

Université de Montréal

Impacts de l'utilisation de litière de fumier recyclé sur la santé des vaches laitières et la qualité  
du lait

*Par*

Annie Fréchette

Département de pathologie et microbiologie

Faculté de médecine vétérinaire

Thèse présentée à la Faculté de médecine vétérinaire  
en vue de l'obtention du grade de *Philosophiae Doctor* (Ph. D.)  
en sciences vétérinaires, option épidémiologie

Décembre 2022

© Annie Fréchette, 2022

Université de Montréal

Département de pathologie et microbiologie, Faculté de médecine vétérinaire

---

*Cette thèse intitulée*

**Impacts de l'utilisation de litière de fumier recyclé sur la santé des vaches laitières et la  
qualité du lait**

*Présentée par*

**Annie Fréchette**

*A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes*

**David Francoz**

Président-rapporteur

**Simon Dufour**

Directeur de recherche

**Gilles Fecteau**

Codirecteur

**Caroline Côté**

Codirectrice

**Marianne Villettaz Robichaud**

Membre du jury

**Véronique Ouellet**

Examinatrice externe

## Résumé

La litière de fumier recyclé (**LFR**) est utilisée dans les fermes laitières québécoises depuis quelques années, et ce, malgré le manque de connaissances scientifiques quant aux risques reliés à l'utilisation de ce produit pour la santé des animaux. Le premier objectif de cette thèse était de décrire les méthodes de production de LFR dans un contexte québécois et les pratiques de régie associées. Le deuxième objectif du projet consistait à déterminer le potentiel de recroissance de certaines espèces bactériennes dans la LFR lorsqu'elle est contaminée. Par la suite, le niveau de propreté et la prévalence de lésions aux jarrets chez les vaches laitières exposées ou non à ce produit ont été estimés. Finalement, l'association entre l'utilisation de LFR et l'incidence de mammite sous-clinique et clinique a été évaluée.

Des études observationnelles cohorte ou transversale (selon l'objectif de recherche) ont été réalisées en 2018-2019 sur 27 fermes utilisant de la LFR et 61 fermes utilisant de la litière de paille, à titre comparatif. Les visites de fermes ont permis de constater que les méthodes utilisées pour produire de la LFR n'étaient pas standardisées et qu'elles ne permettaient pas un réel compostage de la fraction solide du fumier. Les essais de recroissance ont permis de démontrer que les différentes LFR (traitée en tas, contenant fermé ou cuve rotative) ne réagissaient pas de la même façon à une inoculation par des coliformes. La LFR de cuve rotative contenait une plus faible concentration initiale de *Klebsiella* spp. et a montré une croissance bactérienne significative dans les premières 24 h post-inoculation. Les LFR conditionnées dans des tas ou contenants avaient quant à elles une concentration initiale importante de *Klebsiella* spp. et n'ont pas démontré de croissance bactérienne significative suivant leur inoculation, ce qui suggère un effet de saturation de croissance bactérienne. Au cours de l'étude transversale, 30 vaches par troupeau, en moyenne, ont été notées à l'aide d'un score de propreté sur trois zones du corps ainsi que d'un score sur l'état des jarrets, afin d'estimer leur propreté et la présence de lésions aux jarrets. Le score de propreté attribué à chaque zone du corps des vaches allait de 1 à 4, 1 étant très propre et 4 très sale. Nous avons observé que les vaches logées sur LFR avaient, en général, une meilleure propreté du pis et du bas des pattes que celles logées sur paille. La LFR avait un effet protecteur

pour le risque d'avoir un score de propreté du pis  $\geq 3$  (rapport de cotes (**RC**) : 0,43) ou d'avoir un score de 4 (RC : 0,29). Les vaches logées sur LFR avaient aussi le bas des membres plus propres que celles logées sur paille avec de plus faibles cotes d'avoir un score  $\geq 2$  (RC : 0,45), un score  $\geq 3$  (RC : 0,16) ou un score de 4 (RC : 0,07). Cependant, nous n'avons pas trouvé de différence entre les deux groupes d'animaux au niveau de la propreté du flanc et du haut des pattes. Lors de leur évaluation pour la propreté, les vaches ont aussi été notées à l'aide d'un score de lésions aux jarrets allant de 0 à 3. Un score de 0 représentait un jarret parfaitement sain alors qu'un score de 3 était attribué à un jarret présentant une enflure de plus de 2,5 cm. Les deux jarrets étaient évalués et le jarret ayant reçu le score le plus élevé était inclus dans les analyses. Nous n'avons pas identifié de différence quant aux scores de jarret entre les deux groupes d'animaux. Afin d'évaluer la santé de la glande mammaire, une étude cohorte d'une durée d'un an a été mise en place à partir de la visite de la ferme. Les dynamiques de comptages de cellules somatiques ont été suivies sur 11 031 vaches durant cette période afin d'analyser l'incidence de mammite sous-clinique. Nous n'avons pas été en mesure de détecter une différence d'incidence entre les deux groupes d'animaux. Au cours de l'étude cohorte, les producteurs laitiers ont identifié et fait parvenir au laboratoire 1 144 échantillons de lait provenant de vaches atteintes de mammites cliniques. L'incidence totale de mammite clinique n'était pas plus élevée dans les fermes LFR qu'au sein des fermes paille. Cependant, lorsque nous avons analysé l'incidence de mammite clinique par agent pathogène spécifique, nous avons pu constater que les vaches logées sur LFR étaient 7,0 fois plus à risque d'expérimenter une mammite clinique causée par *Klebsiella pneumoniae* que celles du groupe comparatif.

**Mots-clés** : vaches laitières, litière de fumier recyclé, croissance bactérienne, propreté, lésions aux jarrets, comptage de cellules somatiques, mammite sous-clinique, mammite clinique.

## Abstract

Recycled manure solids (**RMS**) bedding has been used on Quebec dairy farms for a number of years, despite the lack of scientific knowledge about the health risks associated with the use of this product for animals. The first objective of this thesis was to describe the RMS production methods in a Quebec context and the associated management practices. The second objective of the project was to determine the potential for regrowth of certain bacterial species in the RMS when it is contaminated. Subsequently, the level of cleanliness and prevalence of hock lesions in dairy cows exposed or not to this product were estimated. Finally, the association between RMS use and the incidence of subclinical and clinical mastitis was evaluated.

Observational cohort or cross-sectional studies (depending on the research objective) were conducted in 2018-2019 on 27 farms using RMS and 61 farms using straw bedding for comparison. The farm visits highlighted that the methods used to produce RMS were not standardized and did not allow for true composting of the manure solid fraction. The regrowth trials showed that different RMS (treated in heap, closed container or rotating drum) did not react in the same way to coliform inoculation. The rotating drum RMS contained a lower initial concentration of *Klebsiella* spp. and experienced significant bacterial growth in the first 24 hours post-inoculation. The heap or closed container RMS had a high initial concentration of *Klebsiella* spp. and did not show significant bacterial growth following inoculation, suggesting a saturation effect on bacterial growth. In the cross-sectional study, an average of 30 cows were measured using a cleanliness score on three body areas as well as a hock lesion score to estimate their cleanliness and the presence of hock lesions. The cleanliness score assigned to each area of the cows' body ranged from 1 to 4, with 1 being very clean and 4 being very dirty. We found that cows housed on RMS generally had better udder and lower leg cleanliness than those housed on straw. Recycled manure solids bedding had a protective effect for the risk of having an udder cleanliness score  $\geq 3$  (odds ratio (**OR**): 0,43) or having a score of 4 (OR: 0,29). Cows housed on RMS also had cleaner lower legs than those housed on straw with lower odds of having a score  $\geq 2$  (OR: 0,45), a score  $\geq 3$  (OR: 0,16) or a score of 4 (OR: 0,07). However, we found no difference between the two groups

of animals in flank and upper leg cleanliness. When they were evaluated for cleanliness, cows were also measured using a hock lesion score ranging from 0 to 3. A score of 0 represented a perfectly healthy hock, while a score of 3 was assigned to a hock with swelling greater than 2.5 cm. Both hocks were scored and the hock with the higher score was included in the analyses. We did not identify any difference regarding hock lesions between the two groups of animals. To assess mammary gland health, a one-year cohort study was set up from the farm visit. Somatic cell count dynamics were followed on 11 031 cows during this period to analyze the incidence of subclinical mastitis. We were not able to detect a difference in incidence between the two groups of animals. During the cohort study, dairy farmers identified and sent to the laboratory 1 144 milk samples from cows with clinical mastitis. The total incidence of clinical mastitis was not higher on RMS farms than on straw farms. However, when we analyzed the incidence of clinical mastitis by specific pathogen, we found that cows housed on RMS were 7.0 times more likely to experience clinical mastitis caused by *Klebsiella pneumoniae* than those in the comparison group.

**Keywords** : dairy cows, recycled manure solids (RMS) bedding, bacterial growth, cleanliness, hock lesions, somatic cell count, subclinical mastitis, clinical mastitis.

# Table des matières

Résumé.....	3
Abstract .....	5
Table des matières .....	7
Liste des tableaux.....	15
Liste des figures.....	18
Liste des sigles et abréviations.....	20
Remerciements .....	22
Avant-propos.....	23
1 Revue de littérature .....	25
1.1 Principes généraux du compostage .....	25
1.1.1 Digestion anaérobie .....	25
1.1.2 Le compostage .....	26
1.1.3 Facteurs importants pour la réussite du compostage .....	27
1.1.3.1 Oxygénation et aération .....	27
1.1.3.2 Température .....	27
1.1.3.3 Humidité.....	28
1.1.3.4 Propriétés physiques du substrat .....	28
1.1.3.5 Nutriments.....	29
1.1.3.6 pH.....	29
1.1.3.7 Temps.....	29
1.2 Adaptation des procédés de compostage pour créer de la litière de fumier recyclé ...	30
1.2.1 Digestion anaérobie .....	30

1.2.2	Compostage.....	31
1.2.2.1	La séparation.....	31
1.2.2.2	Le compostage.....	31
1.3	Caractéristiques bactériologiques des litières de fumier recyclé .....	33
1.3.1	Influence du processus de production des litières sur les populations d'agents pathogènes présents dans la LFR en pré- et post-utilisation.....	33
1.3.2	Propriétés bactériologiques pré-utilisation .....	36
1.3.4	Évolution bactériologique dans le temps.....	39
1.3.5	Propriétés bactériologiques post-utilisation.....	41
1.4	Caractéristiques physicochimiques des litières de fumier recyclé .....	44
1.4.1	Influence du processus de compostage sur les caractéristiques physicochimiques de la LFR en pré- et post-utilisation .....	44
1.4.2	Propriétés physicochimiques de la litière pré-utilisation .....	46
1.4.3	Propriétés physicochimiques de la litière post-utilisation.....	47
1.5	Gestion de la litière de fumier recyclé .....	49
1.5.1	Ajout de conditionneurs.....	49
1.5.2	Fréquence de nettoyage .....	50
1.6	Association entre la LFR et la santé des vaches laitières .....	52
1.6.1	Propreté .....	52
1.6.2	Lésions aux jarrets.....	53
1.6.3	Boiteries .....	54
1.6.4	Mammite sous-clinique.....	54
1.6.5	Mammite clinique .....	56
1.6.6	Production laitière.....	56



1.6.7	Autres risques potentiels pour la santé animale .....	57
1.6.8	Conclusions sur la santé des vaches laitières.....	58
1.7	Application dans le contexte québécois .....	59
1.8	Réglementation actuelle au Québec et à l'international.....	59
1.9	Conclusion .....	60
2	Objectifs et hypothèses.....	62
3	Description des fermes .....	64
3.1	Méthodologie.....	64
3.2	Résultats du recrutement .....	65
3.3	Analyses descriptives des fermes recrutées .....	66
3.3.1	Démographie des fermes.....	66
3.3.2	Équipement et méthodes utilisées par les fermes utilisant la LFR.....	67
3.3.2.1	Compostage en cuve rotative .....	68
3.3.2.2	Compostage en tas .....	68
3.3.2.3	Compostage en contenant fermé.....	69
3.3.2.4	Critères de qualité évalués .....	69
3.4	Régie de la litière.....	69
3.5	Liens entre les pratiques de gestion de la litière .....	70
4	Ability of recycled manure solids bedding to support growth of <i>Klebsiella pneumoniae</i> and <i>Escherichia coli</i> .....	73
4.1	Abstract .....	74
4.2	Introduction.....	75
4.3	Materials and methods .....	76
4.3.1	Bedding sample collection .....	76

4.3.2	Experimental setup .....	76
4.3.3	Inoculum preparation .....	79
4.3.4	RMS inoculation and incubation .....	79
4.3.5	Analytical procedures.....	79
4.3.6	Statistical analysis.....	80
4.4	Results .....	81
4.4.1	<i>Klebsiella pneumoniae</i> model .....	81
4.4.2	<i>Escherichia coli</i> model .....	83
4.5	Discussion .....	85
4.6	Conclusion .....	86
4.7	Data availability statement .....	87
4.8	Ethics statement.....	87
4.9	Author contributions.....	87
4.10	Funding.....	87
4.11	References.....	87
5	Impact of recycled manure solids bedding on hygiene and odds of hock lesions in dairy cows.....	89
5.1	Abstract .....	90
5.2	Introduction.....	91
5.3	Materials and methods .....	93
5.3.1	Herd recruitment.....	93
5.3.2	Data collection.....	94
5.3.3	Outcomes studied .....	95
5.3.4	Statistical analysis.....	95

5.4	Results .....	96
5.4.1	Description of herds .....	96
5.4.2	Data collection.....	99
5.4.3	Hygiene.....	99
5.4.3.1	Udder .....	99
5.4.3.2	Lower legs .....	100
5.4.3.3	Flank/upper legs .....	100
5.4.4	Hock lesions.....	104
5.5	Discussion.....	106
5.5.1	Study strengths and limitations .....	108
5.6	Conclusion .....	110
5.7	Data availability statement .....	110
5.8	Ethics statement.....	110
5.9	Author contributions.....	110
5.10	Funding.....	110
5.11	References.....	111
6	Association between recycled manure solids bedding and subclinical mastitis incidence: a Canadian cohort study .....	115
6.1	Abstract .....	116
6.2	Introduction.....	117
6.3	Materials and methods .....	118
6.3.1	Herd recruitment.....	118
6.3.2	Data collection.....	119
6.3.3	Outcomes studied .....	119

6.3.4	Statistical analysis.....	120
6.4	Results .....	121
6.4.1	Herds description .....	121
6.4.2	Data collection.....	123
6.4.3	Model 1: Impact of bedding type on the cow mean lactation LS.....	124
6.4.4	Model 2: Impact of bedding type on risk of a test with $LS \geq 4$ for a given cow.....	126
6.4.5	Model 3: Impact of bedding type on risk of acquisition of SCM.....	128
6.5	Discussion .....	130
6.6	Conclusion .....	132
6.7	Data availability statement .....	132
6.8	Ethics statement.....	132
6.9	Author contributions.....	132
6.10	Funding.....	132
6.11	Acknowledgements.....	133
6.12	References.....	133
7	Clinical mastitis incidence in dairy cows housed on recycled manure solids bedding: a Canadian cohort study .....	135
7.1	Abstract .....	136
7.2	Introduction.....	137
7.3	Materials and methods .....	138
7.3.1	Ethical statement .....	138
7.3.2	Herd recruitment.....	138
7.3.3	Sample Collection and bacteriological analyses .....	139
7.3.4	Statistical analyses .....	140

7.4	Results .....	142
7.4.1	Herds description .....	142
7.4.2	Milk samples.....	143
7.4.3	Effect of bedding on CM incidence .....	146
7.4.4	Sensitivity analysis.....	148
7.5	Discussion .....	148
7.6	Conclusion .....	152
7.7	Data availability statement .....	152
7.8	Ethics statement.....	152
7.9	Author contributions.....	152
7.10	Funding.....	152
7.11	Acknowledgments.....	153
7.12	Supplementary material.....	153
7.13	References.....	153
8	Discussion générale.....	156
9	Conclusion .....	165
	Références bibliographiques.....	167
	Annexes .....	170
	Annexe 1 : Certificat du comité d'éthique de l'utilisation des animaux de l'université de Montréal.....	170
	Annexe 2 : Questionnaire administré aux producteurs laitiers lors de la visite de ferme .....	171
	Annexe 3 : Présentation orales, affiches et activités de transfert de connaissances réalisées dans le cadre du projet .....	183
	Conférences, présentations orales et affiches.....	183

