nécessitera un protocole de nettoyage plus agressif pour être retiré. La dernière étape consiste au détachement des bactéries, qui pourront se disperser et adhérer à d'autres surfaces pour former de nouveaux biofilms, voire être ingérées par le veau si elles sont retrouvées sur les équipements d'alimentation (Cramer, 2022; Tremblay et al., 2014; Kaplan, 2010).

Tel que mentionné plus haut, les bactéries qui composent un biofilm sont moins sensibles aux antibiotiques et agents antimicrobiens : leur conformation dans le biofilm leur permet d'être de 100 à 1000 fois plus résistantes. C'est ce qui a été démontré dans une étude grâce à l'utilisation d'un outil permettant de produire des biofilms *in vitro* faisant appel à des plaques de 96 puits et de déterminer leur sensibilité à différents antibiotiques vétérinaires (Olson et al., 2002). Ainsi, la majorité des antibiotiques testés étaient efficaces pour inhiber la croissance des bactéries planctoniques (i.e. libres, isolées), tandis que peu l'étaient pour inhiber la croissance des bactéries dans les biofilms. Par exemple, pour *Staphylococcus aureus*, à la concentration minimale de pénicilline G utilisée pour inhiber les bactéries planctoniques, < 2 CFU/mL ont été détectées. Toutefois, à la concentration minimale permettant l'éradication d'un biofilm (déterminée par Harrison et al., 2010), > 1024 CFU/puits étaient dénombrées. Cela signifie donc que les concentrations d'antimicrobiens nécessaires pour tuer les bactéries présentes dans les biofilms doivent être largement plus élevées, puisque les bactéries sont plus résistantes (Olson et al., 2002). Le même phénomène a été observé avec les désinfectants : les bactéries dans les biofilms, et particulièrement *Listeria monocytogenes*, sont plus résistantes aux agents désinfectants que lorsqu'elles sont sous forme planctoniques (Fatemi et al., 1999; Frank et Koffi, 1990; Norwood et Gilmour, 2000; Moltz et Martin, 2005). Les bactéries souvent retrouvées dans les biofilms sont *Enterococcus spp.*, *Pseudomonas fragi*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7, ou encore *Salmonella* (Cramer, 2022). Les biofilms constituent ainsi une menace importante et qui est reconnue en production laitière (Friedlander et al., 2019). Il est donc important de limiter leur formation par la mise en place de procédures de nettoyage et désinfection adaptées.

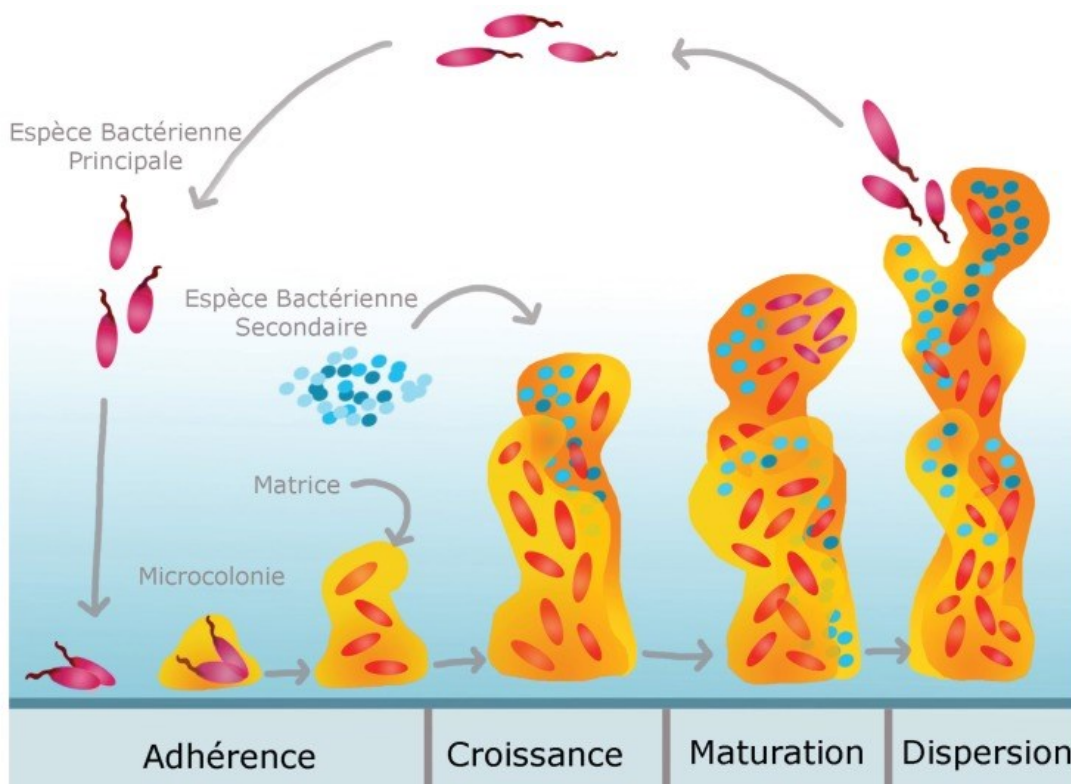


Figure 8. - Les étapes de formation d'un biofilm bactérien (Tremblay et al., 2014)

1.2.4.3 Méthodes de nettoyage insuffisantes ou inefficaces

1.2.4.3.1 Fréquence de nettoyage

Un des paramètres pouvant être un facteur de risque pour la contamination des équipements est le nettoyage avec une fréquence insuffisante par rapport à l'usage qui en est fait. Ainsi, une étude britannique réalisée dans 56 fermes s'est intéressée aux différentes façons de faire en termes de nettoyage. Des 328 échantillons de colostrum collectés, il a été démontré que le fait de nettoyer les équipements moins fréquemment qu'après chaque utilisation était associé à une augmentation du TBC, ce qui représente un risque pour l'ingestion de pathogènes et un défaut du TIP (Hyde et al., 2020). Il est d'ailleurs recommandé que le nettoyage des équipements devrait être effectué après chaque utilisation, tel que décrit plus tôt (Dewulf et van Immerseel, 2018; Maunsell et Donovan, 2008). Toutefois, malgré ces recommandations, la littérature révèle que la fréquence du nettoyage est très variable d'une ferme ou d'une région à l'autre. Par exemple, dans une étude autrichienne réalisée dans 100 fermes, 97% de celles-ci ont reporté nettoyer les seaux après chaque utilisation (Klein-Jöbstl et al., 2014), alors que dans une étude réalisée en Allemagne dans 11 fermes,

seulement 36% affirmaient le faire après chaque utilisation (Heinemann et al., 2021). Pour l'instant, les données spécifiques sont manquantes concernant les fermes laitières québécoises.

1.2.4.3.2 Absence de détergents pour le nettoyage ou la désinfection

Le nettoyage peut également être inapproprié si aucun détergent n'est utilisé. En effet, l'utilisation de détergents permet bien évidemment d'augmenter la propreté des équipements, mais représente aussi une mesure de protection pour réduire la prévalence de pathogènes et de parasites, dont *C. parvum*, comme il l'a été mentionné dans une étude ontarienne réalisée sur 1089 veaux issus de 119 fermes (Trotz-Williams et al., 2008). De surcroît, dans l'étude britannique de Hyde et al. (2020) mentionnée plus haut, l'utilisation de détergents s'est avérée efficace pour réduire les comptes aérobiques totaux des équipements (diminution de 2,04 log CFU/mL, IC95% : -3,49 à -0,56 pour l'acide peracétique et diminution de 1,60 log CFU/mL, IC95% : -3,01 à 0,27 pour l'hypochlorite).

1.2.4.3.3 Température de l'eau inadéquate

La température de l'eau utilisée pour nettoyer les équipements peut également jouer un rôle sur leur propreté après nettoyage. Il a été rapporté que l'utilisation d'eau chaude (entre 50 et 60°C au maximum) plutôt que froide pour le nettoyage est associée à une diminution significative du comptage aérobique total (diminution de 2,54 log CFU/mL, IC95% : -3,76 à -1,74) (Hyde et al., 2020). Cependant, lors de cette même étude, pour seulement un tiers des échantillons de colostrum récoltés, de l'eau chaude avait été utilisée pour nettoyer les équipements. Dans l'étude allemande citée plus haut, ce n'est qu'une ferme sur les 11 recrutées (9%) pour le projet qui utilisait de l'eau chaude (Heinemann et al., 2021). Les protocoles de nettoyage sont donc peu uniformes entre les fermes et de simples modifications telles que la température de l'eau permettrait une amélioration de la propreté des équipements. Toutefois, comme mentionné plus haut, la température de l'eau ne doit pas non plus être trop chaude pour ne pas cuire les résidus protéiques (issus de l'alimentation lactée) présents en grande quantité.

1.2.4.3.4 Tétines non-dévisées

Finalement, un autre paramètre pouvant être un facteur de risque pour la contamination du matériel est le fait de ne pas dévisser les tétines des seaux ou des biberons pour les nettoyer. En

effet, cette pratique importante (Renaud et al., 2017) n'est que rarement réalisée puisqu'elle est souvent rapportée comme étant trop longue à effectuer lors du nettoyage (Gosling, 2018). Cependant, il a été rapporté que le dévissage permet de réduire la quantité d'ATP présent sur les surfaces internes des tétines et de diminuer la contamination fécale (évaluée par le TBC) de ces dernières (Heinemann et al., 2021).

1.2.4.4 Entreposage du colostrum et du lait après la traite

Outre les pratiques de nettoyage inadaptées, l'entreposage et le stockage du lait et du colostrum sont également des points critiques à surveiller quant à la pression infectieuse qu'ils peuvent engendrer. Une étude américaine, réalisée dans une ferme de 400 vaches parmi lesquelles des échantillons de lait et de colostrum ont été récoltés sur 39 d'entre elles, s'est intéressée aux différentes pratiques d'entreposage associées à la contamination du lait et des équipements (Stewart et al., 2005). Cela a permis de démontrer que les échantillons pour lesquels la croissance bactérienne était la plus rapide étaient ceux stockés à température ambiante, suivis de ceux stockés à température ambiante avec des conservateurs (sorbate de potassium) et finalement ceux qui étaient réfrigérés. La technique la plus efficace pour limiter la contamination était la réfrigération combinée à l'utilisation de conservateurs, qui a permis une diminution du TBC et du TCC et le maintien de ces taux pendant 96 heures. Afin de limiter la contamination des équipements, il est donc recommandé de réfrigérer le lait dès que possible, s'il n'est pas distribué rapidement (Stewart et al., 2005).

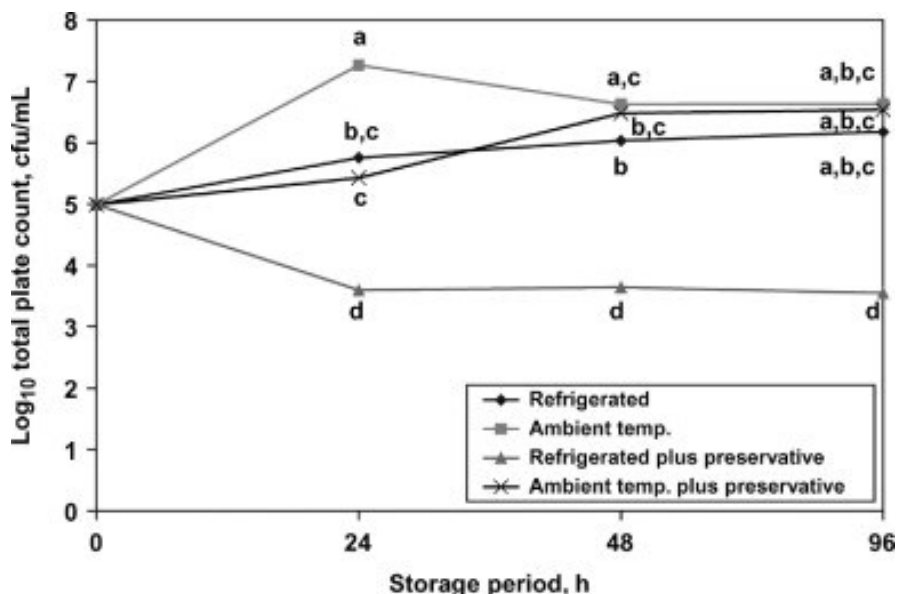


Figure 9. - Effet de la méthode de stockage dans le temps sur le compte bactérien en log10 dans le colostrum bovin frais. Les différents indices (a, b, c, d) diffèrent pour une période de stockage donnée, $P < 0,05$ (Stewart et al., 2005).

En résumé, les facteurs de risque pour la contamination du matériel d'alimentation sont très nombreux à la ferme et il est donc important d'avoir des outils afin d'évaluer efficacement l'hygiène des équipements.

1.2.5 Les méthodes pour évaluer la propreté des équipements

Actuellement, les techniques standards qui servent à évaluer l'hygiène des équipements à la ferme sont l'évaluation visuelle de ces derniers, et les analyses microbiologiques pour lesquelles des prélèvements sont récoltés et envoyés en laboratoire. Parmi les autres techniques disponibles, la luminométrie qui fait l'objet de notre étude sera développée spécifiquement dans la section 1.3 de la revue de littérature.

1.2.5.1 Évaluation visuelle

Cette méthode, qui est la plus répandue et qui consiste simplement à évaluer la propreté des équipements à l'œil nu, a l'avantage d'être rapide, facile, de ne nécessiter aucun équipement et d'être fiable lorsque le matériel est sale (Renaud et al., 2017). Toutefois, quand le matériel d'alimentation a l'air macroscopiquement propre, l'inspection visuelle seule ne permet pas d'exclure la présence de contamination microbiologique, tel que démontré dans les fermes laitières ontariennes (Renaud et al., 2017). En effet, dans le milieu hospitalier aussi bien que dans les fermes, cette méthode est généralement un faible indicateur de propreté, principalement par manque de sensibilité pour détecter la contamination microbiologique des surfaces (Renaud et al., 2017; Cooper et al., 2007). Elle reste tout de même pertinente de par l'impact visuel qu'elle peut offrir aux utilisateurs et peut être utile lorsqu'utilisée en combinaison avec d'autres approches pour un protocole d'évaluation de la propreté (Griffith et al., 2000).

1.2.5.2 Analyses bactériologiques

L'analyse bactériologique est une technique plus objective et plus fiable que l'inspection visuelle, et elle est d'ailleurs considérée en général comme le test de référence (« gold standard ») pour détecter la contamination sur plusieurs types de surfaces (Lindell et al., 2018; Renaud et al.,

2017). De plus, l'écouvillonnage des équipements avec cette méthode permet non seulement l'identification des bactéries mais aussi leur quantification, grâce entre autres au TBC et au TCC (Malik, 2003; Willis et al., 2007). Néanmoins, puisque la croissance bactérienne est au cœur de cette méthode, les résultats ne peuvent être obtenus instantanément, ce qui limite son utilisation pratique à la ferme.

1.2.5.3 Autres méthodes

D'autres méthodes qui dépassent le cadre de cette revue existent également (figure 8). Citons entre autres le gel de marquage fluorescent ou la détection de *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (Sherlock et al., 2009; Mitchell et al., 2013; Holah et al., 2016), ou même le recours à des approches moléculaires pour détecter voire quantifier la contamination par les bactéries.

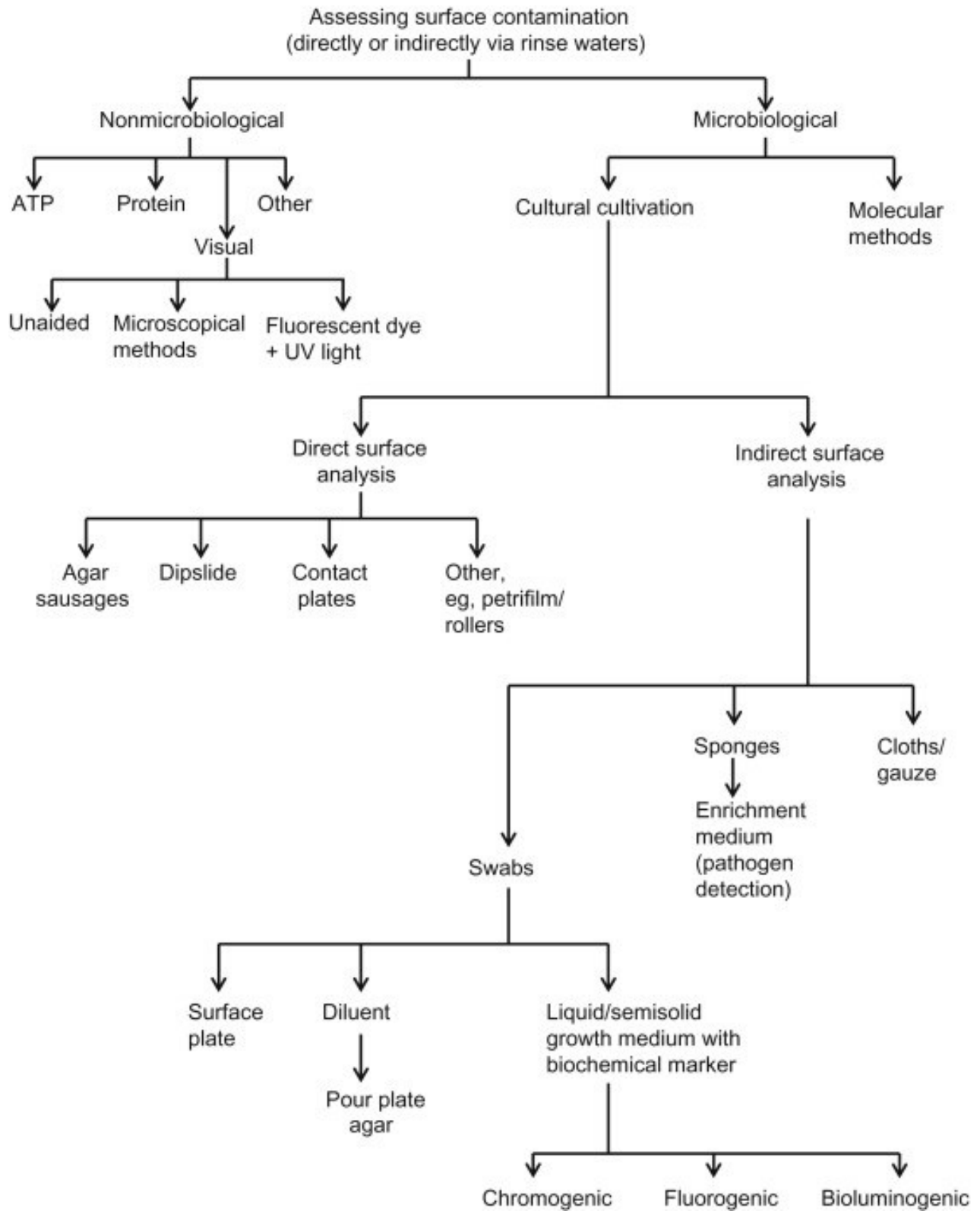


Figure 10. - Les techniques microbiologiques et non-microbiologiques permettant d'évaluer l'efficacité du nettoyage et de la désinfection des surfaces (Holah et al., 2016).

1.3 Luminométrie

La détection d'adénosine triphosphate (ATP) grâce à la luminométrie est un outil alternatif aux méthodes énumérées ci-dessus et est intéressant pour une utilisation à la ferme pour la quantification de la contamination bactérienne sur différentes surfaces (Mildenhall et Rankin, 2020). Cette méthode est largement utilisée dans les industries agroalimentaires et de la santé, et son utilisation se développe dans le domaine de l'agriculture, notamment pour les productions animales (Shama et Malik, 2013; Mildenhall et Rankin, 2020).

1.3.1 Définition

La luminométrie est une technique permettant de mesurer la luminescence, qui correspond à une émission de lumière par une substance à la suite d'une réaction chimique (chimioluminescence) ou enzymatique (bioluminescence). L'outil qui mesure la lumière émise s'appelle un luminomètre, et permet la détection de très faibles quantités de lumière (Hastings, 2012).

1.3.2 Fonctionnement physico-chimique

La luminométrie permet de quantifier la bioluminescence produite en présence d'ATP, sur une surface ou dans un liquide. L'ATP est une molécule clé qui emmagasine l'énergie au sein des cellules, et est donc retrouvée chez toutes les cellules eucaryotes et procaryotes vivantes (animale, végétale, microbienne). La détection d'ATP témoigne donc de la présence de matière organique, incluant les bactéries. La quantification de l'ATP se produit grâce à la présence d'un substrat (la luciférine), d'une enzyme (la luciférase) et d'un réactif lysant, tous présents dans l'écouvillon servant à échantillonner la surface souhaitée. Ainsi, le réactif permet de libérer l'ATP des cellules vivantes. L'ATP libre permet ensuite à la luciférase (qui est ATP-dépendante) d'oxyder son substrat, la luciférine, en oxyluciférine, ce qui provoque alors une émission de lumière (figure 9) (Turner et al., 2010; Braissant et al., 2020; Dewulf et van Immerseel, 2018). Le luminomètre détecte et mesure donc l'intensité lumineuse, qui est émise de manière directement proportionnelle à la quantité d'ATP. Le résultat est rapporté en « relative light units » (RLU), quelques secondes après la réaction (Shama et Malik, 2013).

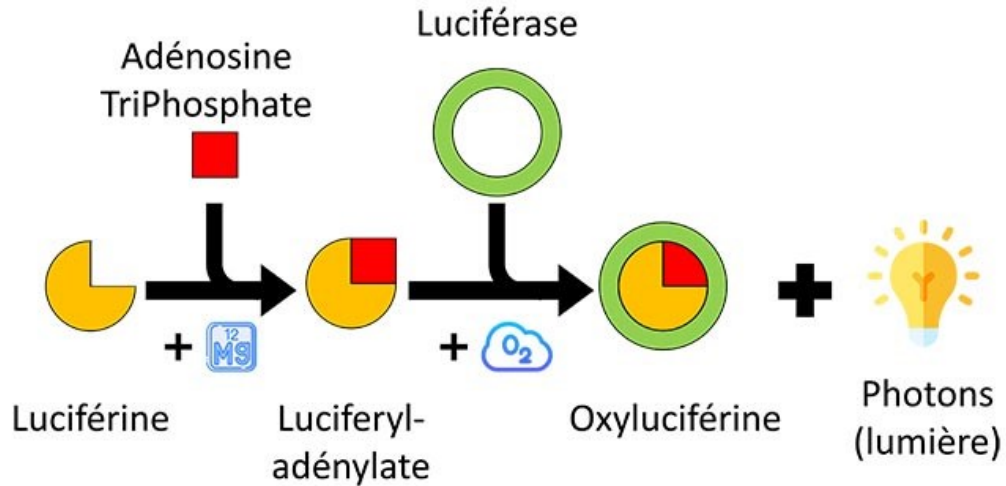


Figure 11. - Réaction enzymatique entre la luciférine et la luciférase à l'origine de l'émission de lumière (Bendouma et al., 2022).