Activités de transfert de connaissances.....184

## Liste des tableaux

Tableau 1. – Comptages bactériens (en ln UFC/mL) de trois types de litière de fumier recyclé (LFR) en pré-utilisation. ....	34
Tableau 2. – Comptages bactériens (en ln UFC/mL) de trois types de litière de fumier recyclé (LFR) en post-utilisation. ....	35
Tableau 3. – Comptages bactériens ( $\log_{10}$ UFC/g) d’une litière de fumier recyclé avant et après son compostage. ....	36
Tableau 4. – Comptages bactériens (en ln UFC/mL) de différents types de litière avant leur utilisation de 70 troupeaux Canadiens. ....	37
Tableau 5. – Comptages bactériens (en $\log_{10}$ UFC/cm <sup>3</sup> ) en pré-utilisation de différents types de litière de 137 troupeaux Américains. ....	38
Tableau 6. – Comptages bactériens (en $\log_{10}$ UFC/g) de litières de fumier recyclé (LFR) verte ou compostée et évolution sur une période de 6 jours. ....	40
Tableau 7. – Comptages bactériens (en ln UFC/mL) de différents types de litière après leur utilisation de 70 troupeaux Canadiens. ....	42
Tableau 8. – Comptages bactériens (en $\log_{10}$ UFC/cm <sup>3</sup> ) en post-utilisation de différents types de litière de 137 troupeaux Américains. ....	43
Tableau 9. – Caractéristiques physicochimiques de trois types de litière de fumier recyclé (LFR) en pré-utilisation. ....	45
Tableau 10. – Caractéristiques physicochimiques de trois types de LFR en post-utilisation. ....	46
Tableau 11. – Caractéristiques physicochimiques en pré-utilisation de différents types de litière de 137 troupeaux Américains. ....	47
Tableau 12. – Caractéristiques physicochimiques en post-utilisation de différents types de litière de 137 troupeaux Américains. ....	48
Tableau 13. – Indicateurs de mammite sous-clinique de 137 troupeaux Américains. ....	55
Tableau 14. – Caractéristiques de production de 286 fermes du Wisconsin. ....	57
Tableau 15. – Description des 27 fermes sur litière de fumier recyclé (LFR) et 61 fermes sur litière de paille à l’étude. ....	66

Tableau 16. – Équipement utilisé par les fermes du projet. ....	68
Tableau 17. – Hock lesions score chart. ....	95
Tableau 18. – Percentage (number) of cow’s hygiene score by body region and bedding type obtained on 27 recycled manure solids bedded farms and 61 straw-bedded farms. ....	99
Tableau 19. – Udder hygiene odds ratio comparing cows housed on recycled manure solids bedding to straw-bedded cows, and estimated using continuation-ratio mixed model. ....	101
Tableau 20. – Lower legs hygiene odds ratio comparing cows housed on recycled manure solids bedding to straw-bedded cows, and estimated using continuation-ratio mixed model. ....	102
Tableau 21. – Flank/upper legs hygiene odds ratio comparing cows housed on recycled manure solids bedding to straw-bedded cows, and estimated using continuation-ratio mixed model. ....	103
Tableau 22. – Percentage (number) of cow’s hock lesion scores by bedding type on 27 recycled manure solids bedded farms and 61 straw-bedded farms. ....	104
Tableau 23. – Hock lesions odds ratio comparing cows housed on recycled manure solids bedding to straw-bedded cows, and estimated using continuation-ratio mixed model. ....	105
Tableau 24. – Description of the 20 recycled manure solids farms and 60 straw farms with SCC data included in the study on subclinical mastitis. ....	123
Tableau 25. – Impact of bedding on the cow’s mean lactation linear score estimated using a generalized linear mixed model using the data from 15,161 lactations of 11,031 cows from 20 recycled manure solids (RMS) farms and 60 straw-bedded farms. ....	125
Tableau 26. – Impact of bedding type on the risk of a DHI test with a linear score $\geq 4.0$ in 11,031 cows from 20 RMS farms and 60 straw-bedded farms and estimated using a generalized linear mixed model. ....	127
Tableau 27. – Risk of acquiring a new subclinical mastitis as function of bedding type estimated using a generalized linear mixed model applied to 43,546 pairs of DHI tests from 11,031 cows from 20 RMS farms and 60 straw-bedded farms. ....	129
Tableau 28. – Description of the 26 recycled manure solids farms and 60 straw farms. ....	143
Tableau 29. – Percentage (number) of clinical mastitis cases by bedding type, bacterial species, and severity among 1,144 clinical mastitis cases obtained on 26 farms using recycled manure solid (RMS) bedding and 60 farms using straw bedding. ....	145



Tableau 30. – Least square means clinical mastitis incidence estimates (in cases/100 cow-year) and incidence ratio (IR) between 26 RMS farms and 60 straw-bedded farms and computed using a binomial negative model. ....147

Tableau 31. – Variation of number of cows-year at risk in the two groups (26 RMS farms and 60 straw farms) when using different follow-up periods. ....148

## Liste des figures

Figure 1. – Biodigesteur de type continu. ....	30
Figure 2. – Séparateurs à pression à vis infinie (gauche) et à rouleaux doubles (droite).....	31
Figure 3. – Cuve rotative. ....	32
Figure 4. – Comparaison de la croissance de <i>Klebsiella pneumoniae</i> lorsqu'inoculée dans différents types de litière. <sup>a-d</sup> Différentes lettres indiquent une différence significative entre les litières à un temps donné ( $P < 0,05$ ). Figure de Godden et al. (12) reproduite avec autorisation.....	41
Figure 5. – Comptages ( $\log_{10}/\text{mL}$ ) des bactéries à Gram négatif totales (A), des coliformes (B), des <i>Klebsiella</i> spp. (C) et des <i>Streptococcus</i> spp. (D) dans la litière de fumier recyclé non-traitée, traitée avec de la chaux, un conditionneur alcalin ou un conditionneur acide aux jours 0, 1, 2 et 6 d'utilisation. Figure de Hogan et al (13) adaptée et reproduite avec autorisation. ....	50
Figure 6. – Comptage bactériens ( $\log_{10}$ UFC/g de matière sèche) des bactéries Gram négatives totales (A), des coliformes (B), des <i>Klebsiella</i> spp. (C) et des <i>Streptococcus</i> spp. (D) de litière de fumier recyclé remplacée quotidiennement (sur matelas; « mat ») ou en système de logettes profondes (« pack ») sur une période d'utilisation de 6 jours en stabulation libre. Les barres d'erreur représentent l'erreur-type. <sup>a-b</sup> Des lettres différentes indiquent une différence significative ( $P < 0,05$ ). Figure de Sorter et al (14) adaptée et reproduite avec autorisation. ....	51
Figure 7. – Configurations possibles d'équipement pour produire de la litière de fumier recyclé. Crédit Aida Minguez Menendez. Figure reproduite avec autorisation. ....	67
Figure 8. – Caractéristiques de production et de gestion de litière parmi les fermes à l'étude.....	71
Figure 9. – Experimental design for a study investigating growth of <i>E. coli</i> and of <i>K. pneumoniae</i> in bedding samples inoculated with 150 $\mu\text{l}$ of a solution containing <i>E. coli</i> and <i>K. pneumoniae</i> (to mimic contamination by cow's feces) or with 150 $\mu\text{l}$ of sterile water (as control). ....	77
Figure 10. – Estimated concentration (least square means estimates and 95% confidence intervals) of <i>Klebsiella pneumoniae</i> for different bedding types, over a 3-day period, and	

inoculated or not with *Klebsiella pneumoniae*. Results are presented both on a volumetric basis (in log<sub>10</sub> CFU/cm<sup>3</sup>; left figures) and on a dry mass-basis (in log<sub>10</sub> CFU/g; right figures). .....82

Figure 11. – Estimated concentration (least square means estimates and 95% confidence intervals) of *Escherichia coli* for different bedding types, over a 3-day period, and inoculated or not with *Escherichia coli*. Results are presented both on a volumetric basis (in log<sub>10</sub> CFU/cm<sup>3</sup>; left figures) and on a dry mass-basis (in log<sub>10</sub> CFU/g; right figures).....84

Figure 12. – Distribution of number of milking cows in the sampled herds as function of bedding type used (in the histogram, bins with equivalent number of milking cows in recycled manure solids vs. straw-bedded herds are presented next to each other to facilitate viewing)..98

Figure 13. – Description of the farms’ recycled manure solids (RMS) bedding production procedures and of somatic cell count (SCC) data availability. ....122

Figure 14. – Cow’s mean lactational linear score distributions by bedding type for 15,161 lactations of 11,031 cows from and 60 straw-bedded farms (top) and 20 RMS farms (bottom).....124

Figure 15. – Distributions of the cow’s proportion of milk tests with a linear score ≥ 4 by bedding type for 11,031 cows 60 straw-bedded farms (top) and from 20 recycled manure solid farms (bottom). ....126

Figure 16. – Distributions of number of newly acquired subclinical mastitis (defined as a linear score < 4.0 on first test followed by a linear score ≥ 4.0 on second test) for a given cow by bedding type in 43,546 pairs of DHI tests from 11,031 cows from 60 straw-bedded farms (top) and from 20 RMS farms (bottom). ....128

Figure 17. – Flow chart representing clinical mastitis samples submitted and retained in a study comparing clinical mastitis incidence in 26 farms using recycled manure solids bedding and 60 farms using straw bedding. ....144

Figure 18. – Clinical mastitis incidence distribution estimated using a period at risk extending from start to end of the study in a study comparing 26 farms using recycled manure solids bedding (blue) and 60 farms using straw bedding (red). ....146

## Liste des sigles et abréviations

CCS/SCC : comptage de cellules somatiques / somatic cell count

C:N : ratio carbone azote

DHI : Dairy herd improvement

DHIA: Dairy herd improvement association

DM : Dry matter

FMV : Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal

IIM/IMI : infection intra-mammaire / intra-mammary infections

IR : incidence ratio

IRDA : Institut de recherche et de développement en agroenvironnement / Research and Development Institute for the Agri-Environment

LFR/RMS : Litière de fumier recyclé / recycled manure solids

LSM : least square mean

MAP : *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*

MC/CM : mammite clinique / clinical mastitis

MSC/SCM : mammite sous-clinique / subclinical mastitis

NIIM : nouvelle infection intra-mammaire

RC/OR : rapport de cotes / odds ratio

RTM : ration totale mélangée

SL/LS : score linéaire / linear score

UFC/CFU : Unités formatrices de colonies / colony forming units

*Je dédie cette thèse à mes enfants qui m'aident à ne pas perdre de vue le plus important  
et font de chaque jour de ma vie une joyeuse aventure.*

## Remerciements

Je remercie chaleureusement mon directeur Dr Simon Dufour qui a su me guider et me soutenir tout au long de ce projet. Au fil des années, de directeur de programme tu es devenu mon mentor avec qui je peux réfléchir à voix haute à propos de n'importe quel sujet. Plus que cela, tu m'as soutenu et offert ton écoute à des moments plus difficiles de mon parcours. Merci aussi de m'avoir accordé de la latitude et de l'autonomie face au transfert de connaissances de mon projet. Ceci m'a permis de rester en contact avec les producteurs laitiers et intervenants du milieu et a contribué à me garder motivée au quotidien. Je remercie aussi mon co-directeur, Dr Gilles Fecteau qui a été présent tout au long du parcours pour partager avec moi ses connaissances et m'a toujours soutenu dans le travail de longue haleine qu'est la rédaction. Merci pour tes lectures minutieuses et commentaires constructifs qui ont grandement contribué à la qualité de mes écrits. Je remercie aussi ma codirectrice Mme Caroline Côté qui m'a ouvert les portes de son laboratoire et m'a introduit à la microbiologie environnementale, un domaine qui m'était totalement étranger. Je remercie les membres de mon comité conseil : Dr Sébastien Buczinski et Dre Manon Racicot qui ont supporté la réalisation de ce projet et ont aussi contribué à son succès par leurs précieux conseils. Je remercie aussi Marianne Villettaz Robichaud et Véronique Ouellet de me faire l'honneur d'être membres de mon jury de thèse.

Je remercie chaleureusement les producteurs laitiers et productrices laitières qui nous ont ouvert leurs portes et ont accepté avec enthousiasme de participer au projet de recherche. Merci à tous mes collègues de la Faculté de médecine vétérinaire. Nos rencontres de laboratoires m'ont permis de socialiser avec vous tous, de découvrir d'autres cultures et d'élargir mes horizons sur la santé animale dans le monde. Un merci spécial à Caroline Forest avec qui j'ai réalisé l'ensemble des visites de ferme. Merci pour les nombreuses heures passées à rigoler, à refaire le monde et évidemment, merci pour ton aide technique.

Ce projet a pu voir le jour grâce au soutien financier de plusieurs organismes. Merci à Novalait, au Consortium de recherche et innovations en bioprocédés industriels au Québec (#2015-044-C17), au Fonds Québécois de la recherche sur la nature et les technologies (#2017-LG-201835) et au Conseil de Recherches en Sciences Naturelles et en Génie du Canada (#CRDPJ 499421-2016). Je remercie également les organismes qui m'ont octroyé des bourses d'études. Merci au Conseil de Recherches en Sciences Naturelles et en Génie du Canada, les Études supérieures et postdoctorales de l'Université de Montréal (bourse de passage accéléré au doctorat), la Commission Canadienne du Lait, la fondation AGRIA et le regroupement Op+lait. Grâce à ces bourses, j'ai pu me dédier entièrement à mes études tout en subvenant aux besoins de ma famille. Merci pour votre générosité!

Mes derniers remerciements vont à ma famille et mes ami(e)s qui m'ont soutenu dans ce choix de retour aux études. Merci de m'avoir écouté parler de mes résultats et problèmes mathématiques même si le sujet de mes études vous semblait nébuleux et abstrait. Vous m'avez aidé à prendre cela un jour à la fois et à me changer les idées quand j'en avais besoin.

## Avant-propos

L'utilisation de litière de fumier recyclé (LFR) pour les vaches laitières est en progression au Québec depuis quelques années. Alors qu'elle est produite en revalorisant la fibre alimentaire non-digérée par les vaches, ce substrat produit à la ferme semble prometteur afin d'assurer aux entreprises laitières l'auto-suffisance et une constance d'approvisionnement en litière. Les producteurs laitiers et productrices laitières choisissent de se tourner vers de nouvelles avenues pour combler leurs besoins en litière puisque la disponibilité de certains produits plus conventionnels tels que les pailles de céréales s'avère incertaine et que leurs coûts sont en constante croissance au fil des années. Bien que la LFR soit utilisée depuis déjà plusieurs années aux États-Unis ainsi qu'en Europe, peu de médecine factuelle sur le sujet a été publiée. Les méthodes de préparation ainsi que les critères de qualité de la LFR reposent donc généralement sur des opinions ou expériences anecdotiques plutôt que sur des données probantes.

Les producteurs laitiers et productrices laitières qui ont investi dans l'achat d'équipements spécialisés et ont rencontré des problèmes de santé dans leurs troupeaux ont été les instigateurs de ce projet de recherche afin de mieux comprendre et baliser l'utilisation de cette litière. Ils ont rapporté à leurs médecins vétérinaires et à l'équipe de recherche que plusieurs de leurs animaux subissaient des épisodes de mammite clinique sévères causés par des *Klebsiella* spp. De plus, les intervenants du milieu ont exprimé plusieurs préoccupations quant à l'impact de l'utilisation de LFR sur la santé des animaux et sur la qualité du lait livré. D'abord, est-ce que les processus de traitement du fumier utilisés permettront d'éliminer les agents pathogènes pouvant compromettre la santé des animaux? Est-ce que le fait de soumettre un produit à un traitement thermique à répétition (c.-à-d., le processus exothermique dû à la fermentation bactérienne) favorisera l'établissement de population de microorganismes thermorésistants? Est-ce que la propreté des animaux logés sur un sous-produit de fumier sera satisfaisante? Quel sera le risque pour la santé de la glande mammaire? Les transformateurs laitiers pourraient être inquiets quant à d'éventuels changements dans le microbiote du lait de réservoir des fermes utilisant la LFR. De tels changements pourraient affecter la qualité du lait si, par exemple, la pasteurisation ne

parvenait plus à éliminer des populations microbiennes thermoduriques ou thermorésistantes. De plus, des changements dans le microbiote pourraient affecter les capacités fromagères du lait et donc limiter les différentes avenues de transformation.

C'est donc dans ce contexte de multiples questionnements et inquiétudes que ce projet de thèse a été élaboré avec pour objectif d'apporter un éclairage aux multiples zones d'ombres entourant cette pratique.



# 1 Revue de littérature

L'objectif de ce chapitre est de présenter les différentes méthodes de traitement du fumier utilisées pour produire de la litière de fumier recyclé et de synthétiser la littérature scientifique sur le sujet en lien avec la santé animale. Les études portant sur l'utilisation de litière de fumier recyclé sont rares et leur applicabilité en contexte de ferme laitière commerciale est parfois questionnable. Il importe de garder en tête qu'un résultat significatif d'un point de vue statistique peut n'avoir aucun impact d'un point de vue clinique. De plus, les études d'envergure comparant différents types de litières regroupent très souvent toutes les fermes utilisatrices de LFR en un seul groupe, rendant impossible l'analyse et la comparaison de l'impact des différents types de production sur les caractéristiques de la litière.