1.3.3 Utilisation

Échantillonner une surface grâce à la luminométrie est une technique facilement réalisable, qui nécessite peu de temps et qui se fait entièrement grâce à un seul appareil portable, le luminomètre (Meighan, 2011). Tel que présenté sur la figure ci-dessous, il faut d'abord sélectionner une surface de 100 cm² et l'échantillonner en faisant des stries parallèles et perpendiculaires entre elles grâce à un écouvillon, en permettant une rotation de celui-ci. Il est ensuite remis dans son tube, et le bulbe supérieur est cassé afin de libérer la solution de luciférase/luciférine. Après avoir agité l'écouvillon, il suffit de le placer dans le luminomètre pour que la lecture se fasse en quelques secondes (Hygièna, 2023).

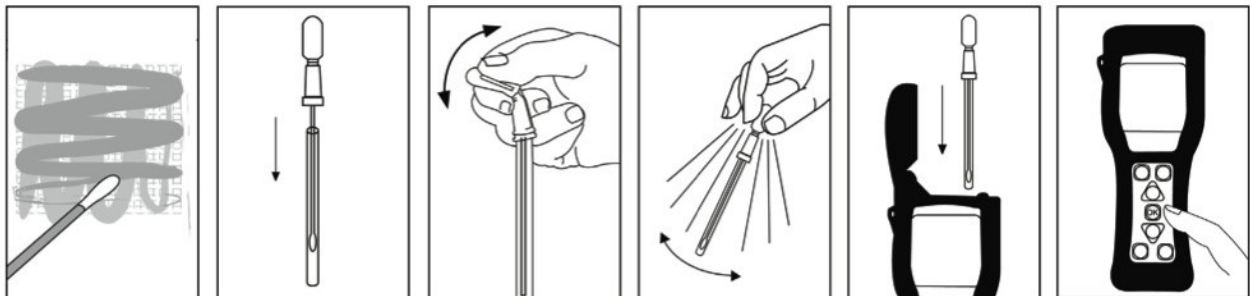


Figure 12. - Étapes à suivre lors de l'échantillonnage d'une surface pour la détection par luminométrie (Hygièna, 2023)

1.3.3.1 Types de surfaces échantillonnées

Aujourd'hui, la luminométrie est utilisée dans de nombreux domaines, et les techniques et standards de prélèvement sont bien établis, principalement pour l'écouvillonnage direct de surfaces planes. Effectivement, la méthodologie (présentée ci-dessus) est déjà bien décrite et les manufacturiers mettent à disposition différents types de supports audio-visuels pour guider les utilisateurs (Osimani et al., 2014; Hygiëna, 2023; Omidbakhsh et al., 2014). Ainsi, il est fréquent que cette technique soit utilisée pour déterminer le statut sanitaire des outils et surfaces de découpe dans les abattoirs, des remorques de transport pour le bétail, ou encore des surfaces fréquemment contaminées dans les hôpitaux (Cabahug et al., 2016; Willis et al., 2007; Oshita et al., 2011).

La luminométrie peut également être utilisée pour les surfaces non-planes, qui sont fréquemment retrouvées entre autres dans l'industrie laitière et pour les équipements d'alimentation, comme les télines, les tubulures, les biberons, etc. Toutefois, contrairement aux surfaces planes, il n'existe pas encore de méthodologie et de technique standardisée permettant d'échantillonner ces surfaces de formes irrégulières. Comme il le sera décrit à la section 3.5, les méthodes doivent donc être adaptées à la variété et à la diversité des équipements retrouvés dans les fermes (Buczinski et al., 2022).

Il est aussi possible d'évaluer la contamination d'échantillons liquides afin de déterminer les niveaux d'ATP dans l'eau ou dans des liquides de rinçage. Dans ce cas de figure, l'écouvillon n'est pas frotté sur une surface, mais plutôt plongé directement dans la solution à analyser. Cela est entre autres utilisé pour les systèmes de traitement de l'eau et la surveillance de la biomasse dans les tours de refroidissement de l'eau (Hygiëna, 2023). Dans le domaine laitier, Renaud et al. (2017) s'est servi de cette technique pour évaluer la contamination de différents équipements servant à administrer du colostrum aux veaux. En effet, 15 mL de solution saline stérile étaient d'abord introduit dans les différents types d'équipements, puis ce liquide de rinçage était récupéré dans un tube stérile et analysé directement avec l'écouvillon approprié.

1.3.3.2 Types d'écouvillons

Selon les compagnies, la surface échantillonnée et le type de bactéries à mettre en évidence orienteront le choix des différents types d'écouvillons existant aujourd'hui sur le marché pour évaluer la présence d'ATP. D'abord, il existe un écouvillon standard permettant de détecter l'ATP

présent sur une surface solide (i.e. technique directe d'écouvillonnage). Il est donc polyvalent et pratique à utiliser pour les équipements standards d'alimentation à la ferme (« UltraSnap » pour le luminomètre de la marque Hygiena). Ensuite, il existe aussi des écouvillons spécialement conçus pour détecter l'ATP présent dans les échantillons liquides (i.e. technique indirecte d'écouvillonnage). Comme décrit précédemment, ils sont pratiques à utiliser en présence d'équipements qui ne sont pas entièrement accessibles avec un écouvillon standard ou qui sont exigus (comme un biberon avec un goulot étroit par exemple) et qui nécessitent donc d'être analysés via un liquide de rinçage (« AquaSnap »). Finalement, il existe des écouvillons qui détectent des types spécifiques de bactéries tels qu'*E. coli*, des coliformes ou des *Enterobacteriaceae* plus globalement (« MicroSnap »). Toutefois, ils requièrent une étape supplémentaire d'incubation de plusieurs heures afin de permettre la croissance du type bactérien en question et de détecter l'ATP liés à ces bactéries. Cela représente donc une limite à l'utilisation de ce type d'écouvillon puisque la lecture n'est pas immédiate.

1.3.3.3 Types de luminomètres

Plusieurs fabricants ont mis en marché des luminomètres plus ou moins semblables permettant la lecture d'écouvillons. Il existe principalement le luminomètre Kikkoman de la marque Luminultra Technologies, le Clean-Trace NG de la marque 3M, le Charm novaLUM de la marque Charm Sciences et finalement le EnSURE de la marque Hygiena (Omidbakhsh et al., 2014). Il est important de mentionner que les valeurs de lecture obtenues par les différents luminomètres peuvent varier selon le modèle utilisé (Mildenhall et al., 2020). Il est donc important, lorsque vient le temps de comparer des valeurs de luminométrie, de tenir compte des appareils et écouvillons utilisés. C'est avec le luminomètre EnSURE que ce projet a été réalisé et c'est donc pour cette raison qu'il sera désormais fait référence à celui-ci pour la suite de la revue. L'étude conduite par Renaud et al. (2017) a également été réalisée avec ce luminomètre, bien qu'aucun test n'ait été mené afin d'évaluer la variabilité de l'appareil (variabilité intra-luminomètre) et la variabilité entre plusieurs luminomètres de la même marque (variabilité inter-luminomètre).

1.3.4 Particularités de la luminométrie

Comme il a brièvement été mentionné plus tôt, la luminométrie a l'avantage de fournir des résultats quantitatifs quant à la présence d'ATP (et donc de matière organique) très rapidement, en

quelques secondes. Grâce à son protocole simple et au peu de matériel requis, il n'est pas nécessaire de disposer d'un espace de laboratoire dédié à l'analyse des résultats, d'un personnel spécialisé ou d'une formation approfondie, ce qui représente des avantages certains pour une utilisation à la ferme (Lindell et al., 2018; Heinemann et al., 2021). Cependant, comme il l'est précisé par le manufacturier, la luminométrie ne remplace pas la bactériologie. En effet, puisque la luminométrie détecte l'ATP total sur une surface ou un liquide, cela signifie que l'ATP résiduel (venant de restes de lait, de nourriture ou de contamination organique de type fécal ou salivaire par exemple) aussi bien que l'ATP microbien sont détectés, sans qu'ils ne puissent être discriminés l'un de l'autre par le résultat en RLU (Hygiene, 2023). Bien que ces techniques soient complémentaires et permettent de trouver des informations différentes, il existe tout de même une corrélation positive entre les valeurs de luminométrie et les comptes bactériens obtenus par bactériologie classique (Renaud et al., 2017; Lindell et al., 2018; Buczinski et al., 2022).

1.3.5 Étapes pour la validation d'une technique fiable et répétable

Dans l'optique d'utiliser la luminométrie pour évaluer la propreté des équipements d'alimentation des génisses laitières, différents paramètres restent à valider afin de mettre en place une technique d'écouvillonnage robuste, reproductible et fiable. En effet, il existe différents types d'équipements d'alimentation, chacun ayant ses particularités de forme et d'utilisation, mais aucune méthodologie permettant de réaliser un écouvillonnage standardisé n'existe à l'heure actuelle (Buczinski et al., 2022). Une telle standardisation a donc pour but de limiter autant que possible la variabilité liée à la façon dont la mesure est prise.

1.3.5.1 Évaluation de la répétabilité intra-luminomètre et inter-luminomètre

La fidélité du luminomètre représente un élément à évaluer afin de vérifier s'il existe des variations lors de l'utilisation du même luminomètre (i.e. répétabilité intra-luminomètre) et également entre les luminomètres (i.e. répétabilité inter-luminomètre), lorsque plusieurs sont utilisés pour un même projet.

1.3.5.2 Évaluation de la fidélité de l'échantillonnage

La fidélité de la technique d'écouvillonnage utilisée ainsi que la fidélité des utilisateurs réalisant l'écouvillonnage représentent également des éléments à prendre en compte afin de bâtir une technique la plus fiable et reproductible possible.

1.3.5.2.1 Standardisation de la technique de collecte

Lors de l'élaboration d'une technique d'échantillonnage, différents paramètres doivent être établis pour permettre la reproductibilité et la fidélité de la méthode. La superficie de la surface à échantillonner, le nombre de passages à réaliser sur cette surface, la rotation ou non de l'écouvillon, la pression appliquée, le type d'écouvillon, ou encore le type d'équipement sont des exemples de paramètres qui doivent être détaillés dans le protocole décrivant la technique de collecte (Renaud et al., 2017).

1.3.5.2.2 Répétabilité intra-opérateur puis inter-opérateur

Également, l'opérateur réalisant la technique d'échantillonnage est une variable importante lors de la standardisation. Une étape préliminaire consiste à valider que la technique est reproductible lorsqu'un seul et même opérateur échantillonne (i.e. intra-opérateur), c'est-à-dire que des résultats semblables sont obtenus pour une même surface. L'étape suivante permet de valider que la technique fournit des résultats semblables quel que soit l'opérateur qui échantillonne (i.e. inter-opérateur).

Une fois la technique standardisée, les résultats obtenus permettent entre autres de comparer plusieurs études entre elles, avec l'objectif de mettre en place des seuils de contamination référence pour les équipements et ainsi émettre des recommandations pour le nettoyage et la désinfection de ces derniers.

Tous ces éléments ne sont pas encore disponibles dans la littérature scientifique et c'est pourquoi notre projet a lieu. Un premier volet vise donc à décrire l'utilisation des écouvillons et du luminomètre pour la détection des bactéries sur diverses surfaces, et à développer des procédures standardisées d'échantillonnage applicables pour les différents types d'équipements permettant d'alimenter les veaux en pré-sevrage au Québec. Ensuite, le 2^e volet a pour objectif d'évaluer la contamination des équipements, de recueillir des données de santé et d'environnement des veaux,

et de mettre en relation les lectures au luminomètre avec les performances de ces derniers. Ultimement, des seuils de contamination bactérienne ayant un impact sur la santé des veaux pourraient ainsi être établis, ce qui permettrait d'implanter davantage l'utilisation du luminomètre dans les fermes québécoises et d'en faire un outil diagnostique grâce auquel des recommandations pourraient être émises.

Chapitre 2 – Manuscrit scientifique

Standardization and validation of ATP luminometry as a diagnostic tool to assess the cleanliness of feeding equipment in pre-weaning calves*

Anaïs Chancy^{1*}, Débora E. Santschi², Éric R. Paquet³, David L. Renaud⁴, Marie-Lou Gauthier⁵, Édith Charbonneau³, Nicolas Barbeau-Grégoire¹, Laura Van Driessche¹, Sébastien Buczinski^{1*}.

¹ Département des Sciences Cliniques, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe, QC, J2S 2M2 Canada

² Lactanet, Sainte-Anne-de-Bellevue, QC, H9X3R4 Canada

³ Département des Sciences Animales, Université Laval, Québec City, QC, G1V 0A6 Canada

⁴ Department of Population Medicine, University of Guelph, ON, N1G 2W1 Canada

⁵ Complexe de diagnostic et d'épidémiologie-vétérinaire du Québec, Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec, St-Hyacinthe, QC, J2S 2M2 Canada

* Cet article a été approuvé et publié dans le *Journal of Dairy Science* :

Chancy, A., Santschi, D.E., Paquet, É.R., Renaud, D.L., Gauthier, M.L., Charbonneau, É., Barbeau-Grégoire, N., Van Driessche, L., Buczinski, S. 2023. Standardization and validation of ATP luminometry as a diagnostic tool to assess the cleanliness of feeding equipment in preweaning calves. *J Dairy Sci.* 106(9):6263-6274. <https://doi.org/10.3168/jds.2023-23227>

2.1 Abstract

The objective of this cross-sectional study was to standardize a reliable and repeatable swabbing technique using ATP luminometry (light emission proportional to the amount of ATP with result provided in relative light units (RLU)) to describe the cleanliness of various feeding equipment used for pre-weaning calves in dairy farms. A total of 7 Québec commercial dairy herds were selected conveniently. Following visual hygiene scoring, the cleanliness of every available piece of feeding equipment was assessed using direct surface swabbing for buckets and nipples with Hygiena UltraSnap swabs. A liquid rinsing technique was utilized for esophageal feeders, bottles, and automatic milk feeders (AMF) with UltraSnap, AquaSnap, and MicroSnap swabs. To validate direct swabbing technique of buckets, a stage within and between operators was realised, as well as a conventional bacterial culture. A total of 519 swab samples were obtained from 201 pieces of equipment. The median (interquartile range) contamination in RLU for a bottle, esophageal feeder, AMF, bucket and nipple was 2 (1;6), 2 (0;12), 52 (19;269), 886 (128;7,230) and 899 (142;6,928), respectively. The direct swabbing technique, which consists in swabbing directly the surface of an equipment, showed excellent correlation for intra-rater reliability (intra-class correlation (ICC) = 0.93; 95% CI: 0.88 – 0.96). The inter-operator (2 sessions with 3 different operators) reliability also showed high correlation (ICC = 0.88; 95% CI: 0.78 – 0.94 for the first session, and ICC = 0.89; 95% CI: 0.79 – 0.95 for the second session). Luminometer values were positively associated with the visual score of esophageal feeders, AMF and buckets. A positive correlation between bacterial culture and direct swabbing of buckets was also found for the UltraSnap ($r_s = 0.653$; 95% CI: 0.283 – 0.873; $P = 0.0003$) and MicroSnap ($r_s = 0.569$, 95% CI: 0.309 – 0.765; $P = 0.002$). This study describes a standardized and practical on-farm swabbing technique for assessing the hygienic status of feeding equipment by luminometry, which can be integrated in the investigation of pre-weaning dairy calves problems.

Key words: calf-health, hygiene, contamination, luminescence, rapid testing.

2.2 Introduction

In the dairy industry, raising healthy calves and replacement heifers is crucial to ensure optimal growth and long-term herd productivity (Rincker et al., 2011). High rates of morbidity and mortality occur in the pre-weaning period, mostly caused by enteric and respiratory diseases (Winder et al., 2018), emphasizing the need for special management considerations. Health of young calves depends on several factors, including passive immunity acquired by the dam (Mellado et al., 2017) and the cleanliness of the environment and feeding equipment (Heinemann et al., 2021). Moreover, colostrum feeding is an important component of calf health and allows transfer of passive immunity through maternal antibodies in addition to providing an excellent source of energy and other nutrients. However, among potential sources of contamination at the farm, contamination of the equipment used for feeding can introduce bacteria into the colostrum and milk (Fecteau et al., 2002), which can have an impact on mortality, morbidity, and growth (McGuirk, 2003; Mellado et al., 2017). In addition, milk and colostrum are good substrates for bacterial growth (Cummins et al., 2016) which can further increase the bacterial load on the calf if not handled properly.

A practical, quick and reliable evaluation of the cleanliness of feeding equipment is an ongoing challenge on dairy farms. Several options exist to assess feeding equipment contamination, including visual inspection which is the most frequently used method. It has the advantage to be quick, easy, and reliable when equipment is dirty (Renaud et al., 2017). However, when the equipment seems macroscopically clean, this does not exclude the presence of microbiological contamination, as shown on Ontario dairy farms (Renaud et al., 2017). Therefore, bacteriological analysis is a more objective and reliable method, and generally considered the gold standard test to detect contamination of various surfaces (Renaud et al., 2017; Lindell et al., 2018). Direct swabbing of the feeding equipment with this method not only allows for the identification of the bacteria, but also the quantification of total bacterial count (TBC) and total coliform count (TCC) (Malik, 2003; Willis et al., 2007). However, because this analytical technique implies a step of bacterial growth, results can not be obtained rapidly which limits the on-farm application and thus adoption of this method. Adeonsine Triphosphate (ATP) detection by luminometry is an interesting on-farm alternative for the quantification of bacterial contamination on different surfaces (Mildenhall and Rankin, 2020). This method is largely used in food and health industries, and its use is growing in

the agriculture field, particularly in animal production (Shama and Malik, 2013; Mildenhall and Rankin, 2020). Luminometry works through the bioluminescence produced by the presence of ATP, an energy molecule found in all life forms (i.e., animal, plant and microbial cells). Any trace of ATP indicates the presence of organic matter, including bacteria. Quantification of contamination occurs by the reaction catalyzed by luciferase, an enzyme contained in commercial swabs, where when activated by O₂ and ATP, ATP hydrolysis occurs, causing light emission. The luminometer detects and measures the light intensity that is emitted proportionally to the amount of ATP. The result is provided in relative light units (RLU) a few seconds after the reaction. In addition, this whole reaction step can take place in a hand-held device, which makes it easily applicable on farm. For these reasons, the use of luminometry is promising for assessing milking equipment (Lindell et al., 2018; Heinemann et al., 2021) and calf feeding equipment (Renaud et al., 2017).

Today, techniques and standards are well established for direct swabbing of flat surfaces. The methodology describes that a 100 cm² area has to be swabbed, and manufacturers provide audio-visual material for users to see how the swabbing should be performed (Osimani et al., 2014). However, those methods must be adapted for the variety and diversity of equipment found on farms to feed preweaned calves.

Therefore, the objective of this study was to standardize a reliable and repeatable swabbing technique with the use of luminometry to describe the cleanliness of various feeding equipment used for pre-weaning calves in dairy farms paying special attention to directly sampling bucket surfaces. Our main hypothesis was that a direct and reliable swabbing technique can be used for ATP luminometry measurement.

2.3 Materials and methods

2.3.1 Study design

This cross-sectional study was conducted in 7 commercial dairy herds located within 30 km of the Bovine ambulatory clinic of the Faculty of Veterinary Medicine at the University of Montreal (St-Hyacinthe, QC, Canada). The research protocol was approved by the Animal Care Committee of the University of Montreal (20-Rech-2089). The dairy herds, located within a radius of 20 km of the faculty, were conveniently selected among dairy farm clients from the University of Montreal bovine ambulatory clinic enrolled in a preventive veterinary medicine program. Care was also taken a priori to recruit herds with an anticipated variety of contamination levels. Herds were selected with the objective of gathering samples from the 4 most commonly used pieces of equipment for feeding colostrum and milk to calves, which are buckets, nipples, esophageal tube feeder and automatic milk feeders (AMF). Herds were visited 3 to 5 times from November 2020 to May 2021, depending on the availability of different feeding equipment during visits. If other less frequently used equipment was present during visits, like bottles, this was also sampled. The experimental unit was the site sampled and the observational unit was the swab.

2.3.2 Data collection

Common herd descriptive characteristics like herd size (number of milking cows), and availability of milk feeding equipment were obtained.

All ready-to-use equipment surfaces that is normally in contact with colostrum or milk were rated visually with a score from 1 to 4 indicating hygiene and the presence of milk or colostrum and fecal residues. For buckets and nipples, a visual chart was used as recently described (Renaud et al., 2017), and adjustments were made for esophageal feeders and AMF (Table 1). The main adjustment consisted in assessment of transparency of the tube by trying to read a measuring tape graduation, looking for the main graduation that could be distinguished, as presented in Figure 1. The same operator (AC) performed the visual scores for the whole study period.

Table 1. - Visual hygiene assessment scoring chart used to assess contamination of esophageal feeders and automatic milk feeders¹.

Score	Hygiene score	Graduations reading through the tube
1	Feeding equipment is visibly clean (i.e., no fecal material or milk/colostrum debris residue).	No milk/colostrum debris residue: exact reading of the scale.
2	Trace amounts of manure, milk/colostrum residue, or both, are visible.	Trace amounts of milk/colostrum residue are visible: reading of the scale within $\pm 1/16$ of an inch.
3	Manure, milk/colostrum residue, or both, is clearly visible.	Milk/colostrum residue is clearly visible: reading of the scale within $\pm 1/8$ of an inch.
4	Manure contamination, milk/colostrum residue, or both, is extensive.	Milk/colostrum residue is extensive: reading of the scale within $\pm 1/4$ of an inch.

¹For non-tubular equipment like buckets and nipples, visual score was assessed with the same scoring chart used in a previous study (Renaud et al., 2017). Reading scale graduations was not necessary for those equipment because we were able to see, most of the time, the whole surface. However, for tubular equipment, the score was firstly assessed visually and was then confirmed by the reading of graduations, which standardizes the evaluation.

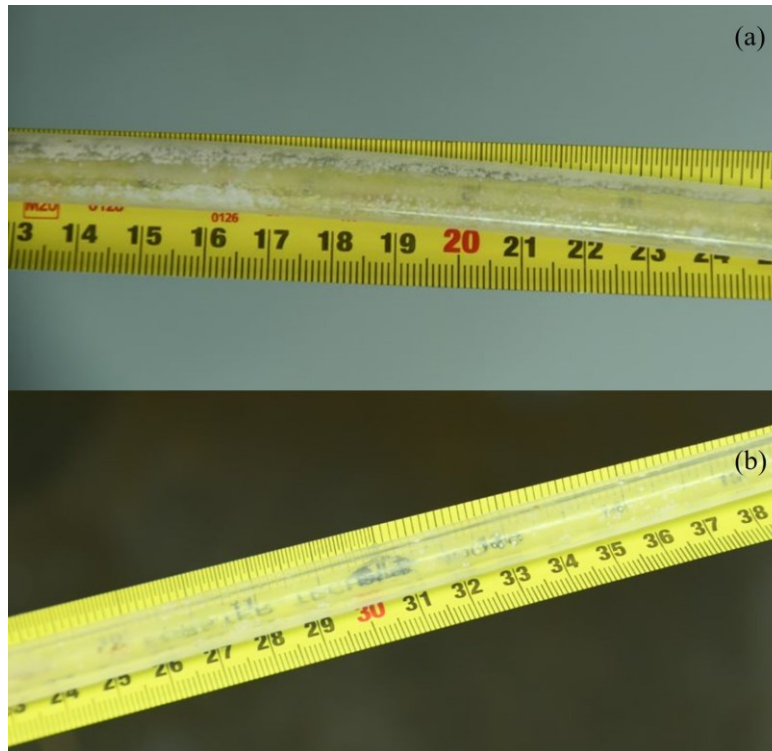


Figure 13. - Assessment of transparency of dirty (a) and clean tubes (b) trying to read the measure tape graduation in inch to evaluate the visual score of tubes. If the exact reading of the scale through the tube is read, the score is 1. If the reading is within $\pm 1/16$ of an inch, the score is 2. If the reading is within $\pm 1/8$ of an inch, the score is 3, and if it is within $\pm 1/4$ of an inch, the score is 4.