## 1.1 Principes généraux du compostage

Afin de mieux comprendre le processus de production de litière de fumier recyclé, il importe de bien connaître la théorie qui supporte la réalisation du compostage. On peut diviser les procédés de traitement en deux types : soit de façon anaérobique (biométhanisation) ou de façon aérobique (compostage). Lors de compostage, plusieurs procédés de traitement existent et peuvent être utilisés seuls ou conjointement.

### 1.1.1 Digestion anaérobie

La biométhanisation ou digestion anaérobie est un processus de dégradation de matière organique par l'action de microorganismes actifs en milieu anaérobique en biogaz, constitué principalement de méthane. Ce biogaz peut par la suite être traité et utilisé comme source d'énergie.

La biométhanisation du substrat peut être divisée en quatre étapes telles que décrites par le Centre de Recherche en Agriculture et Agroalimentaire du Québec (1). La première étape est l'hydrolyse du substrat par des enzymes qui y sont naturellement présents. Des molécules complexes comme les protéines, glucides et lipides sont transformées en acides aminés, sucres et gras. Par la suite, la fermentation de ces composés produit des alcools, des acides organiques,

du gaz carbonique ainsi que de l'hydrogène. L'acétogénèse permet ensuite de transformer ces molécules en précurseurs de méthane. Finalement, la méthanogénèse transforme les précurseurs de méthane en méthane. Le résultat de ces quatre étapes est un biogaz pouvant être purifié et servir de source d'énergie ainsi qu'un digestat riche en nutriments et pauvre en matière organique.

La digestion anaérobie peut être effectuée à différentes températures. Soit : psychrophile (15 à 25°C), mésophile (30 à 35°C) et thermophile (50 à 55°C). Lorsque des températures thermophiles sont utilisées, la durée du processus est plus courte. Cependant, si une digestion thermophile est choisie, une portion non-négligeable du biogaz produit pourrait devoir être utilisée pour assurer le maintien d'une température appropriée dans le biodigesteur.

### **1.1.2 Le compostage**

Comme discuté dans le manuel de Rynk et al. (2), le compostage est la décomposition de matière organique par des microorganismes naturellement présents dans le substrat sous des conditions contrôlées. Le procédé de compostage débute dès que le substrat est empilé. Presque immédiatement, les microorganismes commencent à consommer de la matière organique et de l'oxygène. La hausse de température qui survient dans le compost est un indicateur de cette activité microbienne intense et augmentera rapidement en début de procédé. Une température de 49-60°C est typiquement atteinte et perdurera plusieurs semaines. C'est ce qu'on appelle la phase thermophile. Au fur et à mesure que cette phase active de décomposition progresse, la phase mésophile s'installe et la température du substrat chute graduellement à 38°C et continue de descendre pour finalement atteindre la température ambiante. La troisième et dernière phase du compostage, dite la phase de maturation permet au substrat de lentement continuer à mûrir. Le niveau d'oxygène requis par les microorganismes est alors très faible, si bien que l'aération de la matière n'est plus requise. Un procédé de compostage n'a pas de fin précise, puisque le substrat continue d'évoluer aussi longtemps que des nutriments sont disponibles. Cependant, à ce stade, le compost est relativement stable, et sera prêt à être utilisé. Les critères qui déterminent si un compost est prêt à être utilisé varient selon sa fonction. Par exemple, pour un épandage au champ, un certain ratio carbone:azote (C:N) peut être requis afin de contrôler

les apports au sol en nutriments. Plusieurs éléments doivent être considérés lors de la mise en place d'un procédé de compostage.

### **1.1.3 Facteurs importants pour la réussite du compostage**

Plusieurs facteurs seront à considérer afin d'optimiser le processus de compostage, que ce soit afin de maintenir des conditions aérobiques ou pour que le procédé soit complété en une durée raisonnable selon les attentes des instigateurs, par exemple.

#### **1.1.3.1 Oxygénation et aération**

Durant les premiers jours du procédé de compostage, les composantes du substrat facilement dégradables seront rapidement métabolisées, entraînant une consommation d'oxygène et un dégagement de chaleur important. Alors que la quantité d'oxygène diminue rapidement, le processus de décomposition sera grandement ralenti, voire même arrêté si aucune aération n'est apportée au substrat (échange d'air passif ou échange actif avec ventilateur). Une concentration d'oxygène minimale de 5% est requise au niveau de la surface poreuse des fibres du substrat. En plus de fournir de l'oxygène, l'aération permet d'évacuer la chaleur, la vapeur d'eau et les gaz, comme le dioxyde de carbone par exemple. La fréquence d'aération du substrat devrait être dictée par le besoin d'évacuer la chaleur du substrat, qui est en fait plus grand que le niveau d'oxygénation requis. L'agitation mécanique ou le retournement du substrat ne fournissent qu'une quantité limitée d'oxygène qui sera très rapidement consommée par les microorganismes. Par contre, retourner le substrat permettra d'améliorer son aération et sa porosité, un élément qui sera discuté plus loin.

#### **1.1.3.2 Température**

L'activité microbienne durant le compostage produit une grande quantité de chaleur qui s'accumule dans le substrat. Lorsque la température du substrat dépasse 60°C, les microorganismes peuvent commencer à en souffrir et le processus de décomposition ralentit. Si la température, due à l'activité microbienne en cours et aux caractéristiques isolantes de la matière, continue de monter et dépasse 71°C, une bonne proportion des microorganismes entre en dormance ou meurt. Le processus de compostage s'arrête ou ralentit jusqu'à ce que la population de microorganismes restante se rétablisse. Afin de prévenir cette situation

regrettable, lorsque la température du substrat approche de 60°C un échange d'air actif ou le retournement de la pile de compost devrait être fait. Si la température a atteint 71°C et que la mort de microorganismes est soupçonnée, le processus de compostage peut être relancé en mélangeant la pile avec du matériel provenant d'une autre pile de compost, si possible. L'évacuation de chaleur se fait principalement par l'évaporation de l'eau de la matière. Par conséquent, un certain niveau d'humidité est requis afin d'éviter de hautes températures qui pourraient mener à un embrasement spontané. Le substrat devrait donc avoir un taux d'humidité d'au moins 40% afin de diminuer ce risque.

#### 1.1.3.3 Humidité

L'eau est requise pour les réactions chimiques, le transport des nutriments et le mouvement des microorganismes. Lorsque le substrat contient moins de 40% d'humidité, l'activité microbienne est au ralenti. D'un autre côté, lorsque le niveau d'humidité dépasse 65%, l'eau limite le mouvement d'air et peut mener à des conditions anaérobiques. Comme l'humidité va généralement diminuer au fil du processus, le taux initial du substrat devrait être bien supérieur à 40%. Ces seuils d'humidité sont généraux et peuvent varier selon la porosité et les capacités d'absorption du substrat à composter. Des matériaux très poreux ou très absorbants devraient être plus humides afin de favoriser un compostage rapide.

#### 1.1.3.4 Propriétés physiques du substrat

La porosité, la structure et la texture du substrat affectent le compostage par leur influence sur l'aération. La porosité est une mesure de l'espace occupée par l'air dans la masse de substrat. Elle est déterminée par la grosseur des particules et leur granulométrie. Des particules grosses et uniformes augmentent la porosité. La structure réfère quant à elle à la rigidité des particules et à leur habilité à résister à la compaction. Finalement, la texture caractérise la surface disponible du substrat pour l'activité microbienne. En effet, la majeure partie de la décomposition aérobique se produit sur la surface des particules. La surface disponible augmente lorsque les particules sont plus petites, alors que de plus petites particules réduisent la porosité. Une grosseur de particule de 0,3 à 5 cm devrait être visée.

#### 1.1.3.5 Nutriments

Les nutriments requis par les microorganismes responsables du compostage sont le carbone, l'azote, le phosphore et le potassium. Les microorganismes utilisent le carbone pour l'énergie et la croissance alors que l'azote est essentiel pour leur synthèse protéique et leur réplication. Le ratio C:N optimal pour répondre à ces besoins est de 25:1. Lorsque ce ratio est respecté, les autres nutriments nécessaires aux microorganismes le sont aussi, de façon indirecte. Des procédés de compostage peuvent donner des résultats satisfaisants avec des ratios variant de 20:1 à 40:1. Le fumier des vaches laitières possède un ratio C:N qui varie de 13:1 à 18:1 (3).

Il est aussi important de noter que la vitesse de dégradation des composés de carbone varie selon la source du substrat. Si le composé est lié par de la cellulose, comme dans la paille, il se dégradera plus vite qu'un composé lié par de la lignine, comme dans le bois.

#### 1.1.3.6 pH

Le procédé de compostage est relativement robuste aux variations de pH. Bien que les valeurs optimales s'étendent de 6,5 à 8,0, un compostage pourrait tout de même être réalisable à des niveaux de pH allant de 5,5 à 9,0. Le pH du substrat peut varier pendant le processus, évoluant avec la décomposition. Par exemple, une diminution de pH pourrait survenir en début de processus avec un relâchement d'acides organiques. Lorsque le compost est mature, le pH se stabilise près de la neutralité.

#### 1.1.3.7 Temps

Le temps requis pour réaliser le compostage sera directement lié aux facteurs cités précédemment comme les nutriments, l'humidité, la température, l'aération, etc. En général, la durée du processus varie de quelques semaines à plus de deux mois.

Plusieurs facteurs doivent donc être considérés lors de la production de compost, et ces facteurs varient selon le substrat utilisé et l'utilisation qui en sera faite. Bien qu'un procédé de compostage puisse sembler simple de prime abord, il s'agit en fait d'une succession de facteurs à évaluer et à

suivre pour assurer la réussite de la procédure. De plus, il est important de noter qu'il s'agit d'un processus long, qui prend plusieurs semaines à se réaliser.

## **1.2 Adaptation des procédés de compostage pour créer de la litière de fumier recyclé**

Alors que les principes théoriques du compostage demeurent les mêmes, certaines adaptations spécifiques à la création de litière de fumier recyclé ont été mises en place par les utilisateurs.

### **1.2.1 Digestion anaérobie**

Les biodigesteurs peuvent être divisés en deux grandes catégories selon ce qu'ils opèrent en continu (« plug and flow ») ou en discontinu (« batch »). Un biodigesteur en continu peut recevoir à tout moment du fumier qui sera incorporé dans le mélange de substrat en cours de transformation. Pour un système en discontinu, des installations appropriées doivent être prévues pour contenir le fumier produit par le troupeau lors du cycle du biodigesteur.



Figure 1. – Biodigesteur de type continu.

À la suite de la biodigestion qui s'étale sur plusieurs semaines (durée variable selon la température de fonctionnement), le digestat devra ensuite être soumis à une étape de séparation afin d'en extraire la phase liquide. La phase solide peut ensuite être utilisée directement sous les animaux.

## 1.2.2 Compostage

La première étape du compostage du fumier consiste à extraire la fraction liquide du fumier qui sera déviée vers la fosse à lisier alors que la fraction solide sera récupérée pour produire la LFR. Par la suite, le compostage de la fraction solide pourra être réalisé.

### 1.2.2.1 La séparation

Plusieurs types de séparateurs ont été développés afin d'extraire la fraction liquide du fumier. Les séparateurs à pression (vis infinie ou rouleaux) sont les plus fréquemment utilisés en production laitière au Canada, mais des séparateurs centrifuges ou à tamis sont aussi disponibles sur le marché (4). La popularité des séparateurs à pression s'explique par leur plus grande efficacité de traitement de fumier, leur coût (75 000\$ CA vs. 145 000\$ CA pour un séparateur centrifuge) et leur consommation énergétique (5).

Peu importe l'équipement utilisé pour séparer les phases solides et liquides du fumier, la séparation n'a pas d'impact majeur sur la composition chimique et bactériologique de la LFR (5, 6).



Figure 2. – Séparateurs à pression à vis infinie (gauche) et à rouleaux doubles (droite).

### 1.2.2.2 Le compostage

Il existe plusieurs façons d'empiler et d'aérer la phase solide afin d'effectuer le compostage. D'abord, la phase solide peut être disposée en andain ou en tas qui sera aéré par : retournement mécanique, par aération active (ex. : ventilateurs connectés à des tuyaux circulant sous les andains) ou par aération passive (ex. : tuyaux circulant sous les andains où l'air circule librement).

Une autre façon de faire est de n'apporter aucune aération à l'andain ou au tas durant le procédé. Cette manière de faire, cependant, ne permettra pas un réel compostage. On pourrait plutôt parler, dans ce cas, d'un simple « traitement post-séparation ». Sinon, la phase solide pourrait être compostée dans une boîte fermée (ex. : cellules de béton, dans ce cas, un compostage est difficilement atteignable) ou dans une cuve rotative. La cuve rotative est un équipement automatisé de forme cylindrique qui tourne à une fréquence établie pour favoriser l'aération du substrat ainsi que l'homogénéité de la substance. La durée du processus est de 2 à 3 jours lorsque la température est fixée à 70°C (7).



Figure 3. – Cuve rotative.

Finalement, la phase solide du fumier pourrait ne pas être soumise à un traitement post-séparation et être utilisée sous les animaux directement après la phase de séparation des solides et liquides. Cette litière est décrite dans la littérature scientifique sous les termes « raw bedding » ou « green bedding » que l'on pourrait traduire par LFR verte.

Alors que les critères d'importance pour réussir un compostage domestique ont été établis et discutés précédemment, ils n'ont pas fait l'objet d'études spécifiques au cas du fumier des vaches laitières. Plusieurs zones d'ombres persistent quant aux méthodes réellement utilisées par les



producteurs laitiers et quels outils sont utilisés pour suivre l'évolution du compostage. Finalement, la durée des procédés de compostage est elle aussi inconnue.

### **1.3 Caractéristiques bactériologiques des litières de fumier recyclé**

Il est important de noter que tous les chercheurs n'utilisent pas les mêmes unités de mesure pour rapporter les concentrations bactériennes. Les chercheurs utilisent une transformation logarithmique pour rapporter les comptages bactériens, mais certains utilisent le logarithme naturel alors que d'autres utilisent plutôt un logarithme en base 10. L'attention du lecteur doit donc être portée sur ce point lors de la comparaison de plusieurs travaux. Enfin, les comptages bactériens sont parfois rapportés par gramme, millilitre ou même par unité volumique (cm<sup>3</sup>) de litière.

#### **1.3.1 Influence du processus de production des litières sur les populations d'agents pathogènes présents dans la LFR en pré- et post-utilisation**

Quelques études ont permis de démontrer que la concentration d'agents pathogènes retrouvée dans la LFR après la période de compostage/maturation n'était pas équivalente selon la méthode de production choisie. Dans une étude menée en 2009 sur 38 fermes américaines, Husfeldt et al. (8) ont comparé trois méthodes de conditionnement de la phase solide soit la biométhanisation (suivie d'une séparation), l'utilisation d'une cuve rotative ou l'utilisation d'une LFR verte. En pré-utilisation, la LFR verte contenait une plus grande concentration bactérienne de *Bacillus* spp., de coliformes et de streptocoques environnementaux que la LFR biométhanisée ou réalisée à l'aide d'une cuve rotative (**Tableau 1**). Le comptage de *Staphylococcus* spp. n'était pas différent entre les trois procédés. De plus, aucun coliforme n'a été détecté dans la litière compostée par cuve rotative. Finalement, la LFR verte contenait une plus grande quantité de bactéries totales que la LFR biométhanisée ou provenant de cuve rotative.

Tableau 1. – Comptages bactériens (en ln UFC/mL) de trois types de litière de fumier recyclé (LFR) en pré-utilisation.

	Type de LFR					
	Biométhanisée (25 échantillons)		Cuve rotative (4 échantillons)		Verte (9 échantillons)	
	Comptage bactérien*	Erreur type	Comptage bactérien	Erreur type	Comptage bactérien	Erreur type
Agents pathogènes						
<i>Bacillus</i> spp.	10,62 <sup>a</sup>	0,65	8,99 <sup>a</sup>	1,60	14,96 <sup>b</sup>	1,06
Coliformes	4,02 <sup>a</sup>	0,42	0,00 <sup>b</sup>	1,04	9,37 <sup>c</sup>	0,69
Streptocoques environnementaux	9,42 <sup>a</sup>	0,75	9,21 <sup>a</sup>	1,83	14,81 <sup>b</sup>	1,22
<i>Staphylococcus</i> spp.	3,37	0,97	2,36	2,37	7,01	1,58
Total	12,00 <sup>a</sup>	0,46	11,96 <sup>a</sup>	1,13	15,70 <sup>b</sup>	0,75

Tableau traduit de Husfeldt et al. (8). Les moyennes dans une rangée avec différentes lettres diffèrent significativement ( $P < 0,05$ ).

\*ln UFC/mL.