The UltraSnap (Surface ATP test), AquaSnap Total (Water ATP Test) and MicroSnap Coliform swabs were used according to the manufacturer's directions (Hygiena, Camarillo, CA). Ultrasnap and Aquasnap total tests were performed directly on the farm. The MicroSnap procedure consists of 2 steps. The first was to swab specific parts of equipment. Then, the swabs were kept into a cooler with ice, kept at around 4 degrees, and transported to the Faculty of Veterinary Medicine at The University of Montreal. The second step required a 6 h incubation period before obtaining results. The maximum time from sampling to testing swabs was 8 hours (before incubation). Product instructions were followed during the study and can be found on Hygiena website (Hygiena, 2022).

During the farm visits, the cleanliness of the 4 different kinds of equipment were assessed using direct surface swabbing or rinsing liquid swabbing. Every available and ready-to-use equipment during visits were swabbed. All swabs were read by 2 distinct Ensure luminometers

(Hygiena, Camarillo, CA) with 2 consecutive repeated measurements to look for inter-luminometer reliability. The devices were used according to the manufacturer’s recommendations, and swabbing was completed by a single operator (AC) for the whole study, except for the inter-operator testing. The specific flow diagram of the study is summarized in Figure 2.

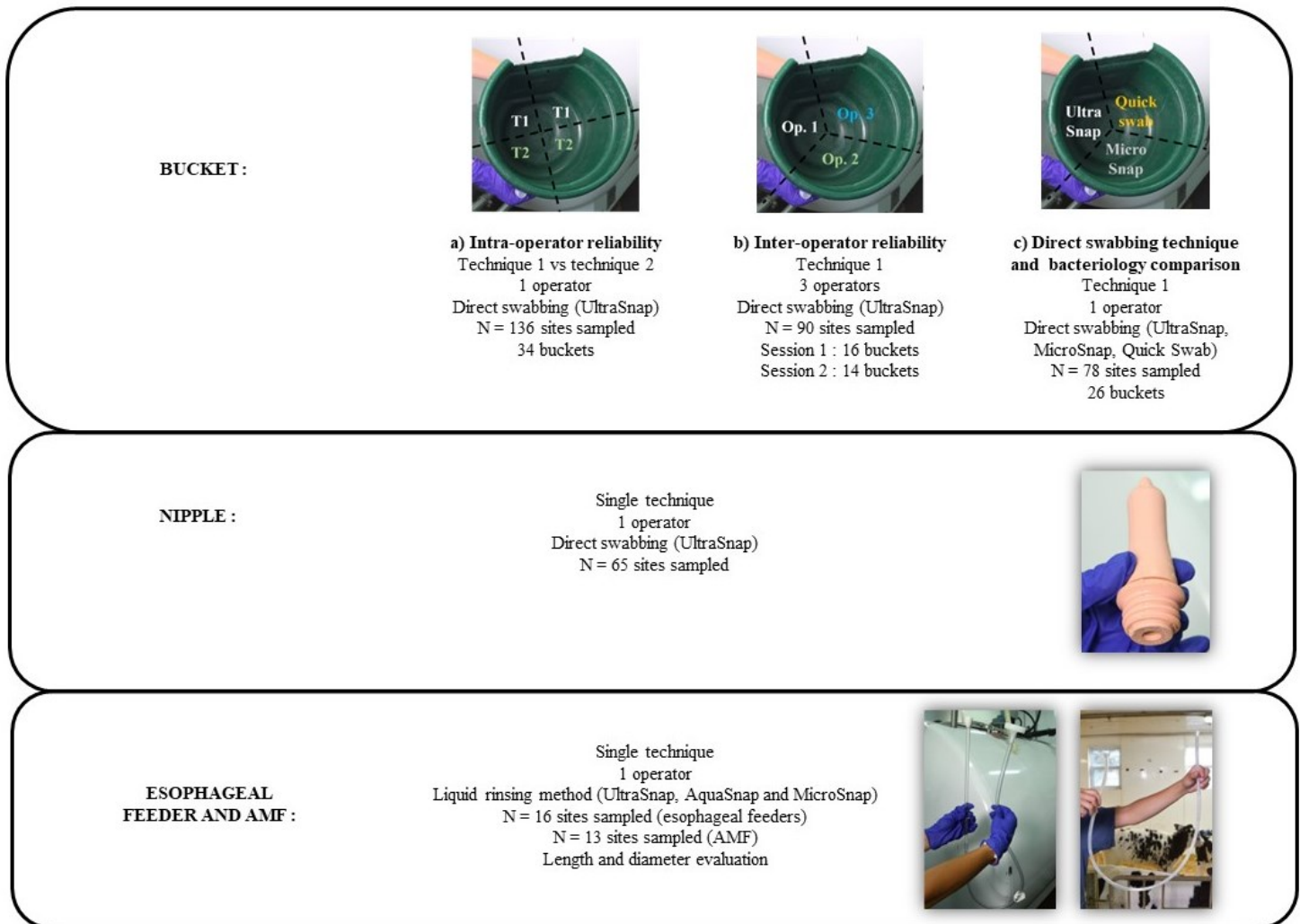


Figure 14. - Flow diagram representing the different techniques performed, the number of operators, the number of each equipment sampled, and the swabs used for every major step of the study and for every type of equipment. Although not illustrated here, 4 bottles were sampled during the study period. The adjustments for the automatic milk feeder (AMF) and esophageal feeders were reported for a tube of 100-cm length and 0,5-cm radius.

2.3.3 Bucket sampling

For flat surfaces like buckets (either regular buckets or nipple buckets), the direct swabbing technique was performed following the SOP recommended by the manufacturer aiming to collect a sample from a 100 cm² area (equivalent to 10 cm*10 cm square). In order to validate the intra-operator reliability, two different techniques based on the swabbing location of the bucket were performed. In technique 1, the sampled area included the internal bottom of the bucket, the circular edge, and the 2 first centimeters of the bottom of the wall. For technique 2, the inner wall at the top of the bucket and the outer edge were sampled. To compare both swabbing techniques, each bucket was virtually separated into 4 equal areas where each technique was repeated twice in the same bucket. Only Ultrasnaps swabs were used for validation of this intra-operator part.

Once the most repeatable and reliable technique was chosen for buckets, the direct swabbing technique was performed by 3 operators to validate the inter-operator reliability. For this step, 2 different swabbing sessions were performed using Ultrasnap swabs, and each piece of equipment was virtually separated into 3 equal areas to allow operators to swab one portion of the bucket with the technique with the highest intra-operator reliability. The same operator (AC) briefly explained the technique at the beginning of each session and all available buckets present at the farm were sampled.

In order to determine the correlation between swab RLU and bacteria found in the equipment surface, a comparison between the direct swabbing technique and the bacteriology was performed by the same operator (AC) during a specific visit in 2 farms. Buckets were again virtually separated into 3 equal areas to assess swabbing with 1 UltraSnap, 1 MicroSnap and 1 3M Quick Swab (3M, St. Paul, MN). Quick swabs were sent to the Lactanet (an organization responsible for milk recording and knowledge transfer in dairy production in Canada) laboratory and 1 mL of the sample was used for culturing total bacteria and coliforms onto a Petrifilm plate.

2.3.4 Nipple sampling

For nipples, the direct swabbing technique allowed a complete sampling of the inner surface. A single technique was used because of the limited swabbing area inside the nipple to compare different techniques. Swabbing was performed (with UltraSnap) starting with the orifice of the teat and going back and forth along the entire length of the teat.

2.3.5 Esophageal tube feeders and automatic milk feeder line

Esophageal feeders and AMF were sampled by the rinsing liquid method exclusively, with AquaSnap and MicroSnap swabs, due to the inherent technical difficulty to develop a direct constant swabbing surface based on various types of devices. For AMF lines, sampling was performed on the tube connecting the feeder to the nipple which was first disconnected and emptied by gravity. Following visual assessment, the length (l) and diameter ($2r$, where r is the radius) of these equipment were noted. Sampling was performed as described by Renaud et al. (2017). Briefly, 15 mL of sterile physiological saline was poured into the tube using a 20 mL sterile syringe, gently mixed for 5 seconds to maximize surface contact and then collected into a sterile collection container. The fluid was then divided in 2 sterile tubes: one submitted for bacteriological analysis at the Lactanet laboratory and the other for the direct luminometry swabs. The tube used for bacteriology was immediately put into a cooler and then transported and frozen at the Faculty of Veterinary Medicine at the University of Montreal before being sent to the laboratory. The other tube was used directly at the farm, for UltraSnap, AquaSnap and MicroSnap swabs assessment. The obtained measurements were then standardized by the cylindric volume sampled ($\pi * l * r^2$), where r is the radius, l the length, to account for the various shape and length of the cylinders sampled, and reported for a tube of 100 cm of length and 0.5 cm radius (which is the dimension compatible with a relatively standard esophageal tube feeder).

2.3.6 Bottle sampling

Few bottles were sampled; however, as for esophageal feeders and AMF, bottles were sampled by the rinsing liquid method exclusively due to the inherent technical difficulty to swab directly the inside surface based on the narrow opening. Following visual assessment, the same sampling technique as described above for esophageal feeders and AMF was performed.

2.3.7 Luminometer reading reliability (intra and inter-assay repeatability)

Every swab used in the swabbing steps above served to evaluate contamination but at the same time for evaluating the repeatability of the device. The intra-luminometer reliability was first assessed by reading the same swab twice in the same luminometer (test-retest reliability). The same swab was instantly read by a second luminometer right after to assess the inter-luminometer reliability (2 additional measures of the same sample by a second luminometer).

2.3.8 Bacterial analysis

The different samples collected for bacterial analysis (quick swabs and liquid obtained from esophageal tube and AMF lines) were analyzed using the same approach. Total bacterial count (TBC, CFU/mL) and total coliform count (TCC, CFU/mL) were evaluated with the 3M aerobic colony count Petrifilm and 3M coliform count Petrifilm (3M), respectively. For both TBC and TCC, the rinsing liquid was diluted 1:1,000 with a Butterfield Phosphate buffer. The dilution factor was *a priori* chosen based on traditional benchmarks used for quantifying milk and colostrum bacterial contamination [with recommended threshold < 100,000 CFU/mL for aerobic bacteria and < 10,000 CFU/mL for coliform counts (McGuirk and Collins, 2004; Morrill et al., 2012)]. One milliliter of the dilution was then pipetted on each Petrifilm. The aerobic colony count Petrifilm was incubated at 35°C for 48 h. Following incubation, the TBC was determined by counting all red-colored colonies. The detection thresholds were 1,000 to 250,000 CFU/mL. The coliform count Petrifilm was incubated at 35°C for 24 h. Following incubation, the TCC was determined by counting all red and blue-colored colonies producing gas bubbles. The detection thresholds were 1,000 to 150,000 CFU/mL.

2.3.9 Statistical analysis

All analyses were performed using the open-source R software v 4.0.6 (<https://www.r-project.org/>). Descriptive statistics were obtained for herd characteristics, swab RLU results (using mean of the 2 consecutive measurements made) and equipment contaminations. The contamination RLU results were not normally distributed and therefore presented as median and interquartile range. Nonparametric statistics were performed unless explained otherwise.

2.3.10 Reliability of swabbing technique (intra-rater and inter-rater)

Assessment of intra-rater (technique 1 and 2 repeated by the same rater) and inter-rater reliability (technique 1 repeated by 3 different raters in 2 different occasions) as well as determination of test-retest reliability by the same luminometer (same sample assessed twice consecutively) was evaluated using intra-class correlation coefficient (ICC) as recommended by Gwet (2014). The ICC general framework aim to determine the relative variance of the object to measure versus all other sources of variation. For example, when obtaining the measure M_m (in our specific case RLU measure) of the true trait with an unobserved true mean M (true

contamination level), a general framework can be written at the level of the i^{th} observation by the j^{th} rater with:

$$Mm_{ij} = M + \alpha_j + \varepsilon_{ij}$$

The reliability will compare the relative variance:

$$\text{Reliability (ICC)} = \frac{\sigma_{\alpha}^2}{\sigma_{\alpha}^2 + \sigma_{\varepsilon}^2}$$

Depending on the way to partition both variance components, several different types of ICC calculation formula can be used. The different ICC were calculated using the ICC function of the psych R package (Revelle, 2016). A single rater absolute ICC was used for comparing the 2 different swabbing techniques for buckets, for testing the same technique twice by the same operator and for test-retest of the same sample by the same luminometer. In order to improve normality of the luminometry results, the RLU were log transformed (using $\log_{10}(\text{RLU}+1)$). However, even transformed, the contamination is still not normally distributed, based on a test of normality. The benchmarks for interpreting the ICC results were based on a recent study (Koo and Li, 2016), where values less than 0.5 are indicative of poor reliability, values between 0.5 and 0.75 indicate moderate reliability, values between 0.75 and 0.9 indicate good reliability, and values greater than 0.9 indicate excellent reliability. Single random rater ICC were used for the inter-operator reliability assessment accounting for the fact that the raters chosen for this technique validation could be considered as representative of the population who would potentially use the test.

2.3.11 Sample size calculation

The sample size calculation was specifically oriented toward the assessment of a reliable technique with a high test-retest ICC when performed by the same operator and a reliable technique when used by different operators (inter-rater reliability). The objective for determine intra-operator reliability was to be able to find a technique which has test-retest reliability (ICC) of at least 0.75 (lower limit for good reliability based on ICC benchmarks with a type 1 error of 5% and type 2 error of 20% anticipating a value of $\text{ICC} > 0.90$ with 2 repetitions (Borg et al., 2022) based on various scenario samples between 12 and 58 should be included). Then, to establish the inter-rater reliability with 3 raters at 2 different occasions, we also wanted to be able to prove that the ICC

was > 0.75 with the assumption that the ICC would be ≥ 0.85 . Based on Borg et al (2022), a sample size between 9 and 24 would be required. For other equipment present in the farm, descriptive results were obtained without a formal a priori sample size analyses calculation.

2.3.12 Test-retest reliability of the luminometer and comparison of reading over time by the 2 luminometers

In order to determine if the different consecutive measurement of the same luminometer could be considered as a significant source of variability, two complementary approaches were used. Firstly, a single fixed rater ICC was calculated. Secondly, a non-parametric Passing-Bablok regression analysis was performed to determine occurrence of constant and proportional bias between test-retest analysis of the same sample by the same luminometer (Bilic-Zulle, 2011).

The comparison between the 2 consecutive readings of the 2 different luminometers used in the study was performed with a non-parametric analysis (Friedman test) for repeated measurements (Cleophas and Zwinderman, 2016). The importance of the effect size was determined using Kendall's W value (Tomczak and Tomczak, 2014). The benchmark for interpretation of this value (bounded between 0 and 1) is a small effect (between $0.1 - < 0.3$), moderate effect ($0.3 - < 0.5$) and large effect for Kendall's $W \geq 0.5$.

2.3.13 Visual assessment

To compare visual scores with luminometer results, a Kruskal-Wallis non-parametric analysis of variance (ANOVA) was used to evaluate differences between visual scores and luminometry results. The Dunn test was then performed with Benjamini-Hochberg correction for multiple pairwise comparisons when applicable (> 2 categories tested).

2.3.14 Correlation between luminometry and bacteriology, and between luminometry results

Because it was anticipated that luminometry and bacterial culture results were not measuring the same characteristic (ATP vs living bacteria), correlation between luminometer readings and bacterial contamination were assessed using a non-parametric Spearman correlation (Spearman rho (r_s)). A general interpretation for the correlation coefficient strength was used. Negligible ($0 - < 0.3$), low ($0.3 - < 0.5$), moderate ($0.5 - < 0.7$), high ($0.7 - < 0.9$) and very high correlation ($0.9 - 1$), were determined based on the r_s value as proposed (Hinkle et al., 2003).

For rinsing liquids, RLU values for UltraSnap and AquaSnap were also compared since they are based on the same principle (i.e., ATP detection). A Spearman correlation was also performed for the correlation between these swabs and their correlation with the Ultrasnap.

2.4 Results

2.4.1 Descriptive statistics

A total of 7 commercial dairy farms were investigated in the study. The median number of milking cows was 81 (range: 40; 415), and 519 luminometry swabs were collected, of which 415 were UltraSnap, 39 were AquaSnap and 65 were MicroSnap. A total of 201 different pieces of equipment were swabbed, including 96 buckets, 66 nipples, 16 esophageal feeders, 13 AMF and 10 bottles. The median (IQR) and range for UltraSnap RLU values for all the equipment are presented in Table 2. When non adjusted for a fixed volume, the median and interquartile range of AMF and esophageal tube were 97 (38; 222) and 2 (1; 20), respectively. After length and radius adjustments, the median and interquartile range of AMF and esophageal tube were 52 (19; 269) and 2 (0; 12) respectively, as presented in Table 2. The median length and range in centimeters of esophageal feeders and AMF were 123 (109; 150) and 120 (40; 134), respectively. The median circumference and range in centimeters of esophageal feeders and AMF were 1.13 (1; 1.25) and 1.25 (1; 1.25), respectively.

Table 2. - Median contamination and interquartile range (IQR) of every type of feeding equipment obtained with UltraSnap, AquaSnap and MicroSnap swabs in relative light unit (RLU) for the 7 farms visited.

	Characteristic	UltraSnap	n	AquaSnap	n	MicroSnap	n
Median contamination in RLU (IQR)	Esophageal feeder	2 (0;12)	16	8 (1;185)	16	0 (0;0)	16
	AMF ¹	52 (19;269)	13	322 (130;1,045)	13	1 (0;78)	13
	Bucket	886 (128;7,230)	75	NA	0	5 (2;56)	26
	Nipple	899 (142;6,928)	45	NA	0	NA	0
	Bottle	2 (1;6)	4	8 (1;54)	4	3 (2;4)	4

¹AMF = automatic milk feeder; NA = not available

2.4.2 Intra and inter operator assessment

Concerning the 2 different swabbing techniques used for buckets (n = 170 sites sampled in 51 buckets), technique 1 demonstrated an excellent correlation for intra-rater reliability ($r_s = 0.91$; 95% confidence intervals (CI): 0.77 - 0.97; ICC = 0.93; 95% CI: 0.88 – 0.96). Technique 2 only showed a moderate reliability ($r_s = 0.57$; 95% CI: 0.28 - 0.80; ICC = 0.69; 95% CI: 0.50 – 0.81). Therefore, technique 1 was chosen for the inter-operator assessment where 3 different operators swabbed a total of 90 samples during 2 different sessions. In the first session, 16 buckets on 2 different farms were swabbed, giving a good reliability (ICC = 0.88; 95% CI: 0.78 – 0.94). During the second session, samples were taken from 14 buckets on 1 farm and a good reliability was also observed (ICC = 0.89; 95% CI: 0.79 – 0.95).

2.4.3 Intra and inter luminometer assessment

The 2 consecutive measurements of the same sample by the same luminometer demonstrated an excellent intra-luminometer correlation ($r_s = 0.998$; 95% CI: 0.998 – 0.999). Passing-Bablok regression revealed an absence of proportional and constant bias.

The inter luminometer agreement, meaning 2 consecutive readings of the same sample by two different luminometers, was calculated. Results show a statistically significant difference between the different measurements ($P < 0.001$), except for measurement one and two with the first luminometer. Although lower RLU-values were obtained in time, this effect was considered small (Kendall's $W = 0.174$).

2.4.4 Visual assessment

The distribution of the visual score compared with the RLU values obtained from the UltraSnap for the different kinds of equipment is presented in Figure 3. A positive association was observed for buckets ($P = 0.001995$), esophageal feeders ($P = 0.01921$) and AMF ($P = 0.01838$). For nipples, no association was found between the visual score and RLU measurements ($P = 0.88$).

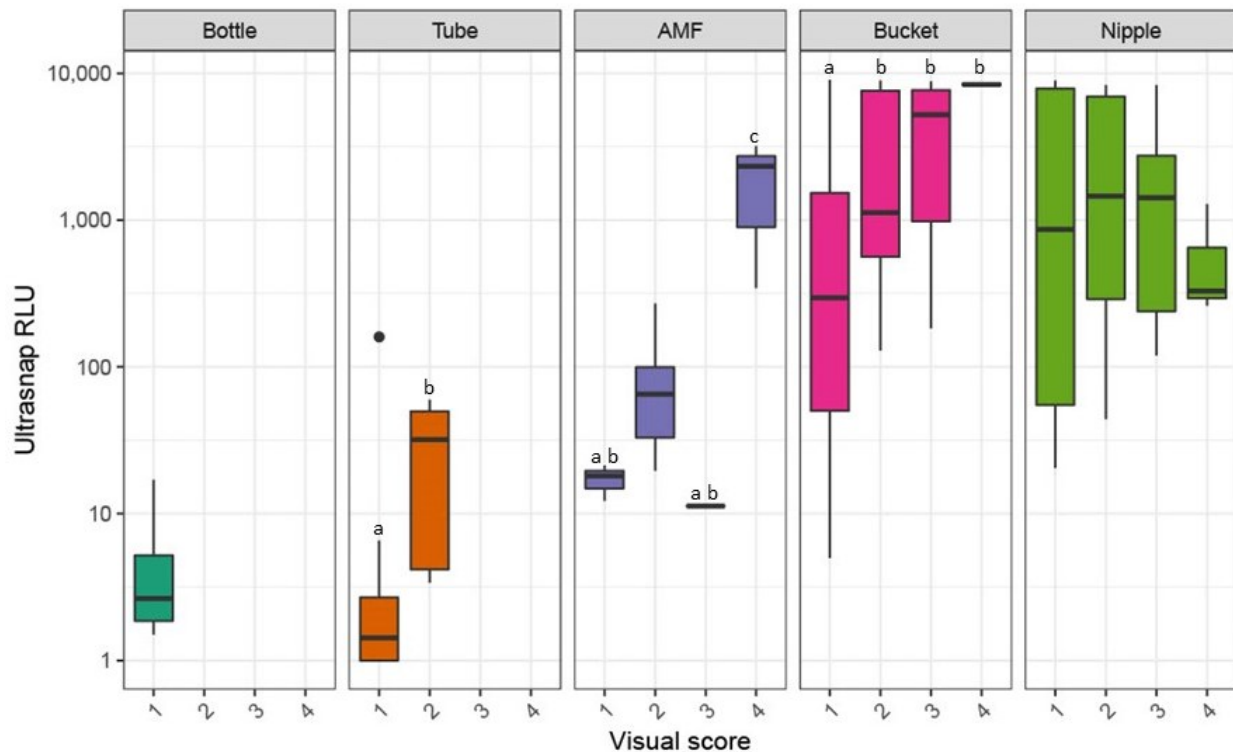


Figure 15. - Relationship between UltraSnap results in relative light unit (RLU) and visual score attributed for every type of equipment. a,b,c = different letters indicate a significant difference ($P < 0.05$) according to the Dunn test with Benjamini- Hochberg correction for multiple pairwise comparisons. The midline represents the median, the box represents the interquartile range, whiskers are ± 1.5 interquartile range, and the dot is an outlier. AMF = automatic milk feeder.

2.4.5 Bacterial analysis and correlation between swabs

When comparing between direct swab readings and bacterial contamination, analyses revealed a moderate correlation ($r_s = 0.653$; 95% CI: 0.283 – 0.873; $P = 0.0003$) between UltraSnap swabs and TBC, a low correlation between UltraSnap swabs and TCC ($r_s = 0.499$; 95% CI: 0.254 – 0.734; $P = 0.009$) and a moderate correlation between MicroSnap swabs and TCC ($r_s = 0.569$, 95% CI: 0.309 – 0.765; $P = 0.002$).

For rinsing liquid samples, there was a high correlation between UltraSnap swabs and TBC ($r_s = 0.764$; 95% CI: 0.334 - 0.953) and between AquaSnap and TBC ($r_s = 0.800$, 95% CI: 0.401 - 0.951).

When comparing rinsing liquid swabs with each other, analyses showed that there is a very high correlation between UltraSnap and AquaSnap ($r_s = 0.945$; 95% CI: 0.876 - 0.970; $P < 0.0001$), a moderate correlation between MicroSnap and UltraSnap ($r_s = 0.571$; 95% CI: 0.307 - 0.766; $P = 0.0001$), and between MicroSnap and AquaSnap ($r_s = 0.517$, 95% CI: 0.226 - 0.727; $P = 0.0007$), as shown in Figure 4.

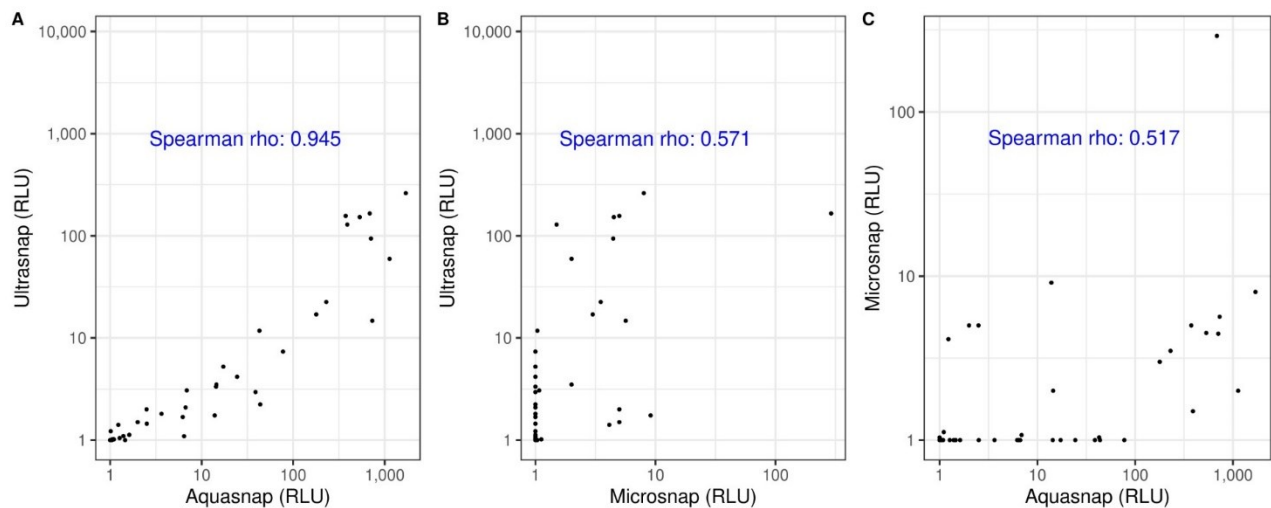


Figure 16- Relationship between UltraSnap and AquaSnap results (A), UltraSnap and MicroSnap (B) and MicroSnap and AquaSnap (C) in relative light unit (RLU) obtained with the rinsing liquid method used for esophageal feeders and automatic milk feeder (AMF).

2.5 Discussion

The results of this study demonstrated that a standardized method using luminometry to swab feeding equipment with various shapes and surfaces is achievable. The reliability of test and retest measurement of the luminometer was almost perfect. Direct sampling of a bucket is practical for on-farm purposes, repeatable, and reliable, even when performed by different operators. Having a standardized method like this is an important advancement since no protocol was described for non-flat surfaces on farms, as recently mentioned as a limitation by Buczinski et al. (2022). In this previous study, the absence of a standardized swabbing technique made the sampling results less objective due to the complexity and various shapes of the equipment sampled. The adjustments of esophageal feeders and AMF length and diameter allowed to standardize the reported contamination, especially for AMF tubes who have variable lengths depending on barn designs. This would therefore make this contamination level more comparable from one farm to another. The same rinsing liquid swabbing technique was performed as previously described (Renaud et al., 2017). In the current study, a special emphasis was put on the direct swabbing method since this requires fewer steps which makes it even more practical. Luminometry results also showed that contamination is common for feeding equipment on farms and almost every type of equipment tested had evidence of contamination, as demonstrated in a previous study (Renaud et al., 2017). Buckets and nipples are the 2 most contaminated equipment. The internal surface of nipples is known to be very contaminated (Heinemann et al., 2021; Renaud et al., 2017). This can be explained by the difficulty of some nipples to be unscrewed and by the difficulty to reach some restricted areas during cleaning, as well as the time consumption this task represents. A possible explanation for buckets to be likely more contaminated is the large open top, the splashes it may receive from the environment, and how often they are used and replaced.

A positive correlation between the visual assessment and luminometry results was found for buckets, esophageal feeders and AMF, but no correlation was found for nipples. Buckets, esophageal feeders and AMF with a high visual score were highly contaminated, whilst most of the nipples who appeared visually clean were contaminated. Usually, in hospitals as well as on farms, visual assessment is seen as a poor indicator of cleanliness (Renaud et al., 2017; Cooper et al., 2007), although other studies suggest otherwise (Hayer et al., 2022). This limitation is more important for nipples because visual inspection of the inner part of the nipple can be limited

especially for dark colored nipples and nipples with a narrow inner part. Unfortunately, no systematical notation of the different colours of nipples or other feeding equipment was performed in this study. This may partially explain the absence of the association between visual score and RLU for nipples.

Although, not of primary interest in this study, bacteriological analysis revealed a correlation between ATP levels detected with the luminometer and TBC and TCC found in microbiological culture. This corresponds to what was reported in a recent study (Renaud et al., 2017). However, no direct sampling was performed in latter study so no additional comparisons with the UltraSnap can be made. As expected, the correlation is moderate and not strong because the luminometer does not only detect microbial ATP, but all types of ATP (i.e., including from normal eukaryote cells) and milk residues, as shown in milk liners (Lindell et al., 2018). This means that the luminometry results should be interpreted with caution and that it does not replace bacteriology. Despite the multi-causal possibilities of a high ATP measurement, increased RLU findings means that feeding equipment and cleaning procedures are not optimal in the farms on this trial. Previous studies also found a positive correlation between bacterial counts and luminometry measurements (Lindell et al., 2018; Buczinski et al., 2022). Although luminometry allows to assess cleanliness without having the logistical disadvantage of laboratory analyses, it has to be addressed that this technique does not replace bacteriological analysis. Bacteriology and luminometry are two complementary tools that should be used to collect different information, in different contexts. The main advantage of luminometry is that it is a fast tool for detection of organic matter. The evaluation of the cleanliness of surfaces does not only take into account bacteria, as many have also demonstrated (van Arkel et al., 2021), which explains the difference with bacteriological analyses. Contamination of feeding equipment is a major calf health problematic because if surfaces are not properly cleaned, it can lead to colostrum contamination (Stewart et al., 2005), which can have an impact on the performance of the calves and the morbidity and mortality rates (Urie et al., 2018, McGuirk, 2003). However, it is currently unknown what would be an acceptable benchmark for each equipment type. Further research should be conducted with more samples to determine the cut-off point of luminometry results to conclude if the contamination is acceptable or not.

This study naturally comes with limitations. Because the main objective was to validate the reliability of a direct sampling method for buckets, extrapolation of other findings may be difficult due to the relatively low number of farms and equipment sampled. Unfortunately, we could not determine the reliability of the direct swabbing of the nipple. In practice, it was very challenging to compare the reliability of the operators for sampling the same nipple. However, we believe that the single technique described and a standard surface to swab (the fact that inner nipple surfaces are relatively constant from one brand to another) supports to keep the nipple swabbing practical and repeatable. An additional limitation is that very few bottles were present on farms which means that only a few samples were taken for this equipment. It is important to remember that, due to the relatively low number of farms and various number of equipment assessed, it was not possible to look for specific farm management factors that could be associated with the RLU contamination.

Further studies should therefore be conducted on a larger number of herds trying to connect hygiene assessment results, feeding equipment cleaning characteristics and calf health. Also, benchmarking ATP results could be useful for providing specific advice in hygiene protocols and therefore improving the overall calf management on the farm.

2.6 Conclusions

The development of a reliable, repeatable and standardized technique for feeding equipment with the use of luminometry was validated in this study. A specific direct swabbing technique for bucket and nipple cleanliness assessment was also proposed. Luminometer values were positively associated with the visual score of the esophageal tube, AMF and buckets. A positive correlation between bacterial culture and direct swabbing of buckets was found. This study reinforces the potential application of a luminometer as an on-farm tool for assessing the hygienic status of feeding equipment of pre-weaning calves.

2.7 Acknowledgments

The authors would like to thank all the participating dairy producers, as well as the technical staff of the Bovine ambulatory clinic and the Lactanet laboratory. This study was financially

supported by Innov'Action agroalimentaire program (partnership between the ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec (MAPAQ) and Agriculture and Agri-Food Canada). The project was also partly granted by the Producteurs de lait du Québec (Québec dairy producers association) . The authors disclose any conflict of interest relative with the study.

2.8 References

Bilic-Zulle, L. 2011. Comparison of methods: Passing and Bablok regression. *Biochem Med (Zagreb)*. 21(1):49-52.

Borg, D. N., Bach, A. J., O'Brien, J. L., and Sainani, K. L. 2022. Calculating sample size for reliability studies. *PM&R*, 14(8), 1018-1025.

Buczinski, S., Morin, M.P., Roy, J.P., Rousseau, M., Villettaz-Robichaud, M., Dubuc, J. 2022. Use of ATP luminometry to assess the cleanliness of equipment used to collect and feed colostrum on dairy farms. *J. Dairy Sci.* 105:1638–1648. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-21023>.

Cleophas, T. J., Zwinderman, A. H. 2016. Non-parametric tests for three or more samples (Friedman and Kruskal-Wallis). Pages 193-197 in: *Clinical data analysis on a pocket calculator*. Springer.

Cooper, R., Griffith, C., Malik, R., Obee, P., Looker, N. 2007. Monitoring the effectiveness of cleaning in four British hospitals. *Am. J. Infect. Control* 35:338–341. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2006.07.015>.

Cummins, C., Lorenz, I., Kennedy, E. 2016. Short communication: The effect of storage conditions over time on bovine colostrum immunoglobulin G concentration, bacteria, and pH. *J. Dairy Sci.* 99:4857–4863. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2015-10276>.

Fecteau, G., Baillargeon, P., Higgins, R., Paré, J., Fortin, M. 2002. Bacterial contamination of colostrum fed to newborn calves in Québec dairy herds. *Can Vet J.* 43(7):523-7.

Gwet, K.L. 2014. Handbook of inter-rater reliability: The definitive guide to measuring the extent of agreement among raters. 4th ed. Advanced Analytics.

Hayer, J.J., Heinemann, C., Schulze-Dieckhoff, B.G., Steinhoff-Wagner, J. 2022. A risk-oriented evaluation of biofilm and other influencing factors on biological quality of drinking water for dairy cows. *J. Anim. Sci.* 100:1-11. <https://doi.org/10.1093/jas/skac112>.

Heinemann, C., Leubner, C.D., Hayer, J.J., Steinhoff-Wagner, J. 2021. Hygiene management in newborn individually housed dairy calves focusing on housing and feeding practices. *J. Anim. Sci.* 99(1). <https://doi.org/10.1093/jas/skaa391>.

Hinkle, D.E., Wiersma, W., Jurs, S.G. 2003. Applied Statistics for the Behavioral Sciences. 5th ed. Houghton Mifflin.

Hygiena. 2022. ATP Monitoring. Accessed June 27th, 2022. <https://www.hygiena.com/food-safety-solutions/atp-monitoring/>.

Koo, T. K. and Li, M.Y. 2016. A guideline of selecting and reporting intraclass correlation coefficients for reliability research. *J. Chiropr. Med.* 15:155–163. <https://doi.org/10.1016/j.jcm.2016.02.012>.

Lindell, I. C., Lundh A., Sjaunja, K.S., Cederholm, M. 2018. Adenosine triphosphate bioluminescence for hygiene testing of rubber liners and tubes on dairy farms. *J. Dairy Sci.* 101:2438-2447. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13466>.

Malik, R. 2003. Use of audit tools to evaluate the efficacy of cleaning systems in hospitals. *Am. J. Infect. Control.* 31:181-187. <https://doi.org/10.1067/mic.2003.34>.

McGuirk, S.M. 2003. Solving calf morbidity and mortality problems. In : Preconvention Seminar 7 : dairy herd problem investigation strategies. Columbus, OH, 15-17 September 2003. American Association of Bovine Practitioners 36th Annual Conference.

McGuirk, S.M., and Collins, M. 2004. Managing the production, storage and delivery of colostrum. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 20: 593-603.

Mellado, M., Torres, E., Veliz, F.G., de Santiago, A., Macias-Cruz, U., Garcia, J.E. 2017. Effect of quality of colostrum on health, growth and immunoglobulin G concentration in Holstein calves in a hot environment. *Anim Sci J.* 88(9):1327 -1336. doi: 10.1111/asj.12773.

Mildenhall, K. B., and S. A. Rankin. 2020. Implications of adenylate metabolism in hygiene assessment: A review. *J. Food Prot.* 83:1619-1631. <https://doi.org/10.4315/JFP-20-087>.

Morrill, K.M., Conrad, E., Lago, A., Campbell, J., Quigley, J., Tyler, H. 2012. Nationwide evaluation of quality and composition of colostrum on dairy farms in the United States. *J Dairy Sci.* 95(7):3997-4005. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-5174>.

Osimani, A., Garofalo, C., Clementi, F., Tavoletti, S., and Aquilanti, L. 2014. Bioluminescence ATP monitoring for the routine assessment of food contact surface cleanliness in a university canteen. *Int J Environ Res Public Health.* 11(10):10824-37. <https://doi: 10.3390/ijerph111010824>.

Renaud, D. L., Kelton, D.F., LeBlanc, S.J., Haley, D.B., Jalbert, A.B. and Duffield, T.F. 2017. Validation of commercial luminometry swabs for total bacteria and coliform counts in colostrum-feeding equipment. *J. Dairy Sci.* 100:9459-9465. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13228>.

Revelle, W. 2016. psych: Procedures for personality and psychological research. Version 1.6.6. Northwestern University. <http://CRAN.R-project.org/package=psych>

Rincker, L., VandeHaar, M., Wolf, C., Liesman, J., Chapin, L., Weber Nielsen, M. 2011. Effect of intensified feeding of heifer calves on growth, pubertal age, calving age, milk yield, and economics. *J. Dairy Sci.* 94(7):3554-3567.

Shama, G., and Malik, D.J. 2013. The uses and abuses of rapid bioluminescence-based ATP assays. *Int. J. Hyg. Environ. Health.* 216(2):115-125. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2012.03.009>.

Stewart, S., Godden, S., Bey, R., Rapnicki, P., Fetrow, J., Farnsworth, R., Scanlon, M., Arnold, Y., Clow, L., Mueller, K., and Ferrouillet, C. 2005. Preventing bacterial contamination and proliferation during the harvest, storage, and feeding of fresh bovine colostrum. *J. Dairy Sci.* 88:2571-2578. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)72933-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72933-7).

Tomczak, M. and Tomczak, E. 2014. The need to report effect size estimates revisited. An overview of some recommended measures of effect size. *Trends in Sport Sciences.* 1(21):19-25.

Urie, N.J., Lombard, J.E., Shivley, C.B., Kopral, C.A., Adams, A.E., Earleywine, T.J, Olson, J.D., Garry, F.B. 2018. Preweaned heifer management on US dairy operations: Part I. Descriptive characteristics of preweaned heifer raising practices. *J. Dairy Sci.* 101(10):9168-9184. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-14010>.

van Arkel, A., Willemsen, I., and Kluytmans, J. 2021. The correlation between ATP measurement and microbial contamination of inanimate surfaces. *Antimicrob Resist Infect Control.* 10, 116. <https://doi.org/10.1186/s13756-021-00981-0>.

Willis, C., Morley, R., Westbury, J., Greenwood, M., Pallett, A. 2007. Evaluation of ATP bioluminescence swabbing as a monitoring and training tool for effective hospital cleaning. *Br. J. Infect. Control* 8:17-21. <https://doi.org/10.1177/1469044607083604>.

Winder, C.B., Bauman, C.A., Duffield, T.F., Barkema, H.W., Keefe, G.P., Dubuc, J., Uehlinger, F., Kelton, D.F. 2018. Canadian National Dairy Study: Heifer calf management. *J. Dairy Sci.* 101(11):10565-10579. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14680>.

Chapitre 3 – Discussion générale

L'objectif général de ce mémoire était le développement d'une technique d'échantillonnage robuste via la détection d'ATP par luminométrie et l'évaluation de la contamination des équipements permettant de faire boire les veaux dans les troupeaux québécois. L'élaboration d'une méthode d'échantillonnage fiable, reproductible, et spécifique à chaque type d'équipement est ce qui distingue ce projet des précédentes études menées sur le sujet. Cette discussion générale vise à mettre en application les principaux résultats, discuter des limites de l'étude et proposer de futures orientations de recherche.

3.1 Application des résultats

Le projet mené lors des derniers mois a permis de confirmer qu'il est possible de mettre en place un protocole fiable permettant d'évaluer la propreté des équipements d'alimentation directement à la ferme. Effectivement, la première phase de validation a permis d'élaborer un protocole d'échantillonnage simple et précis, qui est adapté pour chaque type de surface et d'équipement retrouvé à la ferme, malgré les variations de forme, de matériaux et de porosité. Une attention particulière accordée à l'échantillonnage direct des surfaces a permis de développer une méthodologie convenant aux principaux types d'équipements retrouvés dans les fermes québécoises, et a l'avantage d'être rapide puisqu'aucune phase de rinçage n'est requise. Cela représente une avancée importante, car aucun protocole direct n'avait encore été rapporté dans la littérature ; seuls des protocoles indirects ont été décrits à l'heure actuelle (Renaud et al., 2017). Pour les équipements étant trop étroits, inaccessibles ou difficiles d'accès, une technique indirecte (i.e. avec une étape supplémentaire de collecte du liquide de rinçage servant à l'échantillonnage) a également été mise en place, selon les prémisses décrites par Renaud et al. (2017).

Également, les données répertoriées ont permis de confirmer que le luminomètre est un outil fiable (d'une manière générale, mais plus particulièrement pour le luminomètre EnSURE utilisé pour ce projet) puisqu'il n'y a que très peu voire aucune variation dans les mesures obtenues lors du test-retest d'un même échantillon. La variation des mesures entre deux luminomètres distincts pour un même échantillon est également minimale, ce qui renforce l'utilisation de cet outil à plus grande envergure, peu importe le fabricant. De plus, grâce à l'élaboration d'une technique

d'échantillonnage décrite étape par étape, à la collaboration et l'observation de la technique entre plusieurs opérateurs, ce projet a permis de confirmer que la technique robuste mise sur pied peut être réalisée par différentes personnes tout en obtenant des résultats relativement homogènes, ce qui démontre une fois de plus son potentiel pour une utilisation plus étendue. Ainsi, cette phase du projet a permis la mise en place d'un protocole fiable et adapté à la variété des équipements retrouvés communément dans les fermes laitières, y compris lorsque plusieurs opérateurs et/ou plusieurs luminomètres sont impliqués.

De surcroît, ce premier volet de validation joue aussi un rôle important au niveau de l'utilisation future de la luminométrie en recherche. En effet, cette technique d'échantillonnage, de par sa standardisation, permettra d'augmenter la validité externe des prochaines études qui utiliseront les méthodes décrites ici, ce qui diminuera l'utilisation de protocoles étude-dépendants puisqu'une seule et même méthode pourrait être utilisée. Les résultats de différents projets pourraient alors être comparés entre eux plus aisément. À cette fin, des capsules vidéo ont été enregistrées pour favoriser la diffusion des techniques d'échantillonnage et assurer la bonne compréhension de la méthode. Aussi, le protocole a été développé de façon à ce que plusieurs intervenants (vétérinaire, producteur, agronome, etc.) puissent utiliser le luminomètre et réaliser l'échantillonnage facilement, sans nécessiter de formation approfondie sur le sujet.

Par ailleurs, la deuxième phase du projet, qui s'est déroulée dans une cinquantaine de fermes, a permis de recueillir de nombreuses données quant à la prévalence et à l'étendue des variations de contamination des différents équipements pour lesquels une technique d'échantillonnage avait été développée à la phase 1. Ces données, encore indisponibles pour les fermes québécoises dans la littérature, ont permis de dresser un premier portrait des variations de contamination entre les fermes. Cela a également permis d'obtenir des données descriptives quant aux normes de régie et aux habitudes de nettoyage des équipements, toutes différentes d'une ferme à une autre. Aussi, la collecte de données sur les veaux a permis de recueillir des informations sur leur santé (poids, circonférence thoracique, scores cliniques de Wisconsin pour les yeux, les oreilles, etc.), permettant éventuellement d'établir un lien entre les lectures au luminomètre et les performances de ces derniers (ceci dépasse cependant le cadre du projet). Ainsi, des seuils pourront à l'avenir être éventuellement établis pour trouver des valeurs seuils associées à la santé et au bien-être des veaux.