Ces chercheurs ont également observé que les concentrations bactériennes des litières post-utilisation étaient plus similaires qu'en pré-utilisation (**Tableau 2**). Cependant, le comptage bactérien total était significativement plus bas dans la litière biométhanisée, même en fin de cycle d'utilisation.

Tableau 2. – Comptages bactériens (en ln UFC/mL) de trois types de litière de fumier recyclé (LFR) en post-utilisation.

	Type de LFR					
	Biométhanisée (199 échantillons)		Cuve rotative (38 échantillons)		Verte (71 échantillons)	
	Comptage bactérien*	Erreur type	Comptage bactérien	Erreur type	Comptage bactérien	Erreur type
Agents pathogènes						
<i>Bacillus</i> spp.	14,13 <sup>a</sup>	0,17	14,66 <sup>ab</sup>	0,34	14,86 <sup>b</sup>	0,31
Coliformes	10,77	0,16	10,62	0,32	11,21	0,29
Streptocoques environnementaux	14,14 <sup>a</sup>	0,11	15,54 <sup>b</sup>	0,24	15,19 <sup>b</sup>	0,18
<i>Staphylococcus</i> spp.	12,06	0,27	13,23	0,65	11,71	0,52
Total	15,55 <sup>a</sup>	0,33	17,01 <sup>b</sup>	0,49	16,50 <sup>b</sup>	0,33

Tableau traduit de Husfeldt et al. (8). Les moyennes dans une rangée avec différentes lettres diffèrent significativement ( $P < 0,05$ ).

\*ln UFC/mL.

Dans une étude en chassé-croisé réalisée sur une ferme expérimentale en 2014, Cole et Hogan (9) ont comparé les comptages bactériens d'une LFR fraîchement séparée (verte) à ceux d'une LFR compostée en andains pendant 4 semaines. Ils ont observé que le compostage entraînait une diminution significative des comptes de coliformes, streptocoques et bactéries Gram négatif (**Tableau 3**). Par contre, aucun changement dans les comptages de *Klebsiella* spp. n'a été noté.

Tableau 3. – Comptages bactériens ( $\log_{10}$  UFC/g) d’une litière de fumier recyclé avant et après son compostage.

Agents pathogènes	Type de LFR			
	Verte (4 échantillons)		Compostée (andain) (4 échantillons)	
	Comptage bactérien*	Erreur type	Comptage bactérien	Erreur type
Bactéries à Gram négatif	7,62 <sup>a</sup>	0,14	5,13 <sup>b</sup>	0,30
Coliformes	3,81 <sup>a</sup>	0,17	3,16 <sup>b</sup>	0,20
<i>Klebsiella</i> spp.	3,12	0,18	3,04	0,09
<i>Streptococcus</i> spp.	4,31 <sup>a</sup>	0,28	3,39 <sup>b</sup>	0,33

Tableau traduit de Cole et Hogan (9). Les moyennes dans une rangée avec différentes lettres diffèrent significativement ( $P < 0,05$ ).

\* $\log_{10}$  UFC/g.

### 1.3.2 Propriétés bactériologiques pré-utilisation

Afin de mieux caractériser la LFR, des études ont été menées afin de comparer la concentration de différents agents pathogènes nuisibles pour la santé de la glande mammaire d’un type de litière à un autre. Robles et al (10) ont mené une étude en Ontario (Canada) où ils ont visité 70 fermes à 3 reprises (2014-2015) afin de prélever des échantillons de litière propre et souillée. Ils ont ainsi comparé la LFR (produite par compostage ou biométhanisation; rapportée sans distinction) au sable, aux produits de bois (sciure et copeaux) ainsi qu’à la paille. Ils ont déterminé que la LFR contenait plus de *Streptococcus* spp. que les autres types de litière (**Tableau 4**). Cependant, c’était la paille qui contenait le plus de bactéries à Gram négatif, suivie par la LFR, les produits de bois et le sable. Finalement, la concentration en *Klebsiella* spp. était nettement plus élevée dans la paille que dans tout autre type de litière.

Tableau 4. – Comptages bactériens (en ln UFC/mL) de différents types de litière avant leur utilisation de 70 troupeaux Canadiens.

	Litière de fumier recyclé (n=8)		Sable (n=12)		Produits de bois (n=17)		Paille (n=33)	
Agents pathogènes	Comptage bactérien*	Erreur type	Comptage bactérien	Erreur type	Comptage bactérien	Erreur type	Comptage bactérien	Erreur type
<i>Streptococcus</i> spp.	4,8 <sup>a</sup>	1,17	1,3 <sup>b</sup>	0,96	1,8 <sup>b</sup>	0,81	2,5 <sup>b</sup>	0,57
Bactéries à Gram négatif	9,0 <sup>b</sup>	1,09	2,5 <sup>c</sup>	0,90	5,0 <sup>c</sup>	0,76	12,9 <sup>a</sup>	0,53
<i>Klebsiella</i> spp.	3,7 <sup>b</sup>	1,24	2,6 <sup>b</sup>	1,04	4,3 <sup>b</sup>	0,89	11,7 <sup>a</sup>	0,62

Tableau traduit de Robles et al (10). Le modèle inclut les données de 70 fermes qui ont chacune été échantillonnées à trois reprises. Les moyennes dans une rangée avec différentes lettres diffèrent significativement ( $P < 0,01$ ). \*ln UFC/mL.

Une étude observationnelle transversale a été réalisée en 2016 aux États-Unis par Patel et al. (11). Au cours de ce projet, 137 fermes provenant de 17 états ont été visitées et des échantillons de litière ont été prélevés à deux reprises (hiver et été). Ils ont pour leur part trouvé qu'en général, les comptages bactériens étaient plus élevés dans la LFR que dans la litière de sable ou dans la litière organique (bois, paille, etc.; **Tableau 5**).

Tableau 5. – Comptages bactériens (en log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>3</sup>) en pré-utilisation de différents types de litière de 137 troupeaux Américains.

	Litière de fumier recyclé (n=33)		Sable (n=46)		Litière organique* (n=58)	
	Comptage bactérien*	Erreur type	Comptage bactérien	Erreur type	Comptage bactérien	Erreur type
Agents pathogènes						
Comptage bactérien total	5,86 <sup>a</sup>	0,93	3,16 <sup>b</sup>	1,25	3,41 <sup>b</sup>	1,99
<i>Bacillus</i> spp.	5,73 <sup>a</sup>	0,90	3,01 <sup>b</sup>	1,36	2,48 <sup>b</sup>	2,02
Coliformes	2,44 <sup>a</sup>	1,89	0,19 <sup>c</sup>	0,66	0,82 <sup>b</sup>	1,41
<i>Klebsiella</i> spp.	0,69 <sup>a</sup>	1,38	0,04 <sup>bc</sup>	0,34	0,30 <sup>ac</sup>	0,95
Bactéries à Gram négatif autres que coliformes	4,01 <sup>a</sup>	1,91	0,70 <sup>c</sup>	1,33	2,53 <sup>b</sup>	2,18
Streptocoques ou organismes semblables aux streptocoques (SSLO)	3,89 <sup>a</sup>	2,10	1,31 <sup>b</sup>	1,25	1,10 <sup>b</sup>	1,45
<i>Staphylococcus</i> spp.	0,89 <sup>a</sup>	1,78	0,17 <sup>b</sup>	0,57	0,56 <sup>ab</sup>	1,16

Tableau traduit et adapté de Patel et al. (11). Les fermes étaient visitées à deux reprises et échantillonnées lors de chaque visite. Le modèle inclut donc 66 échantillons pour les fermes de litière de fumier recyclé, 92 échantillons pour les fermes sur litière de sable et 111 échantillons pour les fermes utilisant une litière organique. Les moyennes dans une rangée avec différentes lettres diffèrent significativement ( $P \leq 0,0083$ ). \*log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>3</sup>. \*Litière organique autre que litière de fumier recyclé, inclut les litières de bois et de paille.

### 1.3.4 Évolution bactériologique dans le temps

Il est intéressant de constater qu'une fois utilisées, des litières initialement différentes en termes de contenu bactérien peuvent se ressembler. Lors de leur étude, Cole et Hogan (9) ont analysé les comptages bactériens dans la LFR aux jours 0, 1, 2 et 6. Ils sont arrivés à la conclusion que le compostage de la LFR diminuait les concentrations de différents agents pathogènes avant l'utilisation de la litière, mais qu'une fois souillée par les animaux, les comptages bactériens d'une LFR compostée ou verte n'étaient plus significativement différents (**Tableau 6**). Au jour un de l'utilisation des litières seulement, le comptage des bactéries à Gram négatif était significativement plus bas dans la litière compostée. Cette différence n'était plus significative à partir du jour 2. Quant au comptage bactérien des coliformes, streptocoques et *Klebsiella* spp., il n'y avait pas de différence selon le traitement de la litière au jour 1, 2 et 6. La croissance bactérienne était très rapide le premier jour, et les niveaux se sont maintenus par la suite jusqu'au 6<sup>e</sup> jour de l'essai.

Tableau 6. – Comptages bactériens (en log<sub>10</sub> UFC/g) de litières de fumier recyclé (LFR) verte ou compostée et évolution sur une période de 6 jours.

Agent pathogène	Type de LFR	Jour			
		0	1	2	6
Bactéries à Gram négatif	Verte	6,92 (0,10) <sup>a,e</sup>	8,77 (0,03) <sup>b,e</sup>	8,65 (0,05) <sup>b</sup>	7,87 (0,08) <sup>c</sup>
	Compostée	6,45 (0,11) <sup>a,d</sup>	8,21 (0,06) <sup>b,d</sup>	8,35 (0,08) <sup>b</sup>	7,66 (0,07) <sup>c</sup>
Coliformes	Verte	5,25 (0,26) <sup>a,e</sup>	7,07 (0,11) <sup>b</sup>	7,24 (0,11) <sup>b</sup>	7,23 (0,10) <sup>b</sup>
	Compostée	3,34 (0,14) <sup>a,d</sup>	7,12(0,09) <sup>b</sup>	7,09 (0,07) <sup>b</sup>	7,02 (0,05) <sup>b</sup>
<i>Klebsiella</i> spp.	Verte	4,07 (0,17) <sup>a,e</sup>	5,41 (0,17) <sup>b</sup>	6,04 (0,14) <sup>c</sup>	5,90 (0,14) <sup>bc</sup>
	Compostée	3,04 (0,06) <sup>a,d</sup>	5,03 (0,17) <sup>b</sup>	5,48 (0,15) <sup>b</sup>	5,36 (0,12) <sup>b</sup>
<i>Streptococcus</i> spp.	Verte	6,57 (0,25) <sup>a,e</sup>	8,38 (0,08) <sup>b</sup>	8,58 (0,08) <sup>b</sup>	8,60 (0,08) <sup>b</sup>
	Compostée	4,75 (0,17) <sup>a,d</sup>	8,46 (0,10) <sup>b</sup>	8,68(0,09) <sup>b</sup>	8,84 (0,06) <sup>b</sup>

Tableau traduit et adapté de Cole et Hogan (9). \*Comptages bactériens en log<sub>10</sub> UFC /g de matière sèche (erreur type).<sup>a-c</sup>Les moyennes d'un type de litière de fumier recyclé dans une rangée avec différentes lettres diffèrent significativement entre les jours ( $P < 0,05$ ). <sup>d,e</sup>Les moyennes dans une journée diffèrent significativement selon le type de litière de fumier recyclé ( $P < 0,05$ ).

Finalement, Godden et al. (12) ont réalisé en 2008 deux séries d'essais de recroissance sur différents types de litière (sable, sable recyclé, copeaux de bois et LFR biométhanisée) préalablement stérilisées en inoculant une première série d'échantillons avec une solution contenant approximativement 10<sup>6</sup> UFC/mL de *Klebsiella pneumoniae* et une deuxième série d'échantillons avec la même quantité d'*Enterococcus faecium*. Des énumérations bactériennes ont ensuite été réalisées à chaque période de 24 h suivant l'incubation à 37°C pendant 72 h. La croissance de *K. pneumoniae* a été la plus importante dans la LFR, suivie par le sable recyclé, les copeaux et le sable. Dans les trois premières litières, la phase de croissance stationnaire, sur une échelle logarithmique, a été atteinte après les 24 premières heures, alors que dans le sable cette phase a été atteinte après 48 h (**Figure 4**).



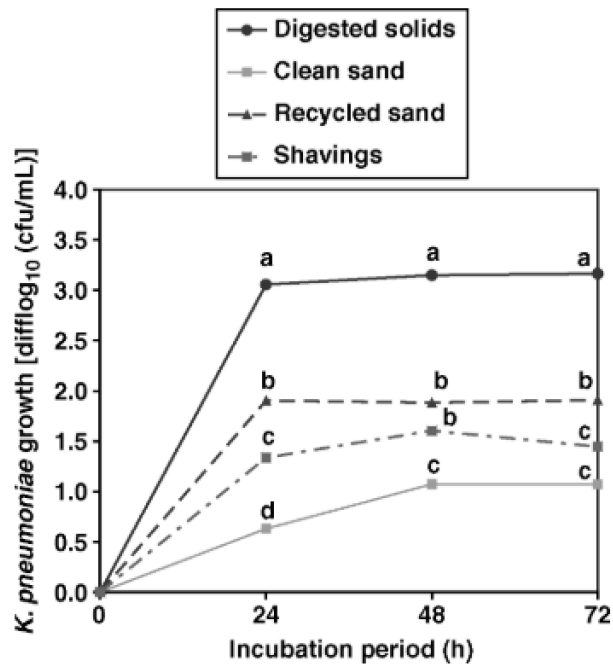


Figure 4. – Comparaison de la croissance de *Klebsiella pneumoniae* lorsqu’inoculée dans différents types de litière. <sup>a-d</sup>Différentes lettres indiquent une différence significative entre les litières à un temps donné ( $P < 0,05$ ). Figure de Godden et al. (12) reproduite avec autorisation.

### 1.3.5 Propriétés bactériologiques post-utilisation

Une fois utilisées, les litières contiennent une plus grande concentration d’agents pathogènes. Dans l’étude de Robles et al.(10) les comptes de *Streptococcus* spp. n’étaient pas différents d’une litière à l’autre (**Tableau 7**). La LFR contenait significativement plus de bactéries à Gram négatif que le sable, les produits de bois ou la paille. Les comptages de *Klebsiella* spp. étaient significativement plus élevés dans la LFR, le sable et la paille que dans les produits de bois.

Tableau 7. – Comptages bactériens (en ln UFC/mL) de différents types de litière après leur utilisation de 70 troupeaux Canadiens.

	Litière de fumier recyclé (n=8)		Sable (n=12)		Produits de bois (n=17)		Paille (n=33)	
Agents pathogènes	Comptage bactérien*	Erreur type	Comptage bactérien	Erreur type	Comptage bactérien	Erreur type	Comptage bactérien	Erreur type
<i>Streptococcus</i> spp.	14,9	0,63	16,7	0,50	16,1	0,33	15,6	0,24
Bactéries à Gram négatif	16,3 <sup>a</sup>	0,71	13,5 <sup>b</sup>	0,64	10,3 <sup>c</sup>	0,49	13,8 <sup>b</sup>	0,36
<i>Klebsiella</i> spp.	10,9 <sup>a</sup>	1,16	10,8 <sup>a</sup>	0,95	5,9 <sup>b</sup>	0,79	11,7 <sup>a</sup>	0,57

Tableau traduit de Robles et al. (10). Le modèle inclut les données de 70 fermes qui ont chacune été échantillonnées à trois reprises. Les moyennes dans une rangée avec différentes lettres diffèrent significativement ( $P < 0,01$ ). \*ln UFC/mL.

Dans l'étude de Patel et al. (11), la LFR utilisée contenait significativement plus de coliformes et de bactéries à Gram négatif (autres que coliformes) que le sable ou la litière organique en post-utilisation (**Tableau 8**). La LFR contenait également plus de *Klebsiella* spp. que le sable, mais n'était toutefois pas statistiquement différente de la litière organique.

Tableau 8. – Comptages bactériens (en log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>3</sup>) en post-utilisation de différents types de litière de 137 troupeaux Américains.