3.2 Difficultés et limites

Avec tout projet de recherche viennent quelques limites. Dans ce cas-ci, il faut mentionner que la technique d'échantillonnage développée ne remplace pas des analyses bactériologiques en laboratoire. En effet, bien que la technique d'échantillonnage la plus répétable ait été choisie et que des étapes de validation inter-luminomètre et inter-opérateurs aient été réalisées, l'évaluation de la propreté par luminométrie ne permet pas d'obtenir des résultats aussi précis et fiables que la bactériologie (ce qui n'était néanmoins pas l'objectif du projet). Cette dernière permet entre autres de déterminer la bactérie présente dans l'échantillon et d'en estimer le nombre en CFU. Pour ce qui est de la luminométrie, la totalité de la matière organique est détectée, ce qui inclut les bactéries, mais également les résidus organiques, et rend donc la mesure plus globale et moins précise. C'est d'ailleurs ce qui avait été démontré auparavant (van Arkel et al., 2021). Ces deux méthodes sont donc plutôt complémentaires et ne devraient pas se substituer l'une à l'autre.

De plus, lors de la phase 2, les données concernant la régie et les habitudes de nettoyage des équipements par les producteurs ont été récoltées grâce à un questionnaire. Ce type d'échantillonnage comporte certains risques de biais. En effet, on peut soupçonner que les participants conscients de leur nettoyage inadéquat ou insuffisant avaient tendance à donner des réponses inexactes ou atténuées, ce qui fausse la description des pratiques qui en résultait. Aussi, les troupeaux ayant choisi de participer savaient que le projet portait sur l'évaluation de la propreté des équipements d'alimentation. On peut donc présumer que les troupeaux n'accordant que peu d'importance au nettoyage des équipements ou étant peu intéressés à améliorer leurs pratiques n'ont pas participé et ne sont pas donc représentés à juste titre. Également, les troupeaux participants sont tous des clients de la clinique ambulatoire bovine de la Faculté de médecine vétérinaire. Ceux-ci sont donc régulièrement exposés à différents types de projets de recherche, et font partie pour la plupart d'un programme de médecine préventive. Ils sont donc probablement davantage conscientisés et encadrés que les autres troupeaux au Québec. Dans tous les cas, cet échantillonnage par convenance a donc potentiellement permis une sélection de troupeaux moins représentatifs que la normale.

3.3 Future orientation de recherche

À la suite de ce mémoire, différentes avenues pourront être empruntées afin de favoriser l'adoption du luminomètre, aussi bien dans le domaine de la production laitière que dans d'autres domaines. D'abord, afin de viser l'intégration de cet outil diagnostique dans la pratique de la médecine vétérinaire curative, il serait intéressant de l'utiliser, par exemple, lorsque des cas récurrents de diarrhée ou de pneumonie sont détectés chez les veaux en pré-sevrage. Effectivement, l'étiologie de ces maladies peut être difficile à cerner, et les causes sont nombreuses. Une mauvaise ventilation, une alimentation inadaptée, ou encore la contamination des animaux par des agents infectieux sont quelques-unes des pistes à envisager. Dans ces cas de figure, il serait donc pertinent d'instaurer l'utilisation du luminomètre dans le processus diagnostique pour évaluer la propreté des équipements d'alimentation. Cela permettrait de confirmer à quel niveau agir, et d'exclure les autres facteurs pouvant causer la maladie. La mise en place de seuils permettant de grader la contamination de ces équipements faciliterait d'autant plus l'évaluation de la propreté et les mesures à prendre. Également, pour aller plus loin dans le diagnostic et la prise en charge des veaux en diarrhée, une prise d'échantillons révélant une contamination des équipements pourrait être jumelée avec un système de détection des microorganismes entériques (de type « Enterichek » par exemple). En effet, ce système permet la détection fécale de rotavirus, coronavirus, *E. coli* K99 (F5) et *Cryptosporidium* en l'espace de 10 minutes. Ainsi, ces deux méthodes, rapides et réalisables directement à la ferme, permettraient de : a) confirmer d'où provient la contamination, b) ajuster le protocole de nettoyage des équipements si nécessaire et c) traiter adéquatement les veaux malades. Il est toutefois important de garder en tête que la contamination des équipements est un paramètre parmi tant d'autres pouvant favoriser l'apparition de maladies chez le veau. Le luminomètre représente donc un outil supplémentaire en médecine préventive et curative qui devrait être utilisé avec d'autres méthodes diagnostiques et la mise en place de normes de régie.

Par ailleurs, la détection d'ATP par bioluminescence pourrait également être utilisée pour les instruments chirurgicaux dans les hôpitaux vétérinaires. En effet, il est capital que les instruments soient propres et dépourvus de matière organique résiduelle afin de limiter les infections de plaie et la transmission d'agents potentiellement infectieux entre les patients. Ainsi, l'évaluation de la propreté par luminométrie pourrait être effectuée après le nettoyage et avant la désinfection, afin de ne pas nuire à cette dernière. À l'heure actuelle, quelques études se sont

intéressées à ce sujet mais la plupart était des études avec peu d'instruments testés, des techniques non standardisées et pas toujours concluantes (Veiga-Malta, 2016; Fitts et al., 2020; Li et al., 2022). Il serait donc pertinent d'éventuellement réaliser une étude permettant la standardisation d'une technique d'échantillonnage pour les instruments chirurgicaux les plus souvent utilisés en médecine vétérinaire spécifiquement.

Conclusion

Pour conclure, ce projet a permis le développement et la validation d'une technique fiable, répétable et standardisée pour l'échantillonnage par luminométrie des équipements permettant aux veaux de s'alimenter dans les fermes québécoises. Une technique d'écouvillonnage direct pour les seaux et les tétines a été mise en place, ainsi qu'une technique indirecte avec une étape de rinçage pour les tubulures de louve, les tubes à gaver et les biberons. Ce projet a également permis d'avoir une idée plus précise de la prévalence de contamination des équipements d'alimentation et des différents protocoles de nettoyage et de désinfection qui sont appliqués dans les fermes, notamment grâce à la 2^e phase du projet (cf. article en annexe). Ainsi, nous espérons que ce projet constituera une référence pour les futures études investiguant l'état de la contamination des équipements d'alimentation et de tout autre type de surfaces. Au-delà de ce qui a été réalisé, il serait intéressant à l'avenir de mesurer l'évolution des RLU à chaque étape du nettoyage (après le rinçage, après le nettoyage, etc.) afin de déterminer laquelle de ces étapes permet la réduction la plus importante des RLU et dans quelle condition elle est la plus efficace. Il serait aussi pertinent de standardiser une méthode d'écouvillonnage pour les équipements d'alimentation retrouvés dans d'autres types de productions.

Références bibliographiques

Abuelo, A., Cullens, F., Brester, J. 2021. Effect of preweaning disease on the reproductive performance and first-lactation milk production of heifers in a large dairy herd. *Journal of Dairy Science*. 104(6):7008-7017.

Aceto, H. 2015. Biosecurity in hospitals; In : Robinson's current therapy in equine medicine, 7th edition. Elsevier Saunders, Missouri, USA.

Alarcón, L.V., Allepuz, A., Mateu, E. 2021. Biosecurity in pig farms: a review. *Porc Health Manag.* 7:5.

Amass, S.F., Clark, L.K. 1999. Biosecurity considerations for pork productions units. *Journal of Swine Health and Reproduction*. 7:217-228.

Araújo, P.A., Lemos, M., Mergulhão, F., Melo, L., Simões, M. 2013. The Influence of Interfering Substances on the Antimicrobial Activity of Selected Quaternary Ammonium Compounds. *Int J Food Sci*. 237581.

Armengol, R., Fraile, L. 2016. Colostrum and milk pasteurization improve health status and decrease mortality in neonatal calves receiving appropriate colostrum ingestion. *Journal of Dairy Science*. 99:4718-4725.

Armengol, R., Fraile, L. 2020. Feeding calves with pasteurized colostrum and milk has a positive long-term effect on their productive performance. *Animals*. 10(9):1494.

Bach, A., J. Ahedo, Ferrer, A. 2010. Optimizing weaning strategies of dairy replacement calves. *Journal of Dairy Science*. 93:413-419.

Barcelo, J., Marco, E. 1998. On-farm biosecurity. In : Proceedings of the 15th IPVS Congress, Birmingham, England, 5-9 juillet, 129-133.

Baron, S. (editor). 1996. *Medical Microbiology*. 4th ed. Galveston : University of Texas Medical Branch at Galveston.

Bendouma, M., Fertel, C., Ouellet-Plamondon, C. 2022. Évaluer la ventilation pour limiter la propagation des microorganismes, Substance Research [en ligne]. Disponible : <https://substance.etsmtl.ca/evaluer-ventilation-pour-limiter-propagation-microorganismes>.

Braissant, O., Astasov-Frauenhoffer, M., Waltimo, T., Bonkat, G. 2020. A Review of Methods to Determine Viability, Vitality, and Metabolic Rates in Microbiology. *Frontiers in Microbiology*. 11:547458.

Bricher, J.L. 2005. A blueprint for success in sanitary equipment and facility design. In : *Food Safety Magazine*, The Target Group, Glendale.

Brown, A.J., Scoley, G., O'Connell, N., Gordon, A., Lawther, K., Huws, S.A., Morrison, S.J. 2023. Pre-Weaned Calf Rearing on Northern Irish Dairy Farms-Part 2: The Impact of Hygiene Practice on Bacterial Levels in Dairy Calf Rearing Environments. *Animals (Basel)*. 13(6):1109.

Buczinski, S., Achard, D., Timsit, E. 2021. Effects of calfhod respiratory disease on health and performance of dairy cattle: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Dairy Science*. 104:8214–8227.

Buczinski, S., Morin, M.P., Roy, J.P., Rousseau, M., Villettaz-Robichaud, M., Dubuc, J. 2022. Use of ATP luminometry to assess the cleanliness of equipment used to collect and feed colostrum on dairy farms. *Journal of Dairy Science*. 105:1638–1648.

Butler, J. E. 1983. Bovine immunoglobulins: an augmented review. *Veterinary immunology and immunopathology*. 4(1-2), 43-152.

Bylund, G. 2015. *Dairy Processing Handbook 3*. [Rev.] ed. Lund: Tetra Pak Processing Systems AB.

Cabahug, J.P., Alvarado, A.C., Predicala, B.Z. 2016. Rapid assessment of cleanliness of commercial hog transport trailers using ATP bioluminescence method. In: *Proceedings of the ASABE 2016:Annual International Meeting*; Orlando, Fl.

Calf barn and equipment cleaning. 2020. University of British Columbia, Centre for Dairy Education and Research [en ligne]. Disponible : <https://dc.sites.olt.ubc.ca/files/2021/01/SOP-General-006-Calf-barn-and-Equipment-Cleaning.pdf>.

Chase, C.C., Hurley, D.J., Reber, A.J. 2008. Neonatal immune development in the calf and its impact on vaccine response. *Veterinary Clinics of North America : Food Animal Practice*. 24(1):87-104.

Cleaning calf feeding equipment. 2008. NRV Milk [en ligne]. Disponible : <http://nrvmilk.com/wp-content/uploads/2017/01/Cleaning-Calf-Feeding-Equipment-Max-Facts.pdf>.

Conseil National pour les Soins aux Animaux d'Élevage (CNSAE). Codes de pratiques pour le soin et la manipulation des bovins laitiers : nutrition et gestion de l'alimentation des veaux [en ligne]. 2023. Disponible : <https://www.nfacc.ca/codes-de-pratiques/bovins-laitiers/code2023>.

Costa, J.H.C., von Keyserlingk, M.A.G., Weary, D.M. 2016. Invited review: Effects of group housing of dairy calves on behavior, cognition, performance, and health. *Journal of Dairy Science*. 99:2453–2467.

Cramer, M.M. 2022. *Food Plant Sanitation: Design, Maintenance, and Good Manufacturing Practices* (3rd ed.). CRC Press.

Curtis C.R., Erb H.N., White M.E. 1988. Descriptive epidemiology of calfhood morbidity and mortality in New York Holstein herds. *Preventive Veterinary Medicine*. 5: 293-307.

Dachrodt, L., Arndt, H., Bartel, A., Kellermann, L.M., Tautenhahn, A., Volkmann, M., Birnstiel, K., Do Duc, P., Hentzsch, A., Jensen, K.C., Klawitter, M., Paul, P., Stoll, A., Woudstra, S., Zuz, P., Knubben, G., Metzner, M., Müller, K.E., Merle, R., Hoedemaker, M. 2021. Prevalence of disorders in preweaned dairy calves from 731 dairies in Germany: A cross-sectional study. *Journal of Dairy Science*. 104(8):9037-9051.

Davis Rincker L., VandeHaar M., Wolf C., Liesman J., Chapin L., Weber Nielsen M. 2011. Effect of intensified feeding of heifer calves on growth, pubertal age, calving age, milk yield, and economics. *Journal of Dairy Science*. 94(7):3554-3567.

De Gussem, M., van Middelkoop, K., van Mullem, K., van't Veer, E. 2013. *Broiler signals : a practical guide to broiler focused management*. Roodbont Publishers B.V., Zutphen, The Netherlands.

- Delhez P., Meurette E., Knapp E., Theron L., Daube G., Rao AS. 2021. Assessment of a rapid semi-quantitative immunochromatographic test for the evaluation of transfer of passive immunity in calves. *Animals (Basel)*. 11(6):1641.
- Denis-Robichaud, J., Kelton, D.F., Bauman, C.A., Barkema, H.W., Keefe, G.P., Dubuc, J. 2019. Canadian dairy farmers' perception of the efficacy of biosecurity practices. *Journal of Dairy Science*. 102(11):10657-10669.
- Denis-Robichaud, J., Kelton, D.F., Bauman, C.A., Barkema, H.W., Keefe, G.P., Dubuc, J. 2019. Biosecurity and herd health management practices on Canadian dairy farms. *Journal of Dairy Science*. 102(10):9536-9547.
- Dewulf, J., Van Immerseel, F., eds. 2018. *Biosecurity in animal production and veterinary medicine : from principles to practice*. Leuven, Belgium ; The Hague, The Netherlands: ACCO.
- Duhamel, G., Bernoco, D., Davis, W., Osburn, B. 1987. Distribution of T and B lymphocytes in mammary dry secretions, colostrum and blood of adult dairy cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 14(2):101-122.
- Duplessis, M., Cue, R., Santschi, D., Lefebvre, D., Lacroix, R. 2015. Weight, height, and relative-reliability indicators as a management tool for reducing age at first breeding and calving of dairy heifers. *Journal of Dairy Science*. 98(3):2063-2073.
- Elsohaby, I., Keefe, G.P. 2015. Preliminary validation of a calf-side test for diagnosis of failure of transfer of passive immunity in dairy calves. *Journal of Dairy Science*. 98:4754–4761.
- Emanuelson, U., Sjöström, K., Fall, N. 2018. Biosecurity and animal disease management in organic and conventional Swedish dairy herds: A questionnaire study. *Acta Vet. Scand*. 60:23.
- Ennuyer, M. and Laumonier, G. 2013. *Vade-mecum de gestion de l'élevage bovin laitier*. Paris: Éd. Med'com.
- Fatemi, P., Frank, J. F. 1999. Inactivation of *Listeria monocytogenes*/*Pseudomonas* biofilms by peracid sanitizers. *J. Food Prot*. 62:761–765.
- Fecteau, G., P. Baillargeon, R. Higgins, J. Pare, and M. Fortin. 2002. Bacterial contamination of colostrum fed to newborn calves in Quebec dairy herds. *Canadian Veterinary Journal*. 43:523-527.

- Fecteau G., Arsenault J., Pare J., Van Metre D.C., Holmberg C.A., Smith B.P. 2013. Prediction of serum IgG concentration by indirect techniques with adjustment for age and clinical and laboratory covariates in critically ill newborn calves. *Canadian Journal of Veterinary Research*.77:89-94.
- Fitts, L.N., Yegge, J., Goris, A., Vinson, S., Dubberke, E. 2020. How clean is clean enough? An observational pilot study to assess central sterilization processing efficacy with adenosine triphosphate levels. *American Journal of Infection Control*. 48(4):420-422.
- Foley J, Otterby D. 1978. Availability, storage, treatment, composition, and feeding value of surplus colostrum: a review. *Journal of Dairy Science*. 61(8):1033-1060.
- Frank, J. F., Koffi, R. A. 1990. Surface-adherent growth of *Listeria monocytogenes* is associated with increased resistance to surfactant sanitizers and heat. *J. Food Prot.* 53:550–554.
- Friedlander, A., Nir, S., Reches, M., Shemesh, M. 2019. Preventing Biofilm Formation by Dairy-Associated Bacteria Using Peptide-Coated Surfaces. *Front Microbiol.* 10:1405.
- Fryer, P. & Asteriadou, K. 2009. A prototype cleaning map: a classification of industrial cleaning processes. *Trends in Food Science & Technology*. 20:255-262.
- Gapper, L.W., Copestake, D.E.J., Otter, D.E. et al. 2007. Analysis of bovine immunoglobulin G in milk, colostrum, and dietary supplements: a review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 389:93–109.
- Gehan, Z.M., Anwer, W., Amer, H.M., El-Sabagh, I.M., Rezk, A.H., & Badawy, E.M. 2009. In vitro Efficacy Comparisons of Disinfectants Used in the Commercial Poultry Farms. *International Journal of Poultry Science*. 8:237-241.
- Georgiev, P. 2008. Differences in chemical composition between cow colostrum and milk. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*. 11(1):3-12.
- Godden, S. 2008. Colostrum management for dairy calves. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 24:19-39.
- Gorden, P.J., Plummer, P. 2010. Control, management, and prevention of bovine respiratory disease in dairy calves and cows. *Veterinary Clinics of North America : Food Animal Practice*. 26(2), 243-259.

Green, T.A, Russell, S.M., Fletcher, D.L. 1999. Effect of chemical cleaning agents and commercial sanitizers on ATP bioluminescence measurements. *J. Food. Prot.*, 62:86-90.

Griffith, C.J., Cooper, R.A, Gilmore, J., Davies, C., Lewis, M. 2000. An evaluation of hospital cleaning regimes and standards. *Journal of Hospital Infection*. 45:19-28.

Gull, T. 2022. Bacterial Causes of Intestinal Disease in Dairy Calves: Acceptable Control Measures. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*. 38(1):107-119.

Haine, D., Delgado, H., Cue, R., Sewalem, A., Wade, K., Lacroix, R. et al. 2017. Culling from the herd's perspective—Exploring herd-level management factors and culling rates in Québec dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine*. 147:132-141.

Halkman, H.B.D., Halkman, A.K. 2014. Indicator organisms, dans *Encyclopedia of Food Microbiology* (second edition). Academic Press, pp. 358–363.

Harrison, J.J., Stremick, C.A., Turner, R.J., Allan, N.D., Olson, M.E., Ceri, H. 2010. Microtiter susceptibility testing of microbes growing on peg lids: A miniaturized biofilm model for high-throughput screening. *Nat Protoc*. 5:1236–1254.

Hastings, J.W. 2012. Bioluminescence, dans *Cell Physiology Source Book* (fourth edition). Academic Press, pp. 925-947.

Heinemann, C., Leubner, C.D., Hayer, J.J., Steinhoff-Wagner, J. 2021. Hygiene management in newborn individually housed dairy calves focusing on housing and feeding practices. *J. Anim. Sci*. 99(1).

Heinrichs, A. J. 1993. Raising dairy replacements to meet the needs of the 21st century. *Journal of Dairy Science*. 76:3179–3187.

Hémonic, A., Corrége, I., Lanneshoa, M. 2010. Quelles sont les pratiques de biosécurité et d'hygiène en élevages de porcs ? *TechniPorc*. 33:7-13.

Hill, T.M., Bateman II, H.G., Aldrich, J.M., Schlotterbeck, R.L. 2011. Comparisons of housing, bedding, and cooling options for dairy calves. *Journal of Dairy Science*. 94:2138–2146.

- Holah, J., Gabrić, D., Lelieveld, H. 2016. Chapter 44 - Surface Sampling and the Detection of Contamination, in Handbook of Hygiene Control in the Food Industry. 2nd edn. Amsterdam: Elsevier/WP, Woodhead Publishing. 673–696.
- Hyde, R.M., Green, M.J., Hudson, C., and Down, P.M. 2020. Quantitative Analysis of Colostrum Bacteriology on British Dairy Farms. *Frontiers in Veterinary Science*. 7:601227.
- Hygiena. ATP Monitoring [en ligne]. 2023. Disponible : <https://www.hygiena.com/food-safety-solutions/atp-monitoring/>.
- Jaster E.H. 2005. Evaluation of quality, quantity, and timing of colostrum feeding on immunoglobulin G1 absorption in Jersey calves. *Journal of Dairy Science*. 88:296-302.
- Johnson, J.L., Godden, S.M., Molitor, T., Ames, T., Hagman, D. 2007. Effects of feeding heat-treated colostrum on passive transfer of immune and nutritional parameters in neonatal dairy calves. *Journal of Dairy Science*. 90(11):5189-98.
- Kaplan, J.B. 2010. Biofilm dispersal: Mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. *J Dent Res*. 89:205–218.
- Khalili H.S, Crosse S, Varvikko T. 1992. The performance of crossbred dairy calves given different levels of whole milk and weaned at different ages. *Animal Science*. 54:191-195.
- Khan MA, Weary DM, von Keyserlingk. 2011. Invited review : Effects of milk ration on solid feed intake, weaning, and performance in dairy heifers. *Journal of Dairy Science*. 94:1071–1081.
- Kertz, A.F. 2022. Nutritional programs for commercial replacement dairy heifer operations. *Veterinary Clinics of North America : Food Animal Practice*. 38(1):39-49.
- Kertz, A.F., Hill, T.M., Quigley, J.D., Heinrichs, A.J., Linn, J.G., Drackley, J.K. 2017. A 100-Year Review: Calf nutrition and management. *Journal of Dairy Science*. 100(12):10151-10172.
- Kertz A.F, Reutzel L.F, Mahoney J.H. 1984. Ad libitum water intake by neonatal calves and its relationship to calf starter intake, weight gain, feces score, and season. *Journal of Dairy Science*. 67(6530492):2964-2969.

Klein-Jöbstl, D., Iwersen, M., Drillich, M. 2014. Farm characteristics and calf management practices on dairy farms with and without diarrhea: A case-control study to investigate risk factors for calf diarrhea. *Journal of Dairy Science*. 97:5110-5119.

Knauer, W.A., Godden, S.M., Rendahl, A.K., Endres, M.I., Crooker, B.A. 2021. The effect of individual versus pair housing of dairy heifer calves during the preweaning period on measures of health, performance, and behavior up to 16 weeks of age. *Journal of Dairy Science*. 104:3495–3507.

Kumar, S. 2015. Physiology of Bacteria, dans *Essentials of microbiology*. JP Medical Ltd.

Laanen, M., Persoons, D., Ribbens, S., de Jong, E., Callens, B., Strubbe, M., Maes, D., Dewulf, J. 2013. Relationship between biosecurity and production/antimicrobial treatment characteristics in pig herds. *Vet. J*. 198(2):508-512.

Lago, A., S. M. McGuirk, T. B. Bennett, N. B. Cook, and K. V. Nordlund. 2006. Calf respiratory disease and pen microenvironments in naturally ventilated calf barns in winter. *Journal of Dairy Science*. 89:4014-4025.

Larson, B. L., Heary, H. L., Devery, J. E. 1980. Immunoglobulin Production and Transport by the Mammary Gland. *Journal of Dairy Science*. 63(4), 665-671.

Li, Y., Lu, Y., Cai, R., Hu, G., Lu, L. 2022. Monitoring the Cleanliness of Reusable Surgical Instruments in Central Sterile Supply Department by Adenosine Triphosphate Method. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*. 105(3):844–847.

Lima, S.F., Teixeira, A.G.V., Lima, F.S., Ganda, E.K., Higgins, C.H., Oikonomou, G., Bicalho, R.C. 2017. The bovine colostrum microbiome and its association with clinical mastitis. *Journal of Dairy Science*. 100:3031–3042.

Lindberg, A., Houe, H. 2005. Characteristics in the epidemiology of bovine viral diarrhea virus (BVDV) of relevance to control. *Prev. Vet. Med*. 72:55-73.

Lombard, J., Urie, N., Garry, F., Godden, S., Quigley, J., Earleywine, T., Sterner, K. 2020. Consensus recommendations on calf-and herd-level passive immunity in dairy calves in the United States. *Journal of dairy science*. 103(8):7611-7624.

- Lorenz, I., Mee, J.F., Earley, B., More, S. 2011. Calf health from birth to weaning. I. General aspects of disease prevention. *Irish Veterinary Journal*. 64:10.
- Lowe G. L., Sutherland M, Stewart M, Waas J. R.,Cox N, Schütz K. E. 2022. Effects of provision of drinking water on the behavior and growth rate of group-housed calves with different milk allowances. *Journal of Dairy Science*. 105:4449–4460.
- Luyckx, K.Y., Dewulf, J., Van Weyenberg, S., Herman, L., Zoons, J., Vervaet, E., Heyndrickx, M., De Reu, K. 2015a. Comparison of sampling procedures and microbiological and non-microbiological parameters to evaluate cleaning and disinfection in broiler houses. *Poult Sci*. 94(4):740-9.
- Luyckx, K.Y., Van Weyenberg, S., Dewulf, J., Herman, L., Zoons, J., Vervaet, E., Heyndrickx, M., De Reu, K. 2015b. On-farm comparisons of different cleaning protocols in broiler houses. *Poult Sci*. 94(8):1986-93.
- Maertens, H., De Reu, K., Van Weyenberg, S., Van Coillie, E., Meyer, E., Van Meirhaeghe, H., Van Immerseel, F., Vandenbroucke, V., Vanrobaeys, M., Dewulf, J. 2018. Evaluation of the hygienogram scores and related data obtained after cleaning and disinfection of poultry houses in Flanders during the period 2007 to 2014. *Poult Sci*. 97(2):620-627.
- Maes, D., Segales, J., Meyns, T., Sibila, M., Pieters, M., Haesebrouck, F. 2008. Control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pig. *Veterinary Microbiology*. 126:297-309.
- Malik, R. 2003. Use of audit tools to evaluate the efficacy of cleaning systems in hospitals. *Am. J. Infect. Control*. 31:181-187.
- Marchand, S., De Block, J., De Jonghe, V., et al. 2012. Biofilm formation in milk production and processing environments; influence on milk quality and safety. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 11(2):133-147.
- Maunsell, F., G. A. Donovan. 2008. Biosecurity and Risk Management for Dairy Replacements. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract*. 24:155-190.
- McAuley, C.M., McMillan, K., Moore, S.C., Fegan, N., Fox, E.M. 2014. Prevalence and characterization of foodborne pathogens from Australian dairy farm environments. *Journal of Dairy Science*. 97(12):7402-12.

- McGuirk, S.M., and Collins M. 2004. Managing the production, storage, and delivery of colostrum. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 20:593 -603.
- Medrano-Galarza, C., LeBlanc, S. J., DeVries, T. J., Jones-Bitton, A., Rushen, J., de Passillé, A. M., & Haley, D. B. 2017. A survey of dairy calf management practices among farms using manual and automated milk feeding systems in Canada. *Journal of dairy science.* 100(8):6872-6884.
- Meighan, P. 2011. Looking at further developments in ATP bioluminescence. *International Food Hygiene.* 22(3):7-9.
- Mildenhall, K. B., Rankin, S.A. 2020. Implications of adenylate metabolism in hygiene assessment: A review. *J. Food Prot.* 83:1619-1631.
- Mitchell, B., Wilson, F., Dancer, S., McGregor, A. 2013. Methods to evaluate environmental cleanliness in healthcare facilities. *Healthcare Infection.* 18(1):23-30.
- Molitz, A.G., Scott, E.M. 2005. Formation of biofilms by *Listeria monocytogenes* under various growth conditions. *Journal of Food Protection.* 68.
- Moltz, A.G., Martin, S.E. 2005. Formation of biofilms by *Listeria monocytogenes* under various growth conditions. *J Food Prot.* 68(1):92-7.
- Moore, D.A., Leach, D.A., Bickett-Weddle, D., Andersen, K., Castillo, A.R., Collar, C.A., Higginbotham, G., Peterson, N., Reed, B., Hartman M.L. 2010. Evaluation of a biological risk management tool on large western United States dairies. *Journal of Dairy Science.* 93: 4096-4104.
- Morein, B., Abusugra, I., Blomqvist, G. 2002. Immunity in neonates. *Veterinary Immunology and Immunopathology.* 87:207–213.
- Morin, D.E., McCoy, G., Hurley, W. 1997. Effects of quality, quantity, and timing of colostrum feeding and addition of a dried colostrum supplement on immunoglobulin G1 absorption in Holstein bull calves. *Journal of Dairy Science.* 80: 747-753.
- Nordlund, K.V., Halbach, C.E. 2019. Calf barn design to optimize health and ease of management. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 35(1):29-45.
- Norwood, D. E., Gilmour, A. 1999. Adherence of *Listeria monocytogenes* strains to stainless steel coupons. *J. Appl. Microbiol.* 86: 576–582.

- Oliveira, V.H.S., Sørensen, J.T., Thomsen, P.T. 2017. Associations between biosecurity practices and bovine digital dermatitis in Danish dairy herds. *Journal of Dairy Science*. 100(10): 8398-8408.
- Ollivett, T. L. 2020. How does housing influence bovine respiratory disease in dairy and veal calves? *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 36:385-398.
- Olson, M.E., Ceri, H., Morck, D.W., Buret, A.G., Read, R.R. 2002. Biofilm bacteria: Formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Can J Vet Res.* 66:86-92.
- Omidbakhsh, N., Ahmadpour, F., Kenny, N. 2014. How Reliable Are ATP Bioluminescence Meters in Assessing Decontamination of Environmental Surfaces in Healthcare Settings? *PLoS ONE* 9(6): e99951.
- Osimani, A., Garofalo, C., Clementi, F., Tavoletti, S., and Aquilanti, L. 2014. Bioluminescence ATP monitoring for the routine assessment of food contact surface cleanliness in a university canteen. *Int J Environ Res Public Health.* 11(10):10824-37.
- Oshita, S., Al-Haq, M.I., Kawagishi, S., Makino, Y., Kawagoe, Y., Ye, X. 2011. Monitoring of ATP and viable cells on meat surface by UV-Vis reflectance spectrum analysis. *J Food Eng.* 107:262-7.
- Perkins, N.R., Kelton, D.F., Hand, K.J., MacNaughton, G., Berke, O., Leslie, K.E. 2009. An analysis of the relationship between bulk tank milk quality and wash water quality on dairy farms in Ontario, Canada. *Journal of Dairy Science.* 92 :3714-3722.
- Peter, A. T. 2013. Bovine placenta: a review on morphology, components, and defects from terminology and clinical perspectives. *Theriogenology*, volume 80, issue 7. 693-705.
- Postma, M., Backhans, A., Collineau, L., Loesken, S., Sjölund, M., Belloc, C., Emanuelson, U., Grosse Beilage, E., Stärk, K.D., Dewulf, J. 2016. The biosecurity status and its associations with production and management characteristics in farrow-to-finish pig herds. *Animal.* 10(3):478-89.
- Quigley, J., Drewry, J. 1998. Nutrient and immunity transfer from cow to calf pre- and post-calving. *Journal of Dairy Science.* 81(10):2779-2790.

- Rauprich, A., Hammon, H., Blum, J. 2000. Influence of feeding different amounts of first colostrum on metabolic, endocrine, and health status and on growth performance in neonatal calves. *Journal of Animal Science*. 78(4):896.
- Robison, J.D., Stott, G., DeNise, S. 1988. Effects of passive immunity on growth and survival in the dairy heifer. *Journal of Dairy Science*. 71:1283-1287.
- Ruano, M., El-Attrache, J., Villegas, P. 2001. Efficacy comparisons of disinfectants used by the commercial poultry industry. *Avian Dis*. 45(4):972-7.
- Rüegg, M. 1985. Water in Dairy Products Related to Quality, with Special Reference to Cheese. In: Simatos, D., Multon, J.L. (eds) *Properties of Water in Foods*. NATO ASI Series, vol 90. Springer, Dordrecht.
- Sarrazin, S., Cay, A.B., Laureyns, J., Dewulf, J. 2014. A survey on biosecurity and management practices in selected Belgian cattle farms. *Prev. Vet. Med*. 117: 129-139.
- Shama, G., and Malik, D.J. 2013. The uses and abuses of rapid bioluminescence-based ATP assays. *Int. J. Hyg. Environ. Health*. 216(2):115-125.
- Sherlock, O., O'Connell, N., Creamer, E., Humphreys, H. 2009. Is it really clean? An evaluation of the efficacy of four methods for determining hospital cleanliness. *J Hosp Infect*. 72(2):140-6.
- Stewart, S., Godden, S., Bey, R., Rapnicki, P., Fetrow, J., Farnsworth, R., Scanlon, M., Arnold, Y., Clow, L., Mueller, K., and Ferrouillet, C. 2005. Preventing Bacterial Contamination and Proliferation During the Harvest, Storage, and Feeding of Fresh Bovine Colostrum. *Journal of Dairy Science*. 88:2571–2578.
- Svensson C, Hultgren J. 2008. Associations between housing, management, and morbidity during rearing and subsequent first-lactation milk production of dairy cows in Southwest Sweden. *Journal of Dairy Science*. 91(4):1510-1518.
- Svensson, C., Lundborg, K., Emanuelson, U., Olsson, S. 2003. Morbidity in Swedish dairy calves from birth to 90 days of age and individual calf-level risk factors for infectious diseases. *Prev. Vet. Med*. 58: 179-197.

Thickett, W.S., Cuthbert, N.H., Brigstocke, T.D., Lindeman, M.A., Wilson, P.N. 1981. The management of calves on an early-weaning system: the relationship of voluntary water intake to dry feed intake and live-weight gain to 5 weeks. *Animal Science*. 33: 25-30.

Toth, J.D., Aceto, H.W., Rankin, S.C., Dou, Z. 2013. Short communication: Survey of animal-borne pathogens in the farm environment of 13 dairy operations. *Journal of Dairy Science*. 96(9):5756-61.

Tremblay, Y.D., Hathroubi, S., Jacques, M. 2014. Les biofilms bactériens : leur importance en santé animale et en santé publique [Bacterial biofilms: their importance in animal health and public health]. *Can J Vet Res*. 78(2):110-6.

Trotz-Williams, L. A., Martin, S.W., Leslie, K.E., Duffield, T., Nydam, D.V., Peregrine, A.S. 2008. Association between management practices and within-herd prevalence of *Cryptosporidium parvum* shedding on dairy farms in southern Ontario. *Prev. Vet. Med*. 83:11-23.

Turner, D.E., Daugherty, E.K., Altier, C., Maurer, K.J. 2010. Efficacy and limitations of an ATP-based monitoring system. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 49(2):190-195.

Tyler, J.W., Hancock, D.D., Parish, S.M., Rea, D.E., Besser, T.E., Sanders, S.G., Wilson, L.K. 1996. Evaluation of 3 assays for failure of passive transfer in calves. *J. Vet. Intern. Med*. 10 (b): 304-307.

Urie, N., Lombard, J., Shivley, C., Koprak, C., Adams, A., Earleywine, T. 2018. Preweaned heifer management on US dairy operations: Part I. Descriptive characteristics of preweaned heifer raising practices. *Journal of Dairy Science*. 101(10):9168-9184.

USDA. Dairy 2014: Health and management practices on U.S. dairy operations, 2014. USDA-Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS)-Veterinary Services (VS)-Center for Epidemiology and Animal Health (CEAH), Fort Collins, CO.

van Arkel, A., Willemsen, I., and Kluytmans, J. 2021. The correlation between ATP measurement and microbial contamination of inanimate surfaces. *Antimicrob Resist Infect Control*. 10(116).

Van Driessche, L., Buczinski, S., Chancy, A., Santschi, D. 2023. Vos équipements pour l'alimentation des veaux sont-ils assez propres ? *Le Producteur de Lait Québécois*. 43(10):27-29.

- Veiga-Malta, I. 2016. Preventing healthcare-associated infections by monitoring the cleanliness of medical devices and other critical points in a sterilization service. *Biomed. Instrum. Technol.* 50(3):45-52.
- Vogels, Z., Chuck, G., Morton, J. 2013. Failure of transfer of passive immunity and agammaglobulinaemia in calves in southwest Victorian dairy herds: prevalence and risk factors. *Australian Veterinary Journal.* 91:150-158.
- Weaver, D., Tyler, J., VanMetre, D., Hostetler, D., Barrington, G. 2008. Passive transfer of colostrum immunoglobulins in calves. *Journal of Veterinary Internal Medicine.* 14:569-577.
- Wei, X., Lau, S.K., Chaves, B.D., Danao, M.C., Agarwal, S., Subbiah, J. 2020. Effect of water activity on the thermal inactivation kinetics of *Salmonella* in milk powders. *Journal of Dairy Science.* 103(8):6904-6917.
- Wickramasinghe, H.K.J.P., Kramer, A.J., Appuhamy, J.A.D.R.N. 2019. Drinking water intake of newborn dairy calves and its effects on feed intake, growth performance, health status, and nutrient digestibility. *Journal of Dairy Science.* 102 (30415859): 377-387.
- Willis, C., Morley, R., Westbury, J., Greenwood, M., Pallett, A. 2007. Evaluation of ATP bioluminescence swabbing as a monitoring and training tool for effective hospital cleaning. *Br. J. Infect. Control* 8:17-21.
- Winder, C., Bauman, C., Duffield, T., Barkema, H., Keefe, G., Dubuc, J. 2018. Canadian National Dairy Study: Heifer calf management. *Journal of Dairy Science.* 101(11):10565-10579.
- Yang, M., Zou, Y., Wu, Z., Li, S., Cao, Z. 2015. Colostrum quality affects immune system establishment and intestinal development of neonatal calves. *Journal of Dairy Science.* 98(10):7153-7163.

Annexe

Hygiene management practices and ATP luminometry of feeding equipment in preweaned calves on dairy farms in Quebec, Canada*

Laura Van Driessche¹, Débora E. Santschi², Éric Paquet³, David Renaud⁴, Édith Charbonneau³, Marie-Lou Gauthier⁵, Anaïs Chancy¹, Nicolas Barbeau-Grégoire¹, and Sébastien Buczinski¹.

¹ Department of Clinical Science, Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal, St-Hyacinthe, J2S2M2, QC, Canada

² Lactanet, Sainte-Anne-de-Bellevue, H9X3R4, QC, Canada

³ Department of Animal Science, University of Laval, Quebec City, G1V0A6, QC, Canada

⁴ Department of Population Medicine, University of Guelph, N1G2W1, Ontario, Canada

⁵ Laboratory of Animal Health, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, St-Hyacinthe, J2S2M2, QC, Canada

* Cet article a été approuvé et publié dans le *Journal of Dairy Science* :

Van Driessche, L., Santschi, D.E., Paquet, É.R., Renaud, D.L., Charbonneau, É., Gauthier, M.L., Chancy, A., Barbeau-Grégoire, N., Buczinski, S. 2023. Hygiene management practices and ATP luminometry of feeding equipment in preweaned calves on dairy farms in Quebec, Canada. *J Dairy Sci.* <https://doi.org/10.3168/jds.2023-23626>

Interpretive summary

Hygiene management, in particular the cleanliness of feeding equipment, is recognized as an important contributing factor to the overall health of preweaned calves. A clear understanding of current cleaning procedures and contamination levels could help benchmark farms and provide personalized advice. The aim of this study was to describe the self-reported cleaning practices for preweaned calves on dairy farms in Quebec, Canada. Additionally, an overview and cut-off values of ATP luminometry measurements to assess cleanliness, in combination with other hygiene indicators like visual score and bacteriological analysis of feeding equipment of preweaned calves from 50 dairy farms, are presented.

Abstract

The objective of this study was to describe the cleaning practices currently used for preweaning calves on dairy farms in Quebec, Canada. In addition, the contamination of feeding equipment for preweaned calves was described using ATP luminometry (expressed as relative light units (RLU)), visual assessment and bacteriological analysis. A questionnaire was administered on 50 commercial dairy farms in Quebec, Canada, regarding the self-reported cleaning protocol used for feeding equipment of preweaned calves. During the visit, a visual score was given to the feeding equipment available at the farm. Afterwards, ATP luminometry measurements were obtained using the Hygiene UltraSnap and MicroSnap swabs and the liquid rinsing technique for buckets, nipples, bottles, esophageal tube feeders (ET), the tube of automatic milk feeders (AMF), water samples, and milk replacer. An additional direct swabbing technique was performed on buckets and nipples. The fluid retrieved from the liquid rinsing technique was also used to determine the total bacterial count and total coliform count. Based on the bacteriological analysis, optimal RLU cut-off values to determine contamination were obtained. The median (interquartile range) luminometer measurements using the UltraSnap and direct technique for buckets and nipples were 2,082 (348 – 7,410) RLU and 3,462 (462 – 7,518) RLU, respectively, and using the liquid technique for bottles, ET, AMF, water and milk replacer were 43 (4 – 974) RLU, 15 (4 – 121) RLU, 301 (137 – 1,323) RLU, 190 (71-358) RLU and 94 (38-218) RLU, respectively. Overall, for all equipment and both techniques used, higher RLU values were seen in UltraSnap samples compared to MicroSnap

samples. Additionally, for buckets and nipples, higher RLU values were obtained for the direct swabbing method compared to the liquid sampling method for both swabs used. No differences in the level of contamination were seen between the different feeding equipment used within a farm. Overall, a higher correlation with bacteriological results was noticed for ATP luminometry compared to the visual score, with a high correlation for bottles and nipples using the UltraSnap and liquid technique. Based on the classification of ‘contaminated’ ($TBC \geq 100,000$ CFU/mL) or ‘not contaminated’ ($TBC < 100,000$ CFU/mL), optimal ATP luminometer cut-off values for buckets, bottles, AMF, nipples, water, and milk replacer were 798 RLU, 469 RLU, 282 RLU, 388 RLU, 1,432 RLU and 93 RLU, respectively. No clear association was found between ATP measurements and the self-reported cleaning protocol. This study gave new insights into the current cleaning procedures and contamination of feeding equipment for preweaned calves on dairy farms in Quebec. In addition, ATP luminometry cut-off values could help benchmark farms regarding cleaning practices and provide customized advice, improving the overall hygiene management, and thus the health, in preweaned calves on dairy farms.

Key words: calf, feeding equipment, ATP bioluminescence, hygiene management

Introduction

Raising healthy calves is one of the key components to ensure a sustainable and productive herd in the dairy industry (Bach, 2012). Young calves are particularly susceptible to diseases, like pneumonia and diarrhea, usually caused by a deficient immune system and a high pathogen load (Murray et al., 2016). In order to lower pathogen load, proper management, with emphasis on good hygiene standards, is important (Klein-Jöbstl et al., 2014). It has been suggested that contamination of colostrum fed to preweaning calves can contribute to higher morbidity and mortality rates (Fecteau et al., 2002; Gelsinger et al., 2015). Additionally, high bacterial loads have been reported in nipples and buckets used for feeding calves, enhancing the possible spread of pathogens among calves (Heinemann et al., 2021). Therefore, not only the environment, but also the equipment used for feeding preweaned calves, has to be kept as clean as possible (Heinemann et al., 2021). Current

hygiene management practices of dairy farms in Quebec, Canada, particularly feeding equipment, has not yet been described.

The most conventional method to assess the cleanliness of feeding equipment is visual inspection. Although this is fast and convenient, it is very subjective and lacks sensitivity to apparently clean surfaces that could be heavily contaminated (Renaud et al., 2017). A more scientifically proven and objective method is microbiological analysis. However, this method is time-consuming and cannot be performed on-farm (Renaud et al., 2017; Lindell et al., 2018). To counteract these disadvantages, ATP luminometry has recently been implemented in the farming industry (Renaud et al., 2017; Lindell et al., 2018; Seung-Won et al., 2020; Buczinski et al., 2022). This method allows for on-site assessment of cleanliness by quantifying the amount of ATP present in every life form, into relative light units (RLU) by a chemical luminescent reaction with an enzyme, luciferase (McElroy and Deluca, 1983).

In human medicine, luminometry is commonly used in hospitals to evaluate the hygiene of surfaces (Willis et al., 2007). This method has also been proven useful in the food industry (Corbitt et al., 2000). More recently, research has been conducted to implement the luminometer in veterinary medicine. These studies show the potential of ATP luminometry as an on-farm tool to evaluate the hygiene of rubber liners (Lindell et al., 2018) and colostrum-feeding equipment (Renaud et al., 2017; Buczinski et al., 2022). Additionally, the luminometer sampling technique has been standardized to evaluate the cleanliness of feeding equipment in preweaned calves (Chancy et al., submitted). However, ATP luminometry has not yet been tested at larger scale, so the level of intra- and inter-farm variability of RLU measurements is not known. Therefore, the objective of this study was (1) to describe the different self-reported cleaning protocols used for preweaned calves on dairy farms in Quebec, (2) to determine the variation of ATP luminometry of feeding equipment in dairy farms and to compare this method with commonly used hygiene indicators like the visual score and bacteriological analysis, (3) to determine, based on bacteriological analysis, optimal RLU cut-off values to assess contamination for the different equipment, and (4) to examine associations between luminometer measurements and the different self-reported cleaning protocols used on the farms.

Material and methods

Study design and data collection

Between May and August 2021, an observational study was conducted on 50 commercial dairy farms in Quebec, Canada. Herds were selected based on their willingness to participate in the study and additionally to survey different feeding equipment. Furthermore, all selected herds are either clients of the bovine ambulatory clinic of the Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal or farms participating in another ongoing research project on heifer management representing various feeding equipments. The research protocol was approved by the Animal Care Committee of the University of Montreal (20-Rech-2089). Besides common herd characteristics, a detailed self-reported questionnaire regarding the current cleaning protocol of the feeding equipment was completed on each farm. This included the frequency of cleaning and replacing feeding equipment of preweaned calves, products and utensils used for cleaning and disinfecting and the temperature of the water. The questionnaire was initially tested on two dairy farms to ensure its applicability and understanding before being applied on all farms.