	Litière de fumier recyclé (n=33)		Sable (n=46)		Litière organique* (n=58)	
	Comptage bactérien*	Erreur type	Comptage bactérien	Erreur type	Comptage bactérien	Erreur type
Agents pathogènes						
Comptage bactérien total	6,66 <sup>a</sup>	0,56	6,82 <sup>a</sup>	0,34	6,58 <sup>b</sup>	0,50
<i>Bacillus</i> spp.	6,35 <sup>a</sup>	0,69	6,64 <sup>a</sup>	0,40	5,15 <sup>b</sup>	2,36
Coliformes	4,38 <sup>a</sup>	1,30	3,67 <sup>b</sup>	1,02	3,30 <sup>b</sup>	1,62
<i>Klebsiella</i> spp.	1,68 <sup>a</sup>	2,03	1,01 <sup>b</sup>	1,50	1,20 <sup>ab</sup>	2,79
Bactéries à Gram négatif autres que coliformes	5,03 <sup>a</sup>	1,60	4,55 <sup>b</sup>	1,01	4,55 <sup>b</sup>	1,41
Streptocoques ou organismes semblables aux streptocoques (SSLO)	5,71 <sup>a</sup>	1,04	6,06 <sup>a</sup>	0,73	6,12 <sup>a</sup>	0,87
<i>Staphylococcus</i> spp.	2,92 <sup>ab</sup>	2,42	1,36 <sup>b</sup>	2,01	2,29 <sup>a</sup>	2,34

Tableau traduit et adapté de Patel et al. (11). Les fermes étaient visitées à deux reprises et échantillonnées lors de chaque visite. Le modèle inclut donc 66 échantillons pour les fermes de litière de fumier recyclé, 92 échantillons pour les fermes sur litière de sable et 111 échantillons pour les fermes utilisant une litière organique. Les moyennes dans une rangée avec différentes lettres diffèrent significativement ( $P \leq 0,0083$ ). \*log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>3</sup>. \*Litière organique autre que litière de fumier recyclé, inclut les litières de bois et de paille.

En résumé, la méthode de production de la LFR peut influencer la concentration initiale d'agents pathogènes qui y est retrouvée. Dans les études consultées, la LFR verte contenait une concentration plus élevée d'agents pathogènes que la LFR biométhanisée ou produite à l'aide d'une cuve rotative. Cependant, une fois souillées, les trois types de LFR contenaient toutes une concentration élevée d'agents pathogènes. Lorsque comparée à d'autres litières, avant utilisation sous la vache, la LFR contenait généralement une concentration plus importante d'agents pathogènes que le sable ou d'autres litières organiques. Une étude rapportait par contre une plus grande quantité de bactéries à Gram négatif et de *Klebsiella* spp. dans la paille (10). Lorsque la relation avec le temps d'utilisation était évaluée, la LFR (qu'elle soit verte ou compostée), contenait une quantité d'agents pathogènes de plus en plus importante au fil des jours d'utilisation. De plus, les deux types de litière étaient très semblables après seulement une journée d'utilisation. Lorsque le potentiel de recroissance bactérienne de différents types de litière a été comparé, il a été démontré que la LFR présentait un fort potentiel de recroissance d'agents pathogènes à la suite d'une inoculation de coliformes. Finalement, lorsque différents types de litière souillée étaient comparés, les litières étaient semblables, mais la LFR présentait parfois une concentration en agents pathogènes légèrement plus élevée que les autres litières.

## **1.4 Caractéristiques physicochimiques des litières de fumier recyclé**

### **1.4.1 Influence du processus de compostage sur les caractéristiques physicochimiques de la LFR en pré- et post-utilisation**

Les différentes façons de produire la LFR étudiées par Husfeldt et al. (8) ont engendré quelques différences au niveau des caractéristiques physicochimiques (**Tableau 9**). D'abord, la LFR produite en cuve rotative était moins humide (d'environ 12%) que la LFR verte ou biométhanisée. Ensuite la LFR biométhanisée se démarquait par sa plus grande fraction de cendres et son plus faible ratio C:N. Enfin, les pH des trois types de LFR différaient significativement, mais étaient tous alcalins.

Tableau 9. – Caractéristiques physicochimiques de trois types de litière de fumier recyclé (LFR) en pré-utilisation.

Caractéristique	Type de LFR					
	Biométhanisée (25 échantillons)		Cuve rotative (4 échantillons)		Verte (9 échantillons)	
	Moyenne	Erreur type	Moyenne	Erreur type	Moyenne	Erreur type
Humidité (%)	72,9 <sup>a</sup>	0,70	60,3 <sup>b</sup>	1,60	72,6 <sup>a</sup>	1,10
Cendres (%)	10,2 <sup>a</sup>	0,30	6,8 <sup>b</sup>	0,80	8,1 <sup>b</sup>	0,60
N total (%)	1,5 <sup>a</sup>	0,03	1,3 <sup>b</sup>	0,09	1,2 <sup>b</sup>	0,05
C total (%)	44,8	0,50	45,9	0,20	44,9	0,40
Ratio C:N	30,3 <sup>a</sup>	0,80	35,9 <sup>b</sup>	1,90	38,9 <sup>b</sup>	1,30
pH	9,26 <sup>a</sup>	0,02	9,09 <sup>b</sup>	0,05	8,93 <sup>c</sup>	0,04

Tableau traduit et adapté de Husfeldt et al. (8). Les moyennes dans une rangée avec différentes lettres diffèrent significativement ( $P < 0,05$ ).

Une fois utilisées, la LFR produite par cuve rotative demeurerait encore la plus sèche des trois litières et la LFR biométhanisée demeurerait la LFR ayant la plus grande fraction de cendres et le plus faible ratio C:N (**Tableau 10**).

Tableau 10. – Caractéristiques physicochimiques de trois types de LFR en post-utilisation.

Caractéristique	Type de LFR					
	Biométhanisée (199 échantillons)		Cuve rotative (38 échantillons)		Verte (71 échantillons)	
	Moyenne	Erreur type	Moyenne	Erreur type	Moyenne	Erreur type
Humidité (%)	55,9 <sup>a</sup>	1,90	41,3 <sup>b</sup>	3,60	57,2 <sup>a</sup>	3,10
Cendres (%)	12,7 <sup>a</sup>	0,60	7,4 <sup>b</sup>	1,20	9,9 <sup>b</sup>	1,0
N total (%)	2,0 <sup>a</sup>	0,04	1,8 <sup>ab</sup>	0,09	1,7 <sup>b</sup>	0,06
C total (%)	42,6 <sup>a</sup>	0,20	44,7 <sup>b</sup>	0,50	43,2 <sup>a</sup>	0,40
Ratio C:N	21,3 <sup>a</sup>	0,60	25,8 <sup>b</sup>	1,10	25,4 <sup>b</sup>	0,90
pH	9,44	0,04	9,24	0,10	9,33	0,07

Tableau traduit et adapté de Husfeldt et al. (8). Les moyennes dans une rangée avec différentes lettres diffèrent significativement ( $P < 0,05$ ).

#### 1.4.2 Propriétés physicochimiques de la litière pré-utilisation

La seule caractéristique physicochimique rapportée dans l'étude de Robles et al. (10) était le pourcentage de matière sèche. La LFR avait un pourcentage bien inférieur au sable, à la paille et aux produits de bois ( $37,9 \pm 1,50\%$  vs.  $92,1 \pm 1,75\%$ ,  $88,3 \pm 0,76\%$  et  $85,3 \pm 1,09\%$  respectivement).

Le groupe de recherche de Patel et al. (11) ont quant à eux rapporté le pourcentage de matière sèche, le pourcentage de matière organique et le pH des différentes litières analysées (**Tableau 11**). Dans cette étude, la LFR demeurait la litière la moins sèche et présentait aussi, sans grande surprise, une concentration plus élevée de matière organique que le sable. Cependant, c'était les autres litières organiques (c.-à-d., paille ou résidus de bois) qui en présentaient le plus, à 93,1%.

Finalement, la LFR et le sable étaient plutôt alcalins avec des pH respectifs de 9,0 et 8,8 alors que les litières organiques étaient acides avec un pH rapporté de 6,1.

Tableau 11. – Caractéristiques physicochimiques en pré-utilisation de différents types de litière de 137 troupeaux Américains.

Caractéristique	Litière de fumier recyclé (n=33)		Sable (n=46)		Litière organique* (n=58)	
	Moyenne	Erreur type	Moyenne	Erreur type	Moyenne	Erreur type
Matière sèche (%)	57,0 <sup>a</sup>	26,4	95,6 <sup>c</sup>	2,4	83,5 <sup>b</sup>	13,0
Matière organique (%)	76,0 <sup>a</sup>	19,4	1,7 <sup>c</sup>	2,4	93,1 <sup>b</sup>	14,1
pH	9,0 <sup>a</sup>	0,6	8,8 <sup>a</sup>	1,1	6,1 <sup>b</sup>	1,9

Tableau traduit et adapté de Patel et al. (11). Les fermes étaient visitées à deux reprises et échantillonnées lors de chaque visite. Le modèle inclut donc 66 échantillons pour les fermes de litière de fumier recyclé, 92 échantillons pour les fermes sur litière de sable et 111 échantillons pour les fermes utilisant une litière organique. Les moyennes dans une rangée avec différentes lettres différent significativement ( $P \leq 0,0083$ ). \*Litière organique autre que litière de fumier recyclé, inclut les litières de bois et de paille.

### 1.4.3 Propriétés physicochimiques de la litière post-utilisation

Une fois utilisées, les litières évaluées dans l'étude de Robles et al. (10) n'évoluaient pas de la même façon. En effet, la paille et les produits de bois devenaient plus humides alors que le taux de matière sèche passait de 88,3% à 77,9% et de 85,3% à 75,4% respectivement. Le sable s'asséchait légèrement, passant d'un pourcentage de matière sèche de 92,1% à 95,2%. Finalement, la LFR s'asséchait considérablement, passant d'un pourcentage de matière sèche de 37,9% à 44,7%. D'un autre côté, dans l'étude de Patel et al. (11) les litières ne variaient pas beaucoup par rapport à leur composition en pré-utilisation (**Tableau 12**). La plus grosse variation était notée dans la litière organique qui perdait 11,4% de matière sèche, passant de 83,5% à 72,1%.

Tableau 12. – Caractéristiques physicochimiques en post-utilisation de différents types de litière de 137 troupeaux Américains.

Caractéristique	Litière de fumier recyclé (n=33)		Sable (n=46)		Litière organique*	
	Moyenne	Erreur type	Moyenne	Erreur type	Moyenne	Erreur type
Matière sèche (%)	59,5 <sup>a</sup>	19,3	95,7 <sup>c</sup>	2,2	72,1 <sup>b</sup>	13,2
Matière organique (%)	73,5 <sup>a</sup>	18,4	2,8 <sup>c</sup>	2,4	89,4 <sup>b</sup>	13,6
pH	9,3 <sup>a</sup>	0,6	9,5 <sup>a</sup>	1,1	8,6 <sup>b</sup>	1,0

Tableau traduit et adapté de Patel et al. (11). Les fermes étaient visitées à deux reprises et échantillonnées lors de chaque visite. Le modèle inclut donc 66 échantillons pour les fermes de litière de fumier recyclé, 92 échantillons pour les fermes sur litière de sable et 111 échantillons pour les fermes utilisant une litière organique. Les moyennes dans une rangée avec différentes lettres diffèrent significativement ( $P \leq 0,0083$ ). \*Litière organique autre que litière de fumier recyclé, inclut les litières de bois et de paille.

Bien que les différentes méthodes de production de LFR utilisées engendrent des caractéristiques physicochimiques légèrement différentes, on peut conclure que la LFR est une litière très humide qui sèche lors de son utilisation sous les animaux. Les changements dans les proportions de carbone et d'azote illustrent bien que le procédé est dynamique, c'est-à-dire que le processus de compostage continue durant l'utilisation, alors que la population microbienne continue de consommer les nutriments de la litière. D'une étude à l'autre, le pourcentage de matière sèche rapporté pour la LFR varie considérablement. Il est intéressant de pouvoir comparer les caractéristiques physicochimiques de la LFR à celles d'autres litières plus conventionnelles. Cependant, bien que ces caractéristiques soient décrites, des associations entre ces données et un risque pour la santé ou le bien-être des animaux n'ont pas été rapportées.



## 1.5 Gestion de la litière de fumier recyclé

### 1.5.1 Ajout de conditionneurs

Hogan et al. (13) ont testé en 1999 en ferme expérimentale l'influence de l'ajout de conditionneurs (chaux hydratée, conditionneur acide, conditionneur basique) sur le comptage bactérien dans la LFR verte. Dans cette étude, une stalle contenait 10 kg de LFR et 1 kg de conditionneur y était ajouté. Les populations d'agents pathogènes suivies étaient les bactéries à Gram négatif, les coliformes, les *Streptococcus* spp. et les *Klebsiella* spp. Les comptages bactériens initiaux de chaque groupe excédaient  $10^5$  UFC/mL. Les trois conditionneurs testés ont permis de réduire ces moyennes à  $< 10^3$  UFC/mL avant utilisation (**Figure 5**). Cependant, seulement la chaux et le conditionneur basique ont permis de continuer à réduire la charge bactérienne après une journée d'utilisation. Bien que l'effet de ces conditionneurs soit rapporté comme significatif statistiquement, la différence de concentration d'agents pathogènes entre la litière contrôle et une litière conditionnée demeure cliniquement très faible. Peu importe la nature du conditionneur utilisé et que la litière ait été traitée ou non par un conditionneur, les concentrations d'agents pathogènes y étant retrouvées étaient très élevées après une journée d'utilisation et demeuraient très élevées tout au long du cycle d'utilisation.

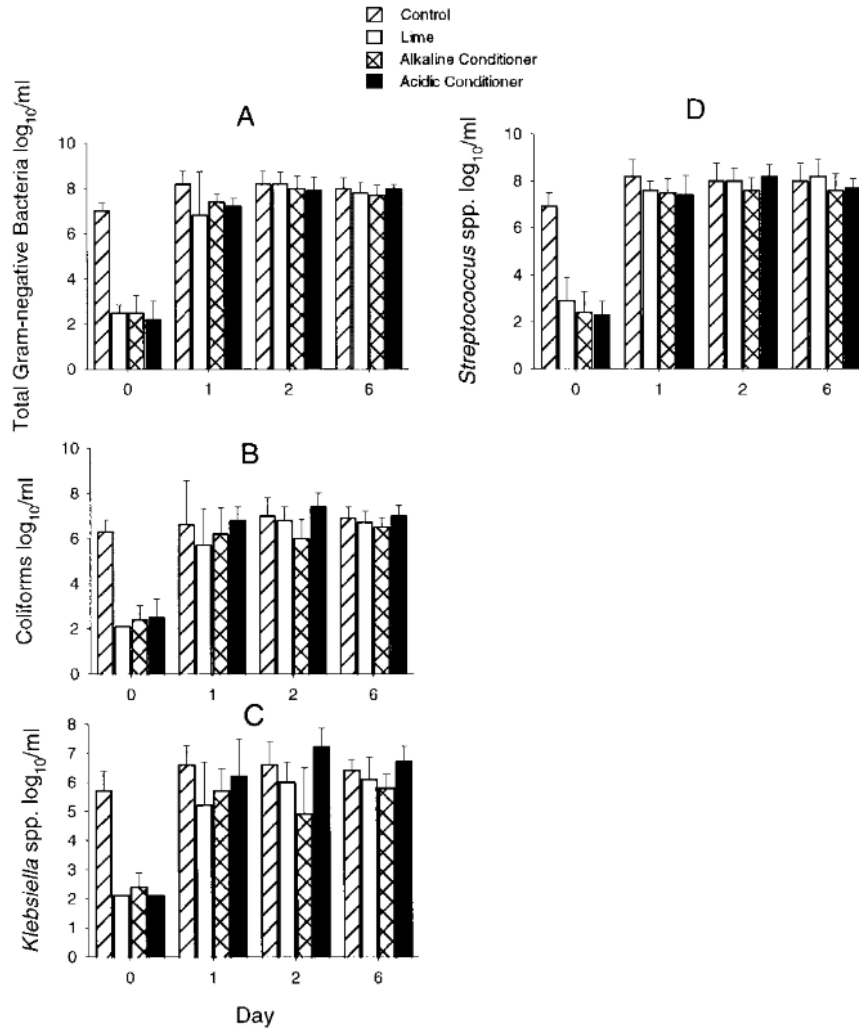


Figure 5. – Comptages (log<sub>10</sub>/mL) des bactéries à Gram négatif totales (A), des coliformes (B), des *Klebsiella* spp. (C) et des *Streptococcus* spp. (D) dans la litière de fumier recyclé non-traitée, traitée avec de la chaux, un conditionneur alcalin ou un conditionneur acide aux jours 0, 1, 2 et 6 d'utilisation. Figure de Hogan et al (13) adaptée et reproduite avec autorisation.

### 1.5.2 Fréquence de nettoyage

En 2014, Sorter et al. (14) ont voulu comparer les variations de concentration d'agents pathogènes dans le temps entre deux LFR vertes, soit l'une en système de logette profonde (10 à 15 cm de LFR) et l'autre correspondant à 2,5 cm de LFR appliquée sur un matelas. Ils ont conclu que le retrait quotidien de la litière souillée du tiers distal des stalles aiderait à prévenir l'exposition des vaches aux coliformes, en particulier *Klebsiella* spp., mais ne serait pas efficace

pour diminuer le comptage des streptocoques (**Figure 6**). Bien que les différences notées soient statistiquement significatives, il est important de noter que les comptages bactériens des deux systèmes de LFR sont demeurés élevés durant toute la durée de l'étude.