Feeding equipment that was available on the farm and used for sampling at the time of visit consisted of buckets, nipples, bottles, esophageal tube feeders (ET) and the tube of automatic milk feeders (AMF). Additionally, water (water ponds available to calves) and milk replacer (making a 1/10 dilution) available on the farm was sampled. Before sampling, a visual score from 1 to 4 indicating cleanliness was assigned to each equipment as previously described (Renaud et al., 2017; Chancy et al., submitted). No visual scoring was performed for the water or milk replacer. However, Brix measurements were taken from the undiluted milk replacer using a refractometer to compare with ATP luminometry. For buckets and nipples, both a direct and liquid sampling technique were used. In order for both sampling techniques not to interfere with each other, the 2 techniques were performed on the same kind of equipment (f.e. bucket), but on a different unit (using one bucket for the direct sampling technique and another bucket on the same farm for the liquid sampling technique). For bottles, ET and AMF we only sampled using the liquid technique for practical reasons. Both sampling techniques of the different feeding equipment were executed, as previously described (Renaud et al., 2017; Chancy et al., submitted). Briefly, direct sampling of the bucket was performed by swabbing one fourth of the internal bottom, the circular edge and 2 centimeters of the wall. For nipples, the whole inner surface was sampled by going back and forth

with a swab along the entire length of the teat. When using the liquid sampling technique, 15 mL of sterile 0.9% NaCl was injected into the equipment (being a tube, nipple or bottom of a bucket or bottle). The equipment was softly rotated for 5 seconds to ensure maximal contact with the surface and then the saline was transferred to a sterile container. Self-made videos explaining the different swabbing procedures for the direct and liquid method as for the different equipment can be viewed on YouTube following the QR code in Figure 1. Drinking water available in buckets and milk replacer were also transferred into a sterile container. Since ET and AMF can have various shapes and lengths, the obtained measurements for these tubes were standardized by the cylindrical volume sampled ($\pi * l * r^2$), where r is the radius and l the length, and reported for a tube of 100 cm of length and 0.5 cm radius (which is the dimension compatible with a relatively standard esophageal tube feeder).



Figure 1: QR code directing to YouTube links where home-made videos are available showing the sampling procedures for the different equipment and the direct and liquid method.

For each piece of equipment and technique used, two different swabs, namely the UltraSnap (Surface ATP test) and MicroSnap (Coliform test), were taken as per manufacturer's instructions (Hygiene, Camarillo, CA). UltraSnap measurements were available directly on the farm. For the MicroSnap, samples were transported for a maximum of 4 hours in a cooler between 4°C and 7°C

before further analysis in the laboratory where an additional incubation period of 6 hours at $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ was required before results were obtained. Product instructions are available at <https://www.hygiene.com/food-safety-solutions/atp-monitoring/> (Hygiene, 2022, ATP Monitoring, June 27th, 2022). All luminometry measurements were repeated twice with one Ensure luminometer (Hygiene, Camarillo, CA). All data collection was performed by the same trained operator. All measurements are shown in relative light units (RLU) per milliliter.

Bacteriological analysis was performed on the fluid retrieved from the liquid sampling technique of different feeding equipment at each farm. Additionally, microbiological analysis was conducted on a water sample and milk replacer sample from several farms. For this, samples were transported for a maximum of 4 hours between 4°C and 7°C and immediately frozen at a temperature of -20°C at arrival at the ambulatory clinic of the Faculty of Veterinary Medicine. All analyses were performed at the Lactanet laboratory (Sainte-Anne-de-Bellevue, Quebec, Canada) using the 3M Petrifilm according to the manufacturer instructions (3M Canada). Briefly, a dilution of 1:1000 of the liquid was made with Butterfield Phosphate buffer. This dilution factor was chosen based on previous research of benchmarks of contamination when milk or colostrum concentration exceeds 100,000 cfu/mL for total bacterial count and 10,000 cfu/mL for coliform count (McGuirk and Collins, 2004; Morill et al., 2010). One milliliter of this dilution was placed on 2 different Petrifilm, namely the aerobic colony count Petrifilm to obtain the total bacterial count (TBC) and the coliform count Petrifilm to obtain the total coliform count (TCC). After an incubation period at $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ for 48 h, the TBC could be determined by counting the red-colored colonies using a detection threshold of $> 1,000$ and $< 250,000$ CFU/mL. For the TCC, an incubation period of 24 h at $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ was conducted and the concentration was determined by counting all red and blue-colored colonies producing gas bubbles, using a detection threshold of $> 1,000$ and $< 150,000$ CFU/mL.

Statistical analysis

All data from the questionnaires and the samples were stored in an Excel file (Excel 2016, Microsoft Corp., Redmond, WA). Analyses were performed using the open-source R software v 4.2.1 (<https://www.r-project.org/>). Descriptive statistics were indicated for herd characteristics, available equipment, hygiene questionnaire answers, luminometer measurements, visual score, and bacteriological analysis. Swab RLU results were all obtained by taking the mean of the 2

consecutive measurements made. The RLU results were not normally distributed and therefore are presented as median and interquartile range. The RLU values were log transformed (using $\log_{10}(\text{RLU}+1)$). To compare different swabs, techniques and feeding equipment, a Kruskal-Wallis non-parametric analysis of variance (ANOVA) was used. Additionally, latter analysis was used to evaluate differences between visual scores and luminometry results. The Dunn test with Benjamini-Hochberg correction for multiple pairwise comparisons (> 2 categories tested) was applied. Because of our equipment sampling procedure on farm (i.e. one random equipment used per technique), the focus of this study was the sampling variation across farms rather than within farms. Nevertheless, the non-parametric Spearman correlation (Spearman rho (r_s)) was used to compare RLU measurements of the different feeding equipment within farms and to compare RLU measurements with bacteriological results. The following classification was applied: negligible (0-0.3), low (0.3-0.5), moderate (0.5-0.7), high (0.7-0.9) and very high (0.9-1.0), depending on the obtained r_s value (Hinkle et al., 2003). To obtain cut-off values with the corresponding sensitivity and specificity of the luminometer results for the different materials, the receiver operating characteristic (ROC) curve was obtained by automatically calculating the optimal combination of sensitivity and specificity with the 'roc' function of pROC package in R. For this, a bacteriological cut-off value of $\text{TBC} \geq 100,000 \text{ CFU/mL}$ and $\text{TBC} < 100,000 \text{ CFU/mL}$ were used.

Results

Cleaning protocol of feeding equipment for preweaned calves

The median number (range) of total animals in the herd, lactating cows, quota (the allowed amount of fat in kg per day) and annual calvings was 127.5 (50 to 800), 81 (40 to 415), 110 (48 to 500) and 105 (36 to 500), respectively. All herds were predominantly Holsteins herds except for one Jersey herd. Of the 50 farms visited, 47 had buckets, 45 farms used nipples, 39 farms had bottles and an ET and 15 had an AMF. Overall, 119 nipples, 93 buckets, 41 bottles, 39 ET and 15 AMF were sampled. The frequency of different reported cleaning procedures for the different equipments can be found in Table 1. In general, the farms showed substantial differences in cleaning procedures of the feeding equipment.

The majority of farms had 2 people involved in the cleaning process (32%), while 22%, 20%, 16% and 10% had 1, 3, 4 and 5 individuals involved, respectively. Half of the farms (51%) claimed that they unscrewed the nipples before cleaning. Different utensils were used for cleaning like a brush (68%), washcloth (2%), sponge (2%) or no utensil (28%). Very hot, hot, lukewarm and cold water was used for actual cleaning in 20%, 56%, 16% and 8% of the farms, respectively. No temperature was defined for these categories. The primary cleaning product used was dishwashing soap for 40% of the respondents, while various other soaps were used by others. Only 40% of the farms used disinfectant for cleaning the feeding equipment. The most popular product for disinfecting was sodium hypochloride (50.1%), followed by Pentapotassium bis(peroxymonosulphate) bis(sulphate), also known as Virkon (45.8%) and a combination of iodine with sodiumhypochloride (4.2%).

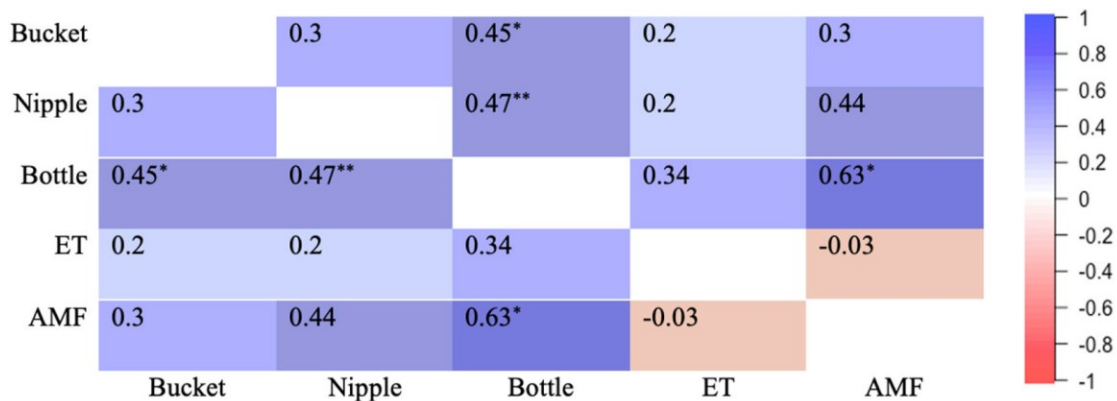
A large variation between farms was noticed for the time between feeding and cleaning the equipment, ranging from 3 to 4,320 minutes (72h) with a median time of 30 minutes. Regarding the rinsing process, only 10% of the farms used a utensil, which was a brush. The temperature of the rinsing water was very hot, hot, lukewarm and cold in 18%, 12%, 32% and 38% of the farms respectively. Of the 15 farms that used an AMF, 85.5% claimed to use automatic cleaning and 68.8% used manual cleaning, of which 22% had a protocol. Different brands of AMF were used, namely 26.7% Lely (Maassluis, The Netherlands), 13.3% Delaval (Tumba, Sweden), 6.7% GEA (Düsseldorf, Germany), 20% non-specified Foerster-technik (Engen, Germany), 13.4% Holm & Laue (Westerrönnfeld, Germany), 13.4% Urban (Wüstring, Germany) and 6.7% Taxi-lait (Westerrönnfeld, Germany).

ATP luminometry results

Overall RLU measurements for the different equipment, water, and milk replacer are displayed in table 2. Regarding the different swabs, higher RLU values were found for the UltraSnap compared to the MicroSnap ($P < 0.0001$) for all the equipment and both techniques. Additionally, the direct swabbing technique obtained higher RLU measurements compared to the liquid sampling technique ($P < 0.0001$) for buckets and nipples, both with the UltraSnap and MicroSnap. Although all feeding equipment showed contamination, buckets and AMF were more contaminated compared to bottles, nipples and ET using the UltraSnap and liquid technique (Figure 2). When the MicroSnap was used, buckets and AMF were more contaminated than ET ($P < 0.01$).

When examining the correlation of contamination between the different feeding equipment within a farm, a negligible to moderate correlation was found using the liquid technique (Figure 2). When the direct sampling technique was applied on buckets and nipples, a low correlation was noticed for the UltraSnap ($r_s = 0.486$, 95% CI: 0.202 – 0.695; $P = 0.002$) and a negligible correlation for the MicroSnap ($r_s = 0.266$, 95% CI: -0.080 – 0.554; $P = 0.129$). In other words, high contamination of one specific feeding equipment on a farm was not automatically correlated with a high contamination of other feeding equipment on that same farm. A negative correlation was observed between the luminometer results and Brix measurements for milk replacer using the UltraSnap ($r_s = -0.526$, 95% CI: -0.724 – -0.248; $P = 0.0007$) and the MicroSnap ($r_s = -0.405$, 95% CI: -0.641 – -0.098; $P = 0.012$).

UltraSnap



MicroSnap

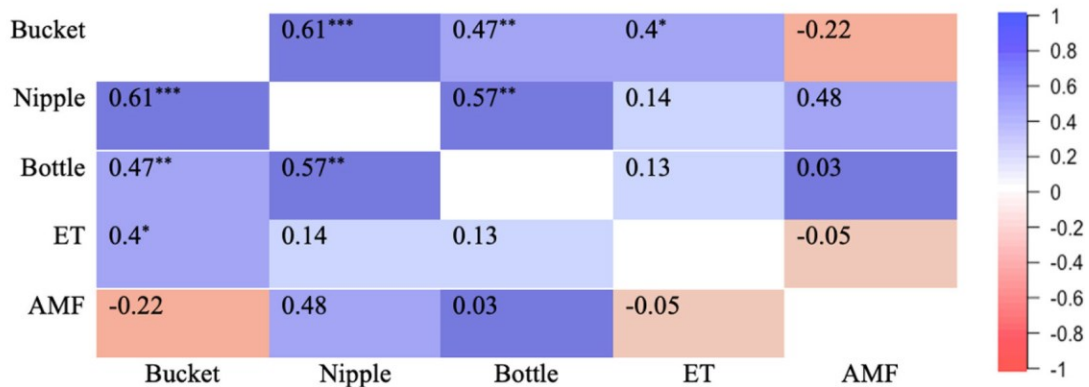


Figure 2: Correlation of RLU contamination of the different calf feeding equipment available within the farm using the liquid technique, separated by swab (UltraSnap vs MicroSnap). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. AMF: automatic milk feeder line, ET: esophageal tube, RLU: relative light units.

Association between luminometer results and the cleaning protocol

Statistical characteristics of the association between RLU measurements and the different cleaning protocols can be found in the Supplementary data. Both different cleaning protocols as the frequency of applying different cleaning protocols were examined, all separated per equipment, swab and technique. Higher RLU values were obtained when the cleaning process was performed with cold water in comparison with lukewarm, warm or very warm water ($P < 0.01$). Using a brush during the rinsing process resulted in lower RLU measurements ($P < 0.01$). Additionally, lower RLU measurements were obtained when 3 persons were involved in the cleaning process compared to 1 person ($P < 0.001$). Although some associations are statistically significant, no clear correlation could be made between ATP luminometry results and the different self-reported cleaning procedures.

Visual scoring

The most frequent visual score was 1 for all feeding equipment, with the exception of AMF where a visual score of 2 was mostly seen. A visual score of 4 was rarely given for equipment. When using the UltraSnap and the liquid technique, an association was found between the visual score and RLU measurements for buckets ($P = 0.017$), nipples ($P = 0.007$), bottles ($P = 0.013$) and ET ($P = 0.038$) (Figure 3). Additionally, an association was seen using the MicroSnap and liquid technique for bottles ($P = 0.03$) and for both swabs and the direct technique for buckets ($P = 0.007$). For the other techniques, swabs or materials, no clear correlation was seen. Regarding the variation of visual score within a farm, most farms had a small variation, meaning the same visual score for all feeding equipment (17 farms) or 2 different visual scores (21 farms). Nevertheless, 10 farms showed a variation of 3 different levels for the visual assessment and 2 farms obtained the widest variation possible (4 different levels).

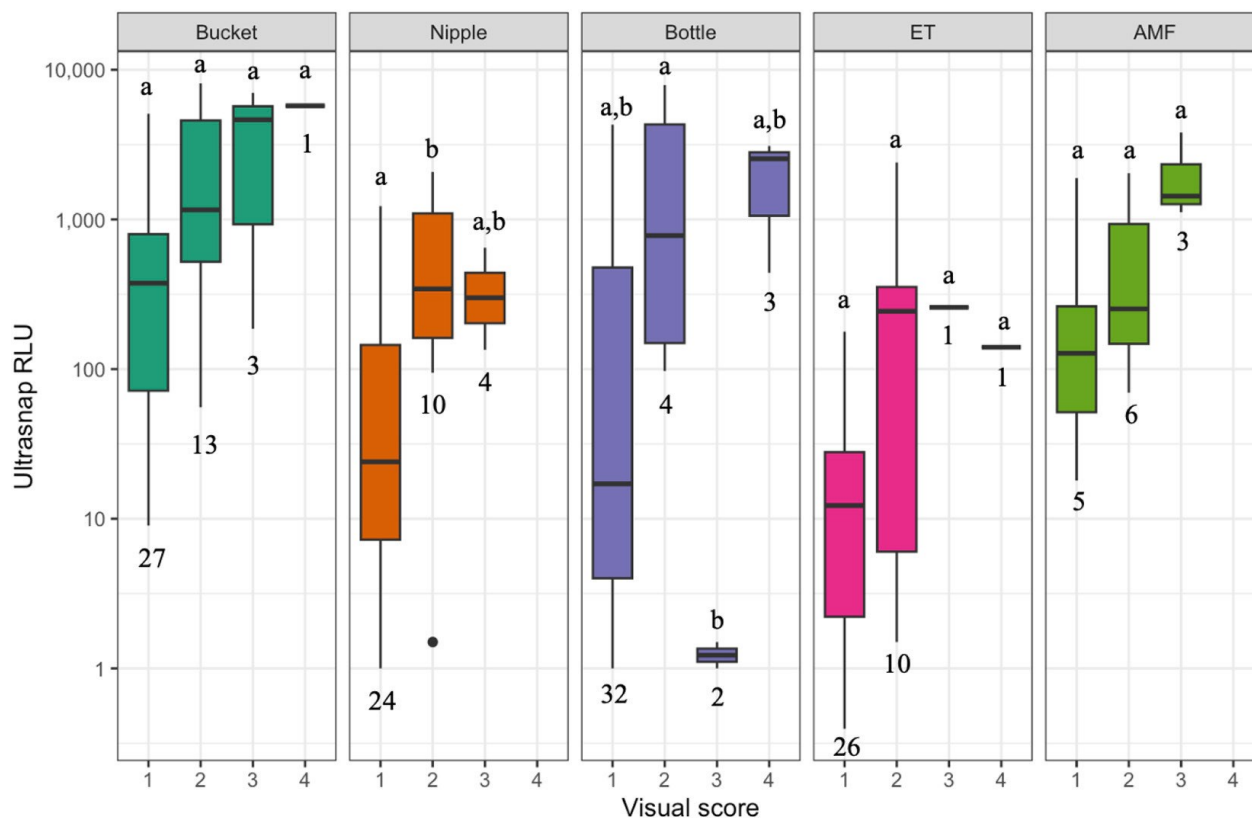


Figure 3: Association between the visual score and RLU measurements in relative light unit (RLU) for the different feeding equipment available on the dairy farms, using the UltraSnap and the liquid technique.

a,b,c = different letters indicate a significant difference ($P < 0.05$) according to the Dunn test with Benjamini-Hochberg correction for multiple pairwise comparisons. Overall statistical difference was calculated with Kruskal-Wallis non-parametric analysis of variance. AMF: automatic milk feeder line, ET: esophageal tube, RLU: relative light units.

Bacteriological analysis

Bacteriological examination was performed on the liquid obtained from 45 water samples, 44 milk replacer samples, 41 buckets, 40 nipples, 39 bottles and 15 AMF. The median (interquartile range) of TBC for water, milk replacer, buckets, nipples, bottles and AMF was 1,000 (999; 6,000), 93,000 (25,001; 149,500), 11,000 (1,000; 221,000), 4,000 (1,000; 35,250), 1,000 (1,000; 28,500) and 17,000 (2,000; 40,000), respectively. For the TCC, all samples were less than 1,000 except for one nipple sample with 6,000 and one bottle sample with 4,000. A small positive trend was noticed

between the TBC and RLU measurements using the UltraSnap (Figure 5), despite a low correlation for the UltraSnap ($r_s = 0.442$, 95% CI: 0.316 – 0.553; $P < 0.0001$) and a low correlation for the MicroSnap ($r_s = 0.366$, 95% CI: 0.231 – 0.487; $P < 0.0001$). The correlations between the luminometer measurements, visual score and bacteriological values per equipment are presented in Figure 4.

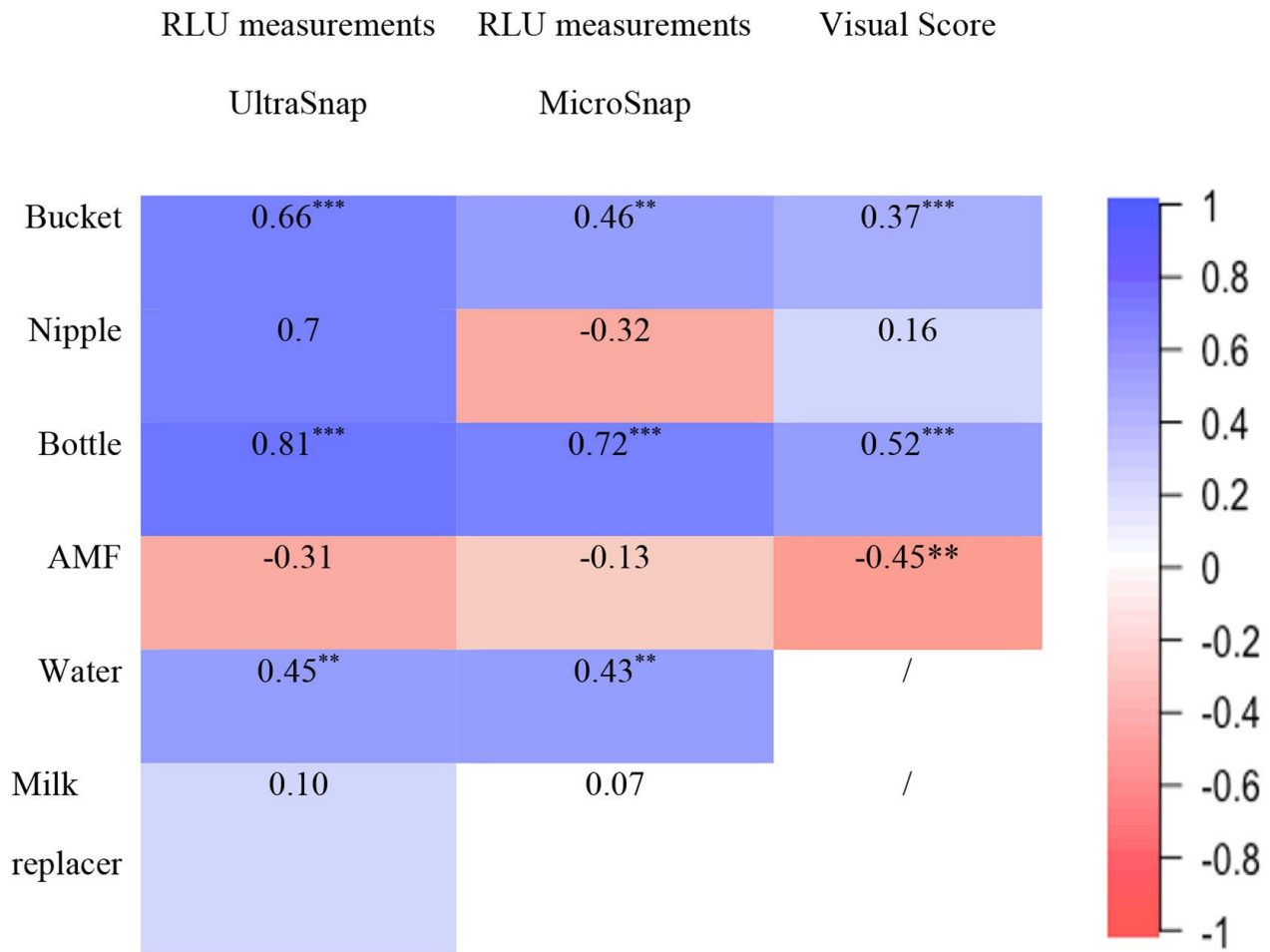


Figure 4: Correlation of RLU contamination using the liquid technique and visual score with bacteriological results of the different feeding equipment, water and milk replacer. AMF: automatic milk feeder line, RLU: relative light units * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Cut-off values for luminometer results based on bacteriological analysis

Based on the TBC, samples could be classified as ‘contaminated’ ($TBC \geq 100,000$ CFU/mL) or ‘not contaminated’ ($TBC < 100,000$ CFU/mL). The ratio contaminated/not

contaminated for bottles, water, AMF, milk replacer, buckets and nipples are 9/30, 3/43, 2/13, 17/27, 12/29 and 5/35, respectively. When comparing this with the RLU measurements, different cut-off values with corresponding sensitivity and specificity were obtained for the different feeding equipment, water, and milk replacer (Table 3). Additionally, the ROC curves of the different materials are displayed in Figure 7. A high area under the curve (AUC), sensitivity and specificity were obtained with the UltraSnap for buckets, bottles, water and nipples, although latter had few samples.