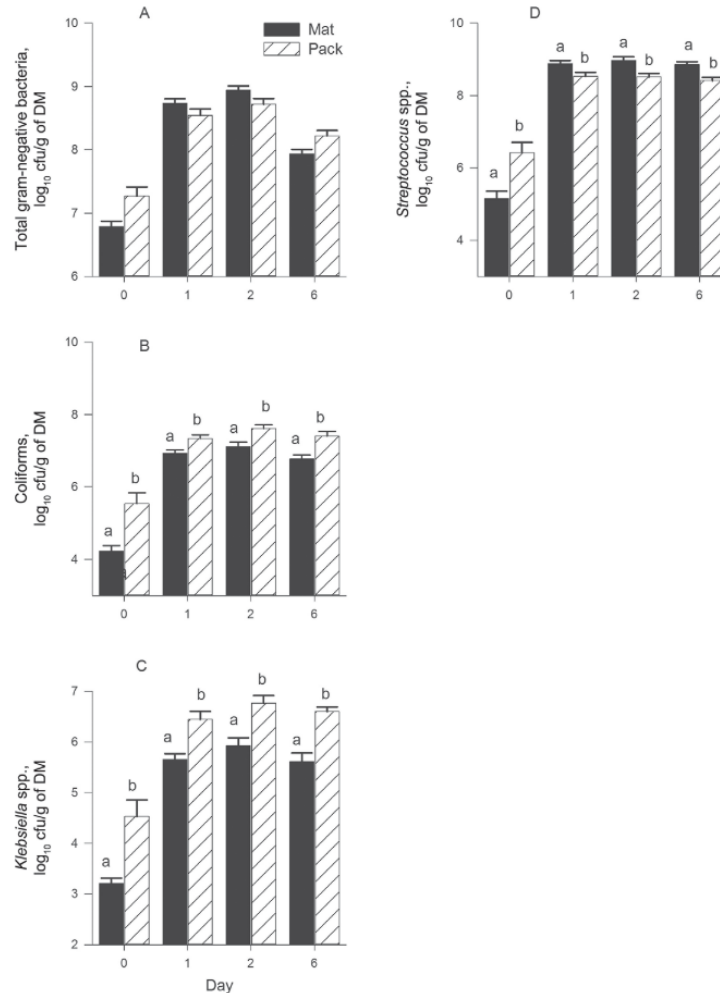


Figure 6. – Comptage bactériens (log<sub>10</sub> UFC/g de matière sèche) des bactéries Gram négatives totales (A), des coliformes (B), des *Klebsiella* spp. (C) et des *Streptococcus* spp. (D) de litière de fumier recyclé remplacée quotidiennement (sur matelas; « mat ») ou en système de logettes profondes (« pack ») sur une période d'utilisation de 6 jours en stabulation libre. Les barres d'erreur représentent l'erreur-type. <sup>a-b</sup>Des lettres différentes indiquent une différence significative (P < 0,05). Figure de Sorter et al (14) adaptée et reproduite avec autorisation.

## 1.6 Association entre la LFR et la santé des vaches laitières

Les risques liés à l'utilisation de la LFR sur la santé des vaches n'ont fait l'objet que de peu d'études et se sont concentrées principalement sur deux sphères : le confort (propreté, lésions aux jarrets et boiteries) et la santé de la glande mammaire.

### 1.6.1 Propreté

Lors d'une étude observationnelle transversale nationale (2007), Lombard et al. (15) ont visité 297 troupeaux des États-Unis dont 28 utilisaient la LFR comme litière. Lors de leurs analyses concernant les facteurs affectant l'hygiène des animaux, ils ont conclu que le type de litière utilisé n'était pas associé à des animaux très sales (c'est-à-dire des animaux ayant le pis, les pattes ou les flancs recouverts par une quantité importante de fumier). Esser et al. (16) ont aussi observé qu'il n'y avait pas de différence dans la propreté de vaches logées sur le sable comparées à des vaches logées sur LFR en système de logettes profondes. Les vaches étaient évaluées sur trois régions anatomiques soient le pis, le bas des pattes et les cuisses/haut des pattes. Elles recevaient un score de 1 à 4 tel que décrit par Schreiner et Ruegg (17) (1 : propre, absence de saleté; 2 : légèrement sale, 2-10% de la surface sale; 3 : modérément sale, 10-30% de la surface sale; 4 : très sale, > 30% de la surface sale). Les vaches sur litière de sable avaient un score moyen de 1,59 pour le pis, 2,24 pour les pattes et 1,68 pour les flancs alors que les vaches sur LFR en système de logettes profondes avaient des scores moyens de 1,38, 2,20 et 1,68 respectivement. Par contre, les vaches logées sur LFR en petite quantité par-dessus un matelas présentaient des scores de propreté significativement plus élevés avec un score pour le pis de 1,83, pour le bas des pattes de 2,34 et pour les flancs de 2,94 ( $P < 0,001$ ). Patel et al. (11) se sont concentrés sur l'hygiène du pis et ont utilisé le même système de score de propreté que Esser et al. (16). Les vaches logées sur sable avaient un score moyen de 1,81, les vaches sur litière organique autre que fumier recyclé (copeaux de bois, paille, etc.) avaient quant à elle un score de 1,88 et finalement les vaches logées sur LFR avaient un score de 1,94. Ces différences n'étaient cependant pas statistiquement significatives. Husfeldt et al. (18) ont comparé la propreté de vaches logées sur LFR en petite quantité sur un matelas à celle des vaches logées sur LFR en système de logettes profondes. La propreté était notée en utilisant l'échelle suggérée de Reneau

et al (19) où un score de 1 signifiait un animal propre et 5 un animal très sale. Une différence significative entre les deux groupes d'animaux n'a pas été détectée alors que les vaches logées en LFR sur matelas avaient un score moyen de 2,53 et que celles sur litière profonde de fumier recyclé avaient un score moyen de 2,49.

### **1.6.2 Lésions aux jarrets**

Lors de leur étude, Lombard et al. (15) ont aussi évalué l'état des jarrets des vaches et sont arrivés à la conclusion que la sévérité des lésions aux jarrets était associée au type de litière utilisé. Les jarrets sains recevaient un score de 1, les jarrets présentant une zone de dépilation recevaient un score de 2 et finalement les jarrets présentant des zones de dépilation, de l'enflure ou des lésions recevaient un score de 3. Ces derniers étaient considérés comme des jarrets présentant des lésions sévères. Les vaches logées sur le sable avaient le plus faible pourcentage de lésions sévères aux jarrets avec une incidence de 0,7% alors que les vaches logées sur LFR avaient une incidence de lésions sévères de 2,7%. En d'autres mots, les vaches logées sur LFR avaient 3,75 fois plus de chances d'avoir des lésions sévères aux jarrets que les vaches logées sur sable. Les vaches logées sur paille avaient, quant à elles, 2,60 fois plus de chance que les vaches sur sable d'avoir des lésions sévères. Ces différences étaient statistiquement significatives ( $P = 0,006$ ). Adams et al. (20) ont aussi trouvé que les vaches sur litière de sable avaient la plus faible prévalence de lésions aux jarrets, tous scores confondus. Les vaches sur LFR présentaient 3,44 fois plus de risques de présenter des lésions que celles sur le sable, alors que pour les vaches logées sur la paille, le risque de lésion était 9,25 fois plus grand (toujours comparé au sable). Par contre, l'utilisation de LFR comme litière n'était pas significativement associée à la prévalence de lésions sévères aux jarrets (même échelle de score que Lombard et al. (15); score 3). Esser et al. (16), toujours en utilisant le même système de score, ont trouvé que les vaches logées sur LFR avaient un score moyen plus élevé que celles logées sur sable (1,25 vs 1,04 respectivement). Cependant, cette différence était entièrement associée à l'utilisation de LFR en petite quantité par-dessus des matelas. Lorsque l'utilisation de LFR était sous-divisée en LFR sur matelas et LFR en système de logettes profondes, le score de jarrets moyen était respectivement de 1,42 et 1,07. Husfeldt et al. (18) ont quant à eux comparé la prévalence de lésions aux jarrets entre deux groupes de vaches logées sur LFR, soit en petite quantité par-dessus des matelas ou en système de logettes profondes. Encore une

fois, les jarrets recevaient un score de 1 à 3, 3 étant considéré comme une lésion sévère. Les vaches en système de logettes profondes présentaient significativement moins de lésions aux jarrets et moins de lésions sévères aux jarrets que les vaches logées sur matelas recouverts de LFR (prévalence de 49,4% vs 67,3% et 6,4% vs 13,2%, respectivement;  $P < 0,001$ ).

### 1.6.3 Boiteries

Husfeldt et al. (18) ont aussi analysé la démarche des deux groupes de vaches (logées sur LFR en logettes profondes vs logées sur LFR en petite quantité par-dessus un matelas) et ont attribué un score à chaque animal selon la méthode décrite par Flower et al. (21). Brièvement, les vaches recevaient un score de 1 à 5 selon plusieurs critères dont, entre autres, la posture du dos, de la tête et la répartition du poids égale sur les membres. Un score de 1 représentait une excellente démarche et un score  $\geq 3$  était considéré comme de la boiterie. Pour être considérée comme une boiterie sévère, la vache devait recevoir un score  $\geq 4$ . Ils ont détecté que les vaches logées sur litière profonde de fumier recyclé expérimentaient significativement moins de boiteries que celles sur matelas avec peu de LFR (14,4% et 19,8% respectivement;  $P < 0,001$ ). De plus, les vaches en système de logettes profondes présentaient moins de boiteries sévères que les vaches sur matelas (3,6% et 5,9% respectivement;  $P < 0,001$ ). Adams et al (20) ont aussi évalué cet aspect dans leur étude. Ils ont attribué un score de 1 à 3 aux vaches, 1 représentant une vache saine, 2 une boiterie légère à modérée et 3 une boiterie sévère. Lorsque comparées au sable, les vaches logées sur LFR avaient 1,57 fois plus de chance de démontrer une boiterie ( $P = 0,036$ ), alors que les vaches logées sur paille, à titre comparatif, avaient un risque 1,53 fois plus élevé de boiterie que les vaches logées sur sable ( $P = 0,033$ ).

### 1.6.4 Mammite sous-clinique

La mammite sous-clinique (**MSC**) se définit par la présence d'inflammation dans la glande mammaire sans signe clinique apparent (22). Elle est le plus souvent évaluée par le comptage de cellules somatiques (**CCS**) ou par le score linéaire (**SL**), une transformation mathématique qui corrige la distribution des CCS très asymétrique typiquement retrouvée dans les troupeaux (23, 24). Lors d'une étude expérimentale d'une durée d'un an menée sur des vaches primipares, Rowbotham et al. (25) n'ont pas réussi à détecter une association entre l'utilisation de LFR et

l'incidence de MSC, définie par un CCS > 200, 000 c/mL. Dans un troupeau de 1600 vaches faisant partie de leur étude observationnelle, Harrison et al. (26) ont pu évaluer l'association entre différents types de litière (LFR verte, LFR compostée et sable) et le CCS. Encore une fois, une association significative n'a pu être détectée. Lors d'une revue de littérature réalisée en 2015, Leach et al. (27) ont conclu qu'un lien clair et défini entre l'utilisation de LFR et le CCS n'a toujours pas été démontré. Plus récemment, Patel et al. (11) ont observé que les vaches logées sur LFR, comparées à d'autres logées sur sable ou autres litières organiques, n'avaient pas un SL moyen numériquement plus élevé (**Tableau 13**), ni une proportion plus élevée de vaches ayant une infection intra-mammaire (**IIM**; défini par la proportion de vaches avec un SL  $\geq 4,0$ ) à un temps donné, ni une plus grande proportion de vaches ayant une MSC chronique (vache ayant obtenu un SL  $\geq 4,0$  à ses deux derniers tests). Par contre, ils ont observé une plus grande proportion de nouvelles infections intra-mammaires (**NIIM**; proportion de vaches avec un SL < 4,0 au test précédent et SL  $\geq 4,0$  au test le plus récent) dans les troupeaux logés sur LFR.

Tableau 13. – Indicateurs de mammite sous-clinique de 137 troupeaux Américains.

Caractéristique	Litière de fumier recyclé (n=33)		Sable (n=46)		Litière organique* (n=58)	
	Moyenne	Erreur type	Moyenne	Erreur type	Moyenne	Erreur type
Score linéaire moyen	2,66 <sup>a</sup>	0,56	2,36 <sup>a</sup>	0,52	2,43 <sup>a</sup>	0,62
IIM (%)	24,42 <sup>a</sup>	9,39	20,71 <sup>a</sup>	9,51	22,17 <sup>a</sup>	10,40
NIIM (%)	10,32 <sup>a</sup>	3,95	7,22 <sup>b</sup>	3,79	7,39 <sup>ab</sup>	3,82
Chronique (%)	13,35 <sup>a</sup>	6,97	11,25 <sup>a</sup>	6,52	12,42 <sup>a</sup>	7,20

Tableau traduit et adapté de Patel et al. (11). Les moyennes dans une rangée avec différentes lettres diffèrent significativement ( $P \leq 0,0083$ ). \*Litière organique autre que litière de fumier recyclé, inclut les litières de bois et de paille.

### 1.6.5 Mammite clinique

Durant leur étude expérimentale, Rowbotham et al. (25) ne sont pas parvenus à mettre en évidence une association entre le type de litière utilisé et l'incidence de mammite clinique (**MC**). L'investigation portait sur la litière de sable, de sable recyclé, l'utilisation de LFR en système de logettes profondes ou en petite quantité sur matelas (1 à 3 cm d'épais).

Lors de l'étude de Harrison et al. (26) une ferme de 1600 vaches utilisait plusieurs types de litières et se prêtait donc bien à une analyse de l'impact du choix de litière sur la santé de la glande mammaire, alors que les autres variables de régie étaient gardées constantes entre les groupes d'animaux. Les chercheurs ont démontré que l'utilisation d'un certain type de litière de fumier recyclé est associée significativement aux chances de présenter un épisode de mammite ( $P = 0,0018$ ). Lorsque comparée au sable, l'utilisation de LFR verte entraînait un rapport de cotes de 2,1 pour le risque de développer une MC.

Patel et al. (11) ont observé que l'incidence cumulative mensuelle de MC était plus élevée chez les vaches logées sur LFR (4,68%) que chez celles logées sur sable ou litière organique (3,28% et 3,47% respectivement). Cependant, cette différence n'était pas statistiquement significative. Lors d'une étude observationnelle d'une durée d'un an, Husfeldt et al. (18) ont comparé l'incidence de MC de vaches logées sur LFR en système de logettes profondes, ou en petites quantités sur matelas. L'incidence de MC était élevée dans les deux groupes avec 66,3 cas/100 vache-année en logette profonde et 49 cas/100 vache-année sur matelas, mais une association avec la surface de la stalle n'a pas été démontrée.

### 1.6.6 Production laitière

Lors d'une vaste étude menée en 2012-2013, Rowbotham et Ruegg (28) ont démontré que les troupeaux sur litière à base de fumier recyclé avaient une moyenne de production laitière plus faible que les troupeaux sur litière de sable (**Tableau 14**). De plus, les vaches avaient une moyenne de production individuelle plus faible, et les troupeaux présentaient une plus grande proportion de vaches dont le lait n'allait pas dans le réservoir. Lorsque les troupeaux LFR étaient plutôt comparés à des litières organiques autres qu'à base de fumier, ces différences n'étaient pas



significatives. Finalement, les troupeaux sur LFR avaient une tendance à présenter une plus grande proportion de vaches ayant des quartiers non fonctionnels.

Tableau 14. – Caractéristiques de production de 286 fermes du Wisconsin.

Caractéristique	Nombre de fermes	LFR* (n=29)	Type de litière		Valeur de <i>P</i>
			Litière inorganique* (n=195)	Litière organique** (n=62)	
Production laitière annuelle (moyenne mobile; kg/vache)	227	11,779 <sup>a</sup>	12,870 <sup>b</sup>	12,025 <sup>a</sup>	< 0,001
Quantité lait vendue par jour par vache (kg/jour)	286	35,4 <sup>b</sup>	38,0 <sup>a</sup>	34,9 <sup>b</sup>	< 0,001
Proportion de vaches avec lait non vendu (%)	286	2,4 <sup>b</sup>	1,6 <sup>a</sup>	1,9 <sup>ab</sup>	0,005
Proportion de vaches ayant des quartiers non fonctionnels (%)	275	6,3	4,5	4,8	0,055

Tableau traduit et adapté de Rowbotham et al. (28). Les moyennes dans une rangée avec différentes lettres diffèrent significativement ( $P < 0,05$ ). \*Inclut la litière de fumier recyclé verte, compostée et produite par biodigestion. \*\*Regroupe le sable, le sable recyclé ainsi que des mélanges sable/chaux. \*\*\*Litière organique autre que litière de fumier recyclé, inclut les litières de bois, de paille et de papier recyclé.