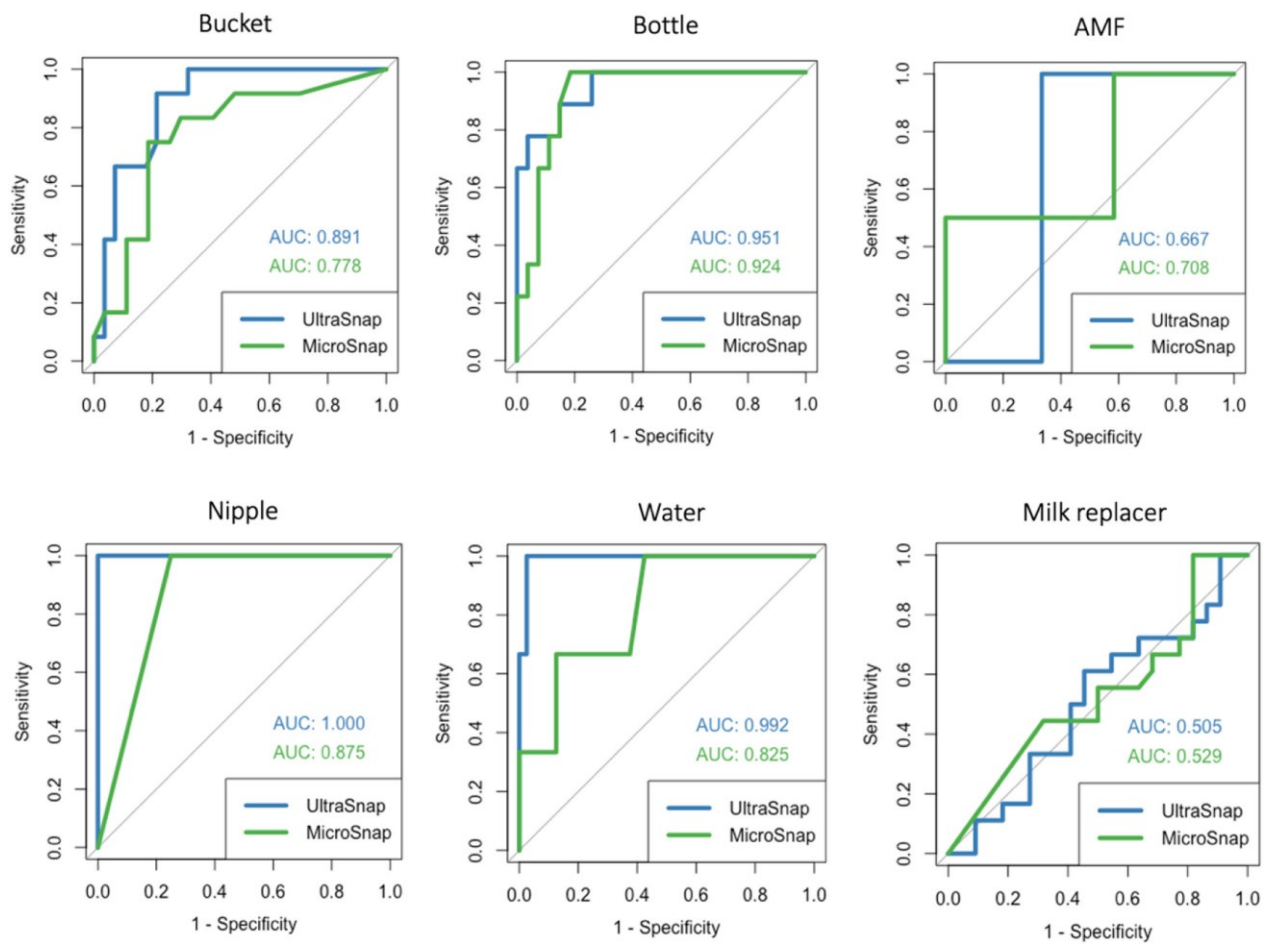


Figure 5: ROC curve of the RLU measurements based on the classification of ‘contaminated’ (TBC $\geq 100,000$ cfu/mL) or ‘not contaminated’ (TBC $< 100,000$ cfu/mL) for the different calf feeding materials obtained. AMF: automatic milk feeder line, RLU: relative light units. AUC: Area under the curve.

Discussion

This study described the self-reported cleaning protocols commonly used for preweaned calves on dairy farms in Quebec. Although scientific research supports the importance and relation of hygiene management practices with the overall health of preweaned calves (Bruning-Fann and Kaneene, 1992; Barrington et al., 2002; Godden, 2008; Aust et al., 2013, Barry et al., 2019), few practical guidelines are implemented. By describing these protocols, points of improvement can be identified and tackled. The standard operating procedures (SOP) for an adequate cleaning of feeding equipment after every use are as follows: 1) disassembly of the individual parts, 2) rinse with lukewarm water until visibly clean, 3) place in hot water with detergent, 4) scrub all surfaces (in and out) with a brush, 5) rinse with hot water containing acid sanitizer and 6) drain and air dry completely (Steward et al., 2005). Overall, a large variation in the self-reported cleaning protocols was seen between different farms. Although it is recommended to clean the feeding buckets after every use (Maunsell, Donovan, 2008), only 4.3% of the farms in this study reported doing it. This is in large contrast with previous studies in Germany (Heinemann et al., 2021), Ontario, Canada (Renaud et al., 2018), Sweden (Lundborg et al., 2005) and Austria, (Klein-Jöbstl et al., 2014), where 36%, 77%, 83.3% and 97% of the farms cleaned the buckets after every use, meaning twice a day, respectively. On the other hand, this study showed better results for the ideal water temperature for cleaning, the use of detergents and the disinfection rate (Klein-Jöbstl et al., 2014; Heinemann et al., 2021) and similar results for the percentage of farms who unscrew the nipples (Heinemann et al., 2021).

Higher RLU contamination was found for buckets and AMF compared to bottles, nipples and ET, which is in accordance with previous studies using the UltraSnap on different feeding material (Buczinski et al., 2022; Chancy et al., submitted). Additionally, higher RLU values were obtained for the UltraSnap compared to the MicroSnap, as stated before (Chancy et al., submitted).

Both the liquid, as well as the direct swabbing technique, have been used in previous studies to investigate the cleanliness of feeding equipment with ATP luminometry (Renaud et al., 2017; Buczinski et al., 2022; Chancy et al., submitted). However, this study is the first to examine both techniques on the same kind of equipment, showing higher RLU measurements for the direct swabbing technique compared to the liquid sampling technique for both buckets and nipples. It is possible that by expressing direct contact of the swab with the surface using the direct method,

more organic material can be collected compared to ‘rinsing’ the material with sterile fluid as obtained by the liquid method. In order for both sampling techniques not to interfere with each other, the 2 techniques were performed on the same kind of equipment (f.e. bucket), but on a different unit (using one bucket for the direct sampling technique and another bucket on the same farm for the liquid sampling technique). Also, higher RLU-values were obtained for the UltraSnap compared to the MicroSnap. This was expected since the MicroSnap only detects Coliform bacteria which is in contrast with the UltraSnap who detects all bacteria. Overall, a negligible to moderate correlation could be found between different feeding equipment within one farm. This could imply that no clear classification of ‘dirty’ and ‘clean’ farms can be made based on ATP luminometry performed in only one equipment in a particular farm. However, only a limited amount of equipment was used per farm since the focus of the study was sampling a large number of farms instead of a large number of equipment within a farm. Therefore, more research should be conducted to verify this observation.

A positive correlation was found between ATP luminometry and the visual score for buckets, nipples, bottles, and ET. In previous research (Heinemann et al., 2021), both the technique and swab used differed so no formal comparison can be made. However, a recent study showed similar results (Chancy et al., submitted). Although a visual score of 4 was not very common in this study, high RLU values were seen. An advantage of ATP luminometry is that contamination can be detected even when not visible with the eye, as demonstrated for bottles and buckets in this study. This shows that contamination can still be present when not visibly apparent, demonstrating the usefulness of ATP luminometry. Additionally, when using the direct swabbing technique, it can also help detect biofilms, a well-known problem on dairy farms endangering overall health (Latorre et al., 2022). A negligible to high correlation was found between bacteriological results and RLU measurements in this study, depending on the specific equipment and the swab used. Even negative correlations were seen, although very little samples were available to support this theory. These findings are supported by previous literature where the liquid technique is also used (Renaud et al., 2017; Chancy et al., submitted).

Overall, a lower correlation was found between the visual score and bacteriological results compared to RLU measurements and bacteriological results, questioning the diagnostic reliability of visual assessment (Renaud et al., 2017; Heinemann et al., 2021). Especially for AMF, where a

tube is used, a low correlation between the visual score and bacteriological analysis is seen. This can be explained by the fact that the transparency of the plastic decreases over time (Baltscheit et al., 2020), giving a false impression of being dirty and contaminated. Since there is a lot of controversy in the literature regarding the relationship between visual assessment – bacteriology – ATP luminometry, it is worth mentioning that each approach evaluates contamination from a different perspective. Whilst the visual score neglects the non-visual contamination, which is covered by bacteriological analysis, the latter does not include other sorts of contamination such as residues associated with inadequate cleaning of milk or milk replacer traces which is then covered by ATP luminometry. Therefore, it can seem erroneous to directly compare these different hygiene indicators and try to replace one by the other. They give complementary information about the different components of feed equipment cleanliness.

From a clinical standpoint, optimal cut-off values were obtained for the different feeding equipment sampled. Since almost all bacteriological samples had a TCC of <1,000 CFU/mL, only the TBC was used for analysis. A high area under the curve (AUC) was obtained for nipples, buckets, bottles and water. ATP luminometer thresholds have been obtained in previous studies for milking equipment (Vilar et al., 2008; Lindell et al., 2018). Also, a cut-off value has been established for feeding buckets, although different swabs were used (Heinemann et al., 2021). Another study determined cut-off values per swab by ROC analyses, but this was calculated for a combination of feeding equipment (Renaud et al., 2017), and therefore comparisons cannot be directly made. To our knowledge, this is the first study to determine optimal RLU cut-off values per feeding equipment of preweaned calves, making ATP luminometry a practical tool to quickly identify contamination. In addition to feeding equipment, RLU contamination and cut-off values were determined for water and milk replacer on the farm. When comparing the RLU measurements with bacteriological analysis, a low correlation was found for water, and a negligible correlation for milk replacer, although the latter had high TBC in this study. Previous studies show a high correlation for water (Deininger and Lee, 2001) and milk (Meighan, 2014). However, a different swab was used in this study (Deininger and Lee, 2001) and the composition of milk and milk replacer is not the same (Meighan, 2014). A negative correlation was found between RLU contamination and Brix refractometer measurements for the milk replacer. At first sight one would expect a positive correlation. However, since a Brix refractometer measures the total solids

concentration in milk replacer (Floren et al., 2016), and thus both techniques measure different substrates, no clear comparison can be made.

No clear correlation was made between specific cleaning protocols and luminometer results due to several limitations in this study. First, cleaning practices have been determined by self-reporting. Therefore, we could not verify if the process mentioned by the farmer was actually the same as what is currently employed at the farm. There can be discrepancies between both, and further research should be conducted to determine the compliance with the protocols. Second, a limited amount of feeding equipment was used within one farm. When sampling only a partial (even if randomly selected) amount of buckets for example, it can occur that only ‘dirty’ or ‘clean’ buckets were sampled, giving a discrepancy with the general cleaning protocol of that farm. Additionally, only one measurement in time was performed on the farms. It is unknown if these cleaning protocols changed over time, or if there was a possible influence of season. To obtain a general image of contamination on the farm, several measurements with ATP luminometry need to be performed, incorporating last cleaning dates. This is also supported by previous research (Lindell et al., 2018). Lastly, to get a clear understanding of the overall condition on the farm, the health of the calves is a very good and reliable indicator which is generally associated with various other hygiene indicators (Barry et al., 2019; Bonizzi et al., 2022). Further research should therefore be conducted including the health of the calves and using different sampling periods. This would improve the understanding between hygiene management, the overall health of calves and contamination of feeding equipment.

Conclusions

This study described the current self-reported cleaning protocols for preweaned calves on dairy farms in Quebec, Canada. A large variation in cleaning protocols was found, indicating opportunities for improvement. An overview and cut-off values of ATP contamination for feeding equipment based on a large number of farms was given. This can aid in benchmarking farms regarding their overall hygiene management, leading to customized advice and improvement. No clear correlation of contamination for different feeding equipment within farms was observed. This suggests that all kinds of feeding equipment should be sampled to obtain a general perspective of

the contamination level on the farm. No association between RLU contamination and the cleaning protocol was found, suggesting further research is needed.

Acknowledgments

The authors would like to thank all the participating dairy producers, the technical staff of the Bovine ambulatory clinic and the Lactanet laboratory. This study was financially supported by the Innov'Action Programme and the Québec Dairy Producers. The authors disclose any conflict of interest relative with the study.

References

Aust, V., Knappstein, K., Kunz, H.J., Kaspar, H., Wallmann, J., Kaske, M. 2013. Feeding untreated and pasteurized waste milk and bulk milk to calves: effects on calf performance, health status and antibiotic resistance of faecal bacteria. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 97:1091–1103. <https://doi.org/10.1111/jpn.12019>.

Bach, A. 2012. Ruminant Nutrition Symposium: Optimizing Performance of the Offspring: nourishing and managing the dam and postnatal calf for optimal lactation, reproduction, and immunity. *J. Anim. Sci.* 90: 1835-1845. <https://doi.org/10.2527/jas.2011-4516>.

Baltscheit, J., Schmidt, N., Schröder, F., Meyer, J. 2020. Investigations on the aging behavior of transparent bioplastics for optical applications. *InfoMat* 2: 424-433. <https://doi.org/10.1002/inf2.12065>

Barrington, G. M., Gay, J.M., Evermann, J.F. 2002. Biosecurity for neonatal gastrointestinal diseases. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 18:7–34. [https://doi.org/10.1016/s0749-0720\(02\)00005-1](https://doi.org/10.1016/s0749-0720(02)00005-1).

Barry, J., Bokkers, E.A.M., Berry, D.P., de Boer, I.J.M., McClure, J., Kennedy, E. 2019. Associations between colostrum management, passive immunity, calf-related hygiene practices,

and rates of mortality in preweaning dairy calves. *J. Dairy Sci.* 102:10266–10276. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16815>.

Bonizzi, S., Gislou, G., Brasca, M., Morandi, S., Sandrucci, A., Zucali, M. 2022. Air quality, management practices and calf health in Italian dairy cattle farms. *Animals (Basel)* 12:2286. <https://doi.org/10.3390/ani12172286>.

Bruning-Fann, C., Kaneene, J.B. 1992. Environmental and management risk factors associated with morbidity and mortality in perinatal and pre-weaning calves: a review from an epidemiological perspective. *Vet. Bull.* 62:399–413.

Buczinski, S., Morin, M.P., Roy, J.P., Rousseau, M., Villettaz-Robichaud, M., Dubuc, J. 2022. Use of ATP luminometry to assess the cleanliness of equipment used to collect and feed colostrum on dairy farms. *J. Dairy Sci.* 105:1638–1648. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-21023>.

Chancy, A., Santschi, D., Paquet, E., Renaud, D., Charbonneau, E., Steele, M., Van Driessche, L., Buczinski, S. Submitted for publication. Standardization and validation of ATP luminometry as a diagnostic tool to assess the cleanliness of feeding equipment in pre-weaning calves. *J. Dairy Sci.*

Corbitt, A.J., Bennion, N., Forsythe S.J. 2000. Adenylate kinase amplification of ATP bioluminescence for hygiene monitoring in the food and beverage industry. *Lett. In Appl. Microbiol.* 30: 443-447.

Deininger, R.A., Lee, J. 2001. Rapid determination of bacteria in drinking water using an ATP assay. *Field. Anal. Chem. Technol.* 5 : 185-189. <https://doi.org/10.1002/fact.1020>.

Fecteau, G., Baillargeon, P., Higgins, R., Paré, J., Fortin, M. 2002. Bacterial contamination of colostrum fed to newborn calves in Québec dairy herds. *Can. Vet. J.* 43: 523-527. PMID: 12125183.

Floren, H.K., Sicho, W.M., Crudo, C., Moore, D.A. 2016. Technical note: use of a digital and an optical Brix refractometer to estimate total solids in milk replacer solutions for calves. *J. Dairy Sci.* 99: 7517-7522. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10834>.

Gelsinger, S.L., Jones, C.M., Heinrichs, A.J. 2015. Effect of colostrum heat treatment and bacterial population on immunoglobulin G absorption and health of neonatal calves. *J. Dairy. Sci.* 98: 4640-4645. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8790>.

Godden, S. 2008. Colostrum management for dairy calves. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 24:19–39. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2007.10.005>.

Heinemann, C., Leubner, C.D., Hayer, J.J., Steinhoff-Wagner, J. 2021. Hygiene management in newborn individually housed dairy calves focusing on housing and feeding practices. *J. Anim. Sci.* 99. <https://doi.org/10.1093/jas/skaa391>.

Hinkle, D.E., Wiersma, W., Jurs, S.G. 2003. *Applied statistics for the behavioral sciences*. 5th ed. Boston: Houghton Mifflin.

Klein-Jöbstl, D., Iwersen, M., Drillich, M. 2014. Farm characteristics and calf management practices on dairy farms with and without diarrhea: a case-control study to investigate risk factors for calf diarrhea. *J. Dairy Sci.* 97:5110–5119. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7695>.

Latorre, A.A., Oliva, R., Pugin, J., Estay, A., Nualart, F., Salazar, K., Garrido, N., Muñoz, M. A., 2022. Biofilms in hoses utilized to divert colostrum and milk on dairy farms: A report exploring their potential role in herd health, milk quality, and public health. *Front. Vet. Sci.* 9: 969455. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.969455>.

Lindell, I. C., Lundh A., Sjaunja, K.S., Cederholm, M. 2018. Adenosine triphosphate bioluminescence for hygiene testing of rubber liners and tubes on dairy farms. *J. Dairy Sci.* 101:2438–2447. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13466>.

Lundborg, G. K., Svensson, E.C., Oltenacu, P.A. 2005. Herd-level risk factors for infectious diseases in Swedish dairy calves aged 0–90 days. *Prev. Vet. Med.* 68:123–143. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2004.11.014>.

Maunsell, F., Donovan, G.A. 2008. Biosecurity and risk management for dairy replacements. *Vet. Clin. North. Am. Food Anim. Pract.* 24:155-190. <https://doi.org/10.1016/j.cva.2007.10.007>.

McElroy, W.D., Deluca, M.A. 1983. Firefly and bacterial luminescence: basic science and applications. *J. Appl. Biochem.* 5:197–209. PMID: 6680120.

McGuirk, S.M., Collins, M. 2004. Managing the production, storage, and delivery of colostrum. *Vet. Clin. North. Am. Food. Anim. Pract.* 20:593-603. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2004.06.005>.

Meighan, P. 2014. Validation of the MicroSnap coliform and *E.coli* test system for enumeration and detection of coliforms and *E. coli* in a variety of foods. *J. AOAC Int.* 97:453-478. <https://doi.org.10.5740/jaoacint.13-361>

Morrill, K.M., Marston, S.P., Whitehouse, N.L., Van Amburgh, M.E., Schwab, C.G., Haines, D.M., Erickson, P.S. 2010. Anionic salts in the prepartum diet and addition of sodium bicarbonate to colostrum replacer, and their effects on immunoglobulin G absorption in the neonate. *J Dairy Sci.* 93:2067-75. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2622>.

Murray, C.F., Fick, L.J., Pajor, E.A., Barkema, H.W., Jelinski, M.D., Windeyer, M.C. 2016. Calf management practices and associations with herd-level morbidity and mortality on beef cow-calf operations. *Animal.* 10:468-477. <https://doi.org/10.1017/S1751731115002062>.

Renaud, D. L., Kelton, D.F., LeBlanc, S.J., Haley, D.B., Jalbert, A.B. and Duffield, T.F. 2017. Validation of commercial luminometry swabs for total bacteria and coliform counts in colostrum-feeding equipment. *J. Dairy Sci.* 100:9459–9465. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13228>.

Renaud, D. L., Kelton, D.F., LeBlanc, S.J., Haley, D.B., Duffield, T.F. 2018. Calf management risk factors on dairy farms associated with male calf mortality on veal calf farms. *J. Dairy Sci.* 101:1785–1794. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13578>.

Seung-Won, Y., Ara, C., Eunju, K., Sang-Ik, O., Jae, H. R., Young-Hun, J., Changyong, C., Jae, G. Y., Yoon, J. D. 2020. Evaluation of adenosine triphosphate testing for on-farm cleanliness monitoring compared to microbiological testing in an empty pig farrowing unit. *J. Anim. Sci. Technol.* 62: 682-691. <https://doi.org/10.5187/jast.2020.62.5.682>.

Stewart, S., Godden, S., Bey, R., Rapnicki, P., Fetrow, J., Farnsworth, R., Scanlon, M., Arnold, Y., Clow, L., Mueller, K., Ferrouillet, C. 2005. Preventing bacterial contamination and proliferation during the harvest, storage and feeding of fresh bovine colostrum. *J. Dairy. Sci.* 88: 2571-2578. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)72933-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72933-7).

Willis, C., Morley, R., Westbury, J., Greenwood, M., Pallett, A. 2007. Evaluation of ATP bioluminescence swabbing as a monitoring and training tool for effective hospital cleaning. *Br. J. Infect. Control.* 8: 17-21. <https://doi.org/10.1177/1469044607083604>.