### 1.6.7 Autres risques potentiels pour la santé animale

Tel que mentionné précédemment, peu d'études ont été réalisées pour quantifier les risques pour la santé des animaux liés à l'utilisation de LFR. Hormis les conditions citées précédemment, plusieurs autres risques potentiels ne peuvent être exclus, dont certaines zoonoses, notamment des infections telles que la cryptosporidiose, la listériose, la salmonellose et la paratuberculose. Parmi ces infections, seule la paratuberculose a fait l'objet d'investigation. Une étude a été

réalisée pour investiguer l'efficacité d'un compostage à la ferme, sans équipement spécialisé, pour réduire la concentration de *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (**MAP**) dans la LFR (29). Lors de cette étude, du fumier d'une vache forte excrétrice de MAP était ajouté à du fumier d'un troupeau exempt de MAP et par la suite composté en andain pendant une période de 70 jours. L'andain était retourné mécaniquement aux jours 5, 12, 20, 27, 34 et 70 et plusieurs prélèvements de compost étaient alors réalisés. À partir du jour 5 et jusqu'à la fin de l'étude, MAP n'a pas été détecté par la culture. Dans l'étude d'Harrison et al. (26), toutes les fermes avaient déclaré avoir de la paratuberculose au sein du troupeau. *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* a pu être cultivé à partir de la litière inutilisée de toutes les fermes, et ce peu importe l'équipement utilisé pour produire la LFR ou le temps de maturation du produit. Par conséquent, les auteurs de l'étude recommandent de ne pas utiliser cette litière sous les génisses, qui sont à risque de la consommer et de contracter l'infection.

### **1.6.8 Conclusions sur la santé des vaches laitières**

En conclusion, les vaches logées sur LFR ne présentent généralement pas de différence au niveau de leur hygiène par rapport à des animaux logés sur d'autres types de litière. Lorsqu'une différence était notée, il s'agissait plutôt de l'impact du système de logettes (peu de litière sur matelas vs logettes profondes) sur les animaux. De la même façon, le système de logettes influençait aussi la prévalence de lésions aux jarrets et la prévalence de boiteries avec des animaux qui, lorsque logés en logettes profondes, présentaient moins de problèmes de santé. Lorsque comparé au sable, l'usage de la LFR entraînait une plus forte prévalence de lésions aux jarrets et de boiteries. Il n'a pas été démontré que l'usage de la LFR était associé à une santé de la glande mammaire altérée. La prévalence et les dynamiques de CCS n'ont pas permis de mettre en évidence une problématique de MSC chez les vaches logées sur LFR. Le lien avec le risque de MC ne fait pas l'unanimité alors que certains n'ont pas observé de différence entre les groupes d'animaux étudiés et que d'autres ont observé un risque plus élevé de MC chez les animaux logés sur LFR. Un groupe de recherche a aussi observé que les vaches logées sur LFR présentaient une production laitière moins importante que les vaches logées sur sable. Ces différences n'étaient toutefois pas observables lorsque les animaux étaient plutôt comparés à d'autres, logés sur de la litière organique. Finalement, les agents pathogènes parfois retrouvés dans les selles des animaux

(ex. : *Salmonella* spp., *Cryptosporidium* spp.) ne semblent pas être éliminés lors du traitement post-séparation du fumier, ce qui représente un risque pour les animaux, en particulier pour les jeunes.

## **1.7 Application dans le contexte québécois**

De façon générale, toutes les procédures de recyclage du fumier en litière peuvent être utilisées au Québec. Un séparateur, l'équipement de base nécessaire pour produire de la litière, coûte environ 75 000\$ CA. Une maturation en tas ou en andain pourra être réalisée à peu de frais alors que le prix d'une maturation en contenant fermé variera selon les options choisies par le producteur. Une cuve rotative, quant à elle, coûte entre 180 000\$ CA et 260 000\$ CA, ce qui pourrait limiter l'adhésion des producteurs à cette méthode. De plus, il est moins probable qu'une installation de biométhaniseur soit vue à la ferme, étant donné les investissements nécessaires en équipement spécialisé pour entreposer et valoriser le biogaz produit vs la taille moyenne des troupeaux québécois.

En plus des critères économiques, les conditions climatiques doivent aussi être prises en considération lors de la planification d'un projet de recyclage de fumier en litière. Tel que décrit précédemment, les méthodes de production de la LFR peuvent varier considérablement selon les fermes. Cependant, un critère requis, peu importe la méthode de production, est l'atteinte d'une température suffisamment élevée pour enclencher la phase thermophile du compostage. L'atteinte et le maintien de cette température pourraient s'avérer difficiles durant l'hiver.

## **1.8 Réglementation actuelle au Québec et à l'international**

Au moment de rédiger cette thèse, il n'existe aucune législation encadrant cette pratique au Québec (Luc Bergeron, ministère de l'agriculture des pêcheries et de l'alimentation du Québec, communication personnelle) ou aux États-Unis (Sandra Godden, communication personnelle). Cependant, au Royaume-Uni, les règles encadrant l'usage de LFR sont beaucoup plus définies et restrictives. Par exemple, les producteurs qui produisent de la litière ne peuvent la vendre ou

l'utiliser ailleurs que sur leur ferme. Le fumier des animaux qui participent à la production de litière est soigneusement sélectionné (pas d'animal sous traitement antibiotique, pas d'animal sous investigation pour brucellose, pas de liquides de mises-bas, etc.). La solution proposée pour la gestion de ces animaux est un parc de quarantaine, dont le fumier ne servira pas à la production de litière. Lors d'éclosion de maladies, par exemple de salmonellose, le fumier ne peut être transformé en litière. Les éleveurs sont donc tenus de toujours avoir un plan de rechange pour subvenir à leurs besoins en litière. Le substrat produit doit avoir une matière sèche d'au moins 34 %. Une fois séparée, la litière doit être utilisée dans les 12 heures afin d'éviter tout compostage. De plus, le biométhaniseur n'est pas autorisé, ceci dans le but d'éviter la prolifération de spores de bactéries thermorésistantes qui pourrait nuire à la conservation du lait ainsi qu'à ses qualités fromagères. La LFR ne doit être utilisée que sous des animaux de plus de 12 mois d'âge et ne devrait pas être utilisée dans les aires de vêlage. La LFR ne doit pas être utilisée en système de logettes profondes ou en parc avec litière accumulée. Le fumier d'un animal nouvellement introduit dans le troupeau ne devrait pas être utilisé pour produire de la litière avant une quarantaine d'un mois (30).

## **1.9 Conclusion**

Alors que les principes du compostage domestique ont été bien détaillés dans la littérature, l'adaptation des méthodes en contexte de ferme commerciale n'a pas été décrite et demeure à valider. De façon générale, on peut conclure que la LFR, quelle que soit la façon dont elle a été produite, contient une concentration initiale élevée d'agents pathogènes, d'humidité et de matière organique. Les processus de production des LFR, tel qu'ils sont utilisés dans les fermes, ne semblent donc pas suffisants pour contrôler ces agents pathogènes. La LFR semble aussi offrir, probablement de par ses caractéristiques physicochimiques, un excellent milieu de croissance bactérienne lorsqu'elle est souillée. L'ajout de conditionneurs à la litière ou un fréquent retrait de la litière souillée des stalles ne permet pas d'abaisser considérablement la concentration en agents pathogènes dans le substrat. Les vaches qui sont logées sur cette litière sont donc exposées à une concentration importante d'agents pathogènes, et ce, dès les premières heures

d'utilisation. Les risques pour la santé animale associés à l'utilisation de cette litière n'ont fait l'objet que de quelques études qui se sont surtout concentrées sur des aspects de confort tels que l'hygiène des animaux, la prévalence de lésions aux jarrets et de boiteries, de même que sur la santé de la glande mammaire. Lorsque les indices de confort étaient évalués, l'impact du système de logettes (profondes ou non) influençait grandement les résultats. La LFR engendrait une prévalence plus importante de lésions aux jarrets et de boiteries que le sable. Cependant, lorsque comparée à d'autres types de litière organique, cette différence était de moindre amplitude. Le lien avec une dégradation de la santé de la glande mammaire n'a pas été démontré pour les MSC et est ambigu pour les MC. La supériorité de la LFR face à d'autres types de litière n'a pu être démontrée sous aucun des aspects étudiés. Évidemment, le nombre d'études sur le sujet est mince et devrait être bonifié. Cette thèse viendra donc enrichir les connaissances sur le sujet. Elle permettra aussi d'aller à la rencontre des producteurs laitiers qui ont adopté cette pratique et de valider de quelle façon ils ont adapté les procédés théoriques de compostage au contexte de fermes laitières commerciales.

## 2 Objectifs et hypothèses

Cette thèse vise à enrichir les connaissances entourant l'utilisation de LFR et à déterminer quels sont les risques associés à son utilisation pour la santé des animaux.

De façon plus spécifique, les objectifs du projet ont été réalisés par des études observationnelles transversale et cohorte sur des fermes commerciales. À des fins de comparaison, un groupe de fermes utilisant de la litière de paille a été étudié en plus des fermes LFR. Les méthodes de recrutement seront discutées dans le **Chapitre 3**.

Le premier objectif du projet était de décrire les méthodes de production de la LFR et les pratiques de régie qui y sont associées dans un contexte de production québécois. Nous supposons que les méthodes utilisées pour produire de la LFR seraient très variables de ferme en ferme. L'analyse descriptive des fermes recrutées se retrouve au **Chapitre 3**.

Notre deuxième objectif était d'évaluer le potentiel de recroissance bactérienne de cette litière lorsqu'elle est contaminée par des coliformes. Nous pensons que, par sa composition, la LFR fournirait un excellent milieu de recroissance pour des populations d'agents pathogènes. Ces analyses sont présentées dans le **Chapitre 4**.

Par la suite, nous souhaitons évaluer le niveau de propreté et la prévalence de lésions aux jarrets chez les vaches logées sur LFR. Ce troisième objectif est présenté dans le **Chapitre 5**. Nous supposons que les fermes utilisatrices de LFR pourraient produire une grande quantité de litière, ce qui inciterait les producteurs à appliquer une quantité généreuse de litière sous les vaches. Par conséquent, nous émettions l'hypothèse que les vaches logées sur LFR auraient un bon niveau de propreté et présenteraient des jarrets sains.

Finalement, nous souhaitons analyser l'association entre l'utilisation de LFR et la santé de la glande mammaire des vaches. D'abord, nous souhaitons déterminer la prévalence de MSC chez les vaches logées sur LFR. Cet objectif est présenté dans le **Chapitre 6**. Nous voulions aussi déterminer l'incidence de MC sur les mêmes animaux et déterminer les agents pathogènes responsables des infections. Ceci est présenté dans le **Chapitre 7**. Comme l'utilisation de LFR

entraîne un changement de l'environnement des animaux, nous supposons que les animaux logés sur LFR ne présenteraient pas une prévalence plus élevée de MSC, puisque cette dernière est plus souvent reliée à des agents pathogènes identifiés comme étant contagieux (31-33). Par contre, nous supposons que les animaux présenteraient une incidence de MC plus élevée, puisque celle-ci est le plus souvent causée par des agents pathogènes environnementaux. De plus, nous émettions l'hypothèse que les agents pathogènes responsables des infections seraient différents de ceux retrouvés chez les vaches logées sur paille. Lors du compostage du fumier, les populations microbiennes devraient évoluer et des agents pathogènes moins bien connus pourraient causer des MC.

La récolte de multiples échantillons dans le cadre de ce projet a permis de remplir trois objectifs supplémentaires quant à la caractérisation de cette litière qui ne seront pas présentés dans cette thèse. Ces objectifs ont été réalisés par des collaborateurs de la Faculté de médecine vétérinaire (**FMV**) de l'Université de Montréal et du département des sciences des aliments de l'Université Laval. D'abord, l'impact des méthodes de production de la LFR sur ses caractéristiques bactériologiques, son microbiote et la survie d'agents pathogènes bactériens a été décrit (34). Des analyses ont aussi été menées afin de déterminer l'efficacité du processus de compostage pour détruire les principaux parasites bovins (35). Finalement, l'impact de l'utilisation de LFR sur le lait du réservoir et les possibles implications microbiologiques pour la production de fromage ont fait l'objet d'investigations (36).

## **3 Description des fermes**

À l'exception des essais de recroissance, les objectifs du projet de recherche ont été étudiés grâce à des études observationnelles transversale ou cohorte. Bien que le matériel et les méthodes utilisées pour répondre à chaque objectif de recherche soient décrits dans les articles, ce chapitre a été ajouté afin de décrire en de plus amples détails la méthodologie utilisée pour recruter les troupeaux.

Des analyses descriptives des fermes seront aussi présentées dans ce chapitre.

### **3.1 Méthodologie**

L'équipe de recherche souhaitait recruter 30 fermes utilisant la LFR ainsi que 60 fermes utilisant une litière de paille à titre de fermes comparatives. Les fermes utilisant la LFR ont été identifiées par les archives des équipementiers de LFR, les médecins vétérinaires, les réseaux sociaux et par leurs collègues producteurs. Les fermes utilisant une litière de paille ont été invitées à participer au projet par l'intermédiaire de Lactanet (Ste-Anne de Bellevue, Qc, Canada). Tous les participants potentiels ont été contactés par téléphone afin de vérifier leur éligibilité au projet.

Il s'agissait d'un échantillonnage de convenance alors que toutes les fermes devaient être situées à moins de 250 km de la FMV de l'Université de Montréal. Les fermes LFR devaient utiliser cette litière depuis plus de six mois, un délai jugé raisonnable par l'équipe de recherche pour maîtriser la manipulation de l'équipement et ainsi obtenir une litière de qualité constante. Les fermes sur litière de paille devaient aussi participer au contrôle laitier (Lactanet), afin de faciliter la récupération de données de santé mammaire (CCS) de leurs animaux. Les fermes sur LFR n'accumulant pas de données de CCS étaient exclues de cette section du projet. De l'information sur les fermes non-éligibles ou sur les fermes qui refusaient de participer était amassée afin de vérifier leurs ressemblances avec les fermes participantes.

Une étude observationnelle transversale a été réalisée sur l'ensemble des fermes l'hiver suivant leur recrutement. L'hiver était le moment d'échantillonnage choisi afin d'évaluer les caractéristiques de la LFR lors de conditions météorologiques défavorables (ex. : froid, humidité).



La visite était planifiée un jour où la nouvelle litière de LFR était en fin de maturation (c.-à-d. prête à l'emploi) et où le remplacement des litières était prévu, pour avoir de la litière en fin de cycle d'utilisation. Lors de la visite, le projet de recherche était expliqué en détail au producteur et un formulaire de consentement était rempli (Numéro d'autorisation du comité d'éthique d'utilisation des animaux : 17-Rech-1886). Par la suite, un questionnaire portant sur les caractéristiques du troupeau et les pratiques de régie était complété avec le producteur laitier (voir **Annexe 2**). Des observations directes ont été notées par l'interviewer lors de la visite des bâtiments de ferme et des photos des installations ont été prises. Des échantillons de litière en pré-utilisation ont été prélevés. Pour les fermes sur paille, le producteur hachait une quantité du substrat que l'équipe prélevait dans un sac de plastique propre. Pour les fermes LFR, l'équipe prélevait au centre du tas/contenant de la LFR prête à l'emploi (pré-utilisation). Des échantillons de litière en fin de cycle d'utilisation étaient prélevés selon une méthode inspirée de celles développées dans le cadre de projets similaires (8, 11). Brièvement, un échantillon composite était réalisé à partir de 5 logettes choisies par convenance, c'est-à-dire contenant encore suffisamment de litière en fin de cycle d'utilisation. La litière était prélevée dans le tiers distal de la logette, où le pis est susceptible d'être en contact, et les bouses étaient évitées. Les échantillons étaient par la suite maintenus sur glace jusqu'au retour à la FMV. Finalement, 30 vaches par fermes étaient sélectionnées selon un échantillonnage de convenance et étaient cotées pour la propreté et l'état des jarrets (voir **Chapitre 5** pour plus de détails).

Pour les analyses de santé de la glande mammaire, une étude cohorte d'une durée d'un an était réalisée sur les mêmes fermes. Les CCS mensuels étaient obtenus, avec consentement, par l'intermédiaire de Lactanet ou par le système de traite. Pour les épisodes de MC, les producteurs étaient invités à prélever du lait du quartier atteint et à le faire parvenir au laboratoire de la FMV pour analyse. Les frais de transport et d'analyse étaient couverts par le projet de recherche.

### **3.2 Résultats du recrutement**

L'équipe de recherche a pu constituer en août 2017 une banque de participants potentiels de 49 fermes LFR et 139 fermes sur litière de paille. De cette liste, 43 fermes LFR ont pu être jointes par téléphone et 27 fermes ont été sélectionnées. La raison la plus fréquente d'exclusion était la

localisation géographique avec 11 fermes qui étaient à plus de 250 km de la FMV. Par la suite, 4 fermes ont été exclues puisqu'elles n'utilisaient plus de LFR dans leurs fermes et finalement 1 ferme a été exclue parce qu'elle n'utilisait pas la LFR sous les vaches (utilisait un séparateur de fumier pour sa gestion d'épandage aux champs). Pour les fermes sur paille, 61 d'entre elles ont été sélectionnées en raison de leurs habiletés à fournir des dossiers de santé informatisés à l'équipe de recherche.

L'ensemble des fermes a été visité entre le 15 janvier et le 10 juillet 2018.

### 3.3 Analyses descriptives des fermes recrutées

#### 3.3.1 Démographie des fermes

De manière générale, les fermes LFR accueillait plus de vaches en lactation (**Tableau 15**) et étaient plus récentes que les fermes sur litière de paille. Comme les bâtiments étaient plus modernes, les plus récentes pratiques de production y étaient nettement plus souvent rencontrées (stabulation libre, systèmes de logettes profondes et automatisation du système de traite).

Tableau 15. – Description des 27 fermes sur litière de fumier recyclé (LFR) et 61 fermes sur litière de paille à l'étude.

	Litière LFR	Litière de paille
	Médiane (étendue)	Médiane (étendue)
Nombre de vaches en lactation	111 (55 à 900)	65 (43 à 229)
Temps depuis les dernières rénovations des stalles (années)	3,0 (0,1 à 23,0)	10,0 (0,0 à 70,0)
Proportion de fermes en stabulation libre (%)	74,1	3,3
Proportion de fermes avec système de logettes profondes ( $\geq 10$ cm; %)	40,7	0,0
Proportion de fermes utilisant un système de traite automatisé (%)	37,0	3,3

### 3.3.2 Équipement et méthodes utilisées par les fermes utilisant la LFR

Les fermes produisant de la LFR avaient des configurations bien différentes les unes des autres. Les configurations les plus souvent retrouvées chez les fermes à l'étude sont illustrées dans la **Figure 7** et décrites dans le **Tableau 16**.

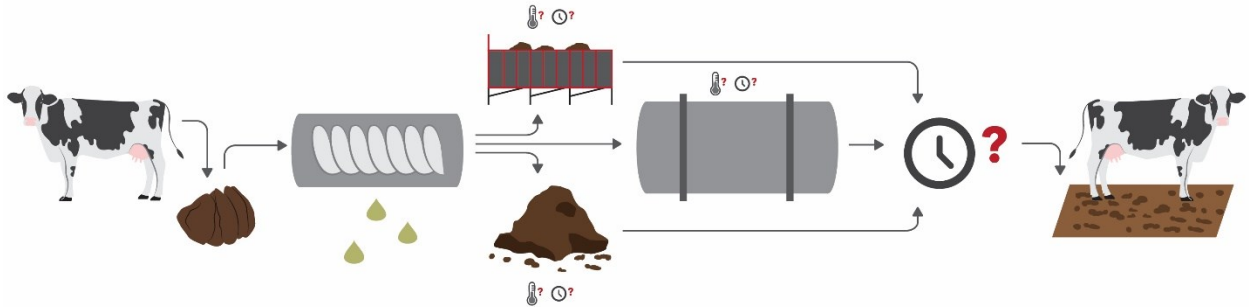


Figure 7. – Configurations possibles d'équipement pour produire de la litière de fumier recyclé.

Crédit Aida Minguez Menendez. Figure reproduite avec autorisation.

Au-delà de l'équipement utilisé, la durée des différentes étapes du processus ainsi que la durée de l'entreposage de la litière prête à l'emploi avant d'être étalée sous les vaches étaient variables. Les températures atteintes lors du procédé de compostage n'étaient, en général, pas surveillées par les producteurs. Cependant, la cuve rotative qui est automatisée affichait la température de son contenu. Deux fermes ne sont pas représentées dans cette figure. La première utilisait un biodigester de type continu. En plus de traiter le fumier, des résidus domestiques provenant de la municipalité étaient introduits dans le biodigester. Après un traitement de 30 jours, le digestat était séparé et immédiatement utilisé sous les animaux. La deuxième ferme utilisait la LFR immédiatement après la séparation des phases solides et liquides et utilisait donc une LFR verte.

Tableau 16. – Équipement utilisé par les fermes du projet.

	Nombre de fermes
Type de séparateur	
Vis infinie	17
Rouleaux	10
Compostage	
Aucun	1
Biodigesteur	1
Cuve rotative	2
Tas	10
Contenant fermé	13

### 3.3.2.1 Compostage en cuve rotative

Deux fermes utilisaient une cuve rotative pour composter la litière. Le substrat y était traité pendant 48 h avant d’être prêt à l’emploi. Pour une ferme, le séparateur était en fonction 24 h sur 24 et la cuve était programmée pour maintenir une température constante de 65,6°C. Advenant le cas où la température interne passait sous la barre des 60,6°C, l’ajout de substrat était interrompu. La deuxième ferme ne séparait pas du lisier 24 h sur 24 et n’était donc pas exposée à ce genre de situation où l’apport constant de substrat nuisait au maintien d’une température optimale.

### 3.3.2.2 Compostage en tas

Selon leur horaire de séparation, les fermes qui compostaient en tas laissaient simplement le substrat s’accumuler sur le sol à la sortie du séparateur où il restait jusqu’à ce qu’il soit jugé prêt pour utilisation. D’autres déplaçaient cependant le tas durant la période de maturation afin de commencer un nouveau tas à la sortie du séparateur. Parmi les fermes qui effectuaient un compostage en tas (n=10), la moitié des participants n’apportaient aucun mouvement ou aération à la litière pendant la maturation. Trois d’entre eux ne touchaient le substrat que pour le déplacer, un brassait la litière une fois en fin de processus et finalement, un dernier affirmait mélanger le substrat 5 à 6 fois lors de la formation du tas. La durée médiane de compostage était de 84 h (intervalle de 12 à 216 h).

### 3.3.2.3 Compostage en contenant fermé

Les fermes qui effectuaient un compostage en contenant fermé (n=13) utilisaient majoritairement des boîtes d'ensilage ou des boîtes à ration totale mélangée (**RTM**) pour contenir la litière. Les boîtes n'étaient donc pas fermées sur le dessus. Les boîtes RTM contiennent des pales et ces dernières pouvaient être mises à profit pour mélanger la litière en cours de processus. Néanmoins, la majorité des producteurs (n=8) ne mélangeaient ou n'aéraient pas la litière durant la maturation. Les 5 autres producteurs mélangeaient la litière pour une durée variable (trente secondes à 2 minutes) et à une fréquence variable (une fois par 6 h jusqu'à une fois par 24 h). La durée médiane de compostage était de 48 h (intervalle de 9 à 96 h).

### 3.3.2.4 Critères de qualité évalués

Parmi les fermes à l'étude, un seul producteur a rapporté utiliser un thermomètre afin de suivre les températures atteintes lors de la phase de compostage. Les producteurs mentionnaient qu'ils suivaient l'humidité de la LFR prête à l'emploi. Cependant, ils se fiaient uniquement sur leur expérience et la texture de la litière lorsque prise en main. Si elle leur semblait trop humide, ils ajustaient légèrement la pression appliquée sur le substrat par le séparateur.

## 3.4 Régie de la litière

Les producteurs des fermes LFR géraient cette litière de la même façon que tout autre substrat utilisé (ex. : paille, sable ou autre). D'abord, elle était utilisée en stabulation entravée comme en stabulation libre. Elle était utilisée en petite quantité par-dessus un matelas ou un tapis ou en quantité plus importante dans un système de logettes profondes. La fréquence de retrait de fumier des stalles variait selon les installations en place à la ferme. Les producteurs utilisant la LFR sur tapis ou matelas retiraient le fumier 3 fois par jour (médiane; étendue : 2 à 12) alors que lorsque des logettes profondes étaient en place le fumier était retiré 2 fois par jour (médiane; étendue : 1 à 6). L'ajout de litière propre, lorsqu'utilisée par-dessus des matelas ou des tapis, variait entre 1 fois par semaine et 4 fois par jour (médiane : 1,5 fois par jour) et lorsqu'utilisée en système de logettes profondes l'ajout variait entre 1 fois par semaine et 2 fois par jour (médiane : 1 fois par 2 jours).

Aucune des fermes utilisant la litière de paille n'avait de système de logettes profondes. Les producteurs retiraient le fumier des logettes 5 fois par jour (médiane; étendue : 2 à 12). De la nouvelle litière était ajoutée 2 fois par jour (médiane; étendue : 1 à 4).

### **3.5 Liens entre les pratiques de gestion de la litière**

Les combinaisons d'équipement utilisés pour produire de la litière de fumier recyclé ainsi que les pratiques de gestion de litière sont présentées dans la **Figure 8**. On peut constater que les fermes LFR recrutées dans cette étude différaient considérablement des fermes sur litière de paille. De plus, les fermes LFR différaient aussi entre elles autant par l'équipement utilisé que par les pratiques de gestion (type de stabulation et de logettes). Du côté des fermes utilisant la litière de paille, seulement 2 profils de fermes étaient possibles, soit stabulation entravée et logette conventionnelle (majorité des troupeaux sur litière de paille) vs stabulation libre et logette conventionnelle.

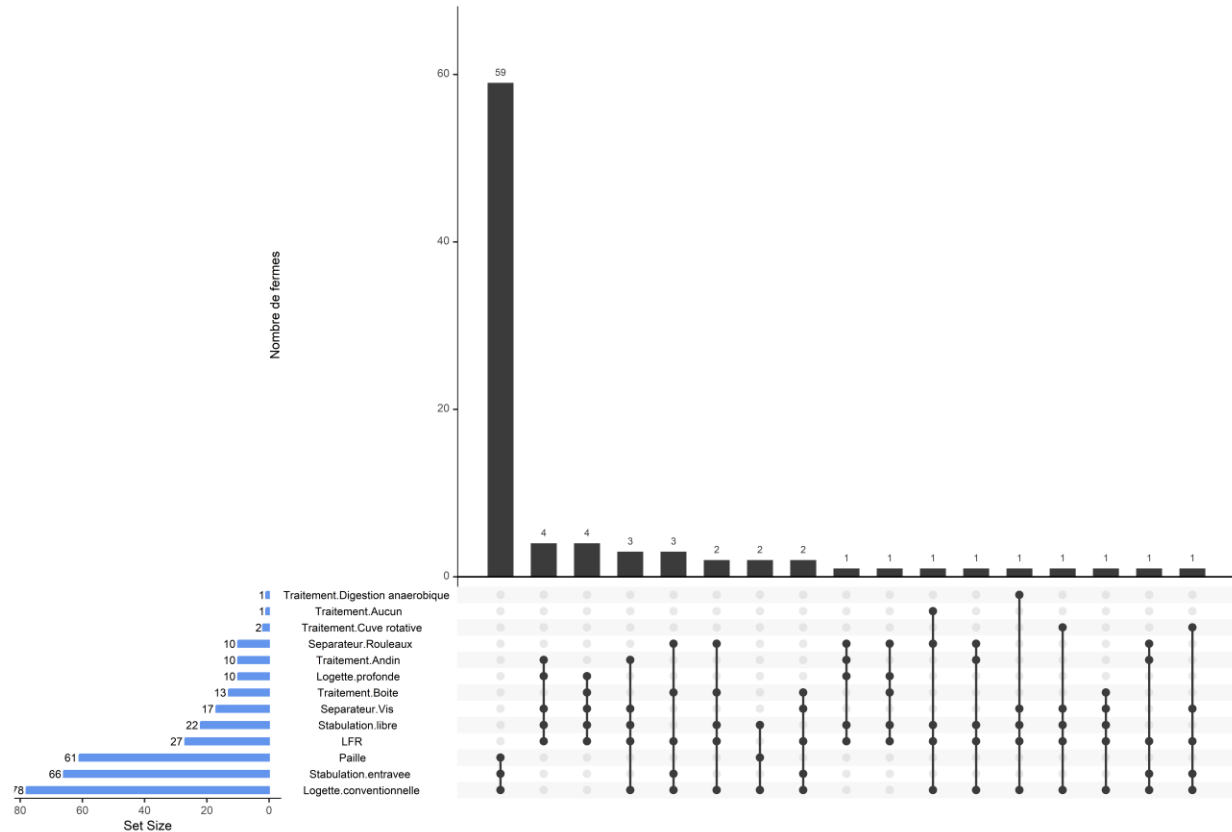


Figure 8. – Caractéristiques de production et de gestion de litière parmi les fermes à l'étude.

En conclusion, on peut penser que les producteurs qui choisissent de se tourner vers ce type de litière le font principalement lors de rénovations des bâtiments de ferme, ce qui est logique puisque des modifications doivent tout de même être apportées aux bâtiments pour accueillir une pré-fosse à lisier ainsi que l'équipement choisi. Une transition vers cette litière peut cependant être réalisée dans tout type de bâtiment. On constate que les producteurs utilisaient les méthodes de production les moins coûteuses (maturation en tas ou en contenant) et que le traitement utilisé sur la phase solide du fumier était très éloigné d'un réel compostage. En effet, la durée de traitement, l'apport en oxygène, le retournement du substrat et le suivi du processus étaient minimaux et variables. Le terme « compostage » n'est pas approprié pour le traitement de la phase solide du fumier et nous recommandons plutôt l'utilisation du terme « traitement post-séparation ». Nous constatons aussi que les deux groupes de fermes à l'étude différaient passablement sur d'autres critères que la litière elle-même (ex. : type de stabulation) et que nous

devrons tenir compte de ces différences dans nos analyses, par exemple, en incluant ces facteurs confondants comme covariables à contrôler dans les modèles statistiques.



## **4 Ability of recycled manure solids bedding to support growth of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli***

**Annie Fréchette<sup>1,2,3</sup>, Mylène Généreux<sup>5</sup>, Gilles Fecteau<sup>1,4</sup>, Caroline Côté<sup>1,3,5</sup> and Simon Dufour<sup>1,2,3</sup>**

<sup>1</sup>Regroupement FRQ-NT Op+Lait, Saint-Hyacinthe, QC, Canada

<sup>2</sup>Mastitis Network, Saint-Hyacinthe, QC, Canada

<sup>3</sup>Department of Pathology and Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Université de Montréal, Montreal, QC, Canada

<sup>4</sup>Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Université de Montréal, Montreal, QC, Canada

<sup>5</sup>Research and Development Institute for the Agri-Environment (IRDA), Québec City, QC, Canada

This article is submitted to Canadian Journal of Veterinary Research.

## 4.1 Abstract

Recycled manure solids (**RMS**) are used as bedding in dairy cows. Due to its organic matter and moisture content, it is suspected that this bedding could allow significant pathogens growth once contaminated by cows' feces. The objective of this research was to compare the growth abilities of different RMS (matured in heap, closed container or rotative drum) with sand, when experimentally inoculated with *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in a 3-days *in vitro* trial. A convenience sampling of four farms from Québec was used to obtain ready-to-use bedding. Samples were collected from bedding storage and kept between 2 and 8°C until the trials. Two 3-day trials were conducted. Treatments included bacterial inoculation with approximately 6 Log<sub>10</sub> CFU/g of *E. coli* and *K. pneumoniae* vs. no inoculation (control) and three replicates were performed per litter and per day. Samples were incubated at 15°C for 3 days, and microbiological analyses were performed every day. Peptone water was added to the solid material and thoroughly mixed in a stomacher and a series of 1:10 dilutions was then plated on 3M Petrifilm *E. coli*/coliforms count plate (incubated at 35°C for 48 h) and on MacConkey no 3 agar (incubated at 35°C for 24 h). Enumeration of bacteria was recorded daily and bacterial concentrations were reported on a dry weight basis and on a volumetric basis. Two mixed models (one for *K. pneumoniae* and one for *E. coli*) were built to estimate the effect of a treatment (inoculation or not), across time and bedding type (closed container RMS, heap RMS, rotative drum RMS or sand) on the bacterial concentrations (in Log<sub>10</sub> CFU/g and Log<sub>10</sub> CFU/cm<sup>3</sup>). Inoculated closed container and heap RMS did not experience any significant *K. pneumoniae* growth phase during the trial. On the other hand, rotative drum RMS and sand showed a similar active growth phase of *K. pneumoniae* during the first 24 h of the trial, before entering a stationary phase for the last 48 h. Inoculated RMS beddings (closed container, heap or rotative drum) did not experience any significant *E. coli* growth throughout the trial. However, sand bedding experienced a significant *E. coli* growth in the first 24 h of the study only. Different RMS bedding samples did not react the same way to coliform inoculation and rotative drum RMS was not so different from sand. However, the latter is not currently the most commonly RMS system used in Québec farms.

**Keywords: dairy cattle, recycled manure solids, bedding, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, bacterial growth**

## **4.2 Introduction**

Recycled manure solids (**RMS**) bedding is commonly used in dairy farms despite little is known regarding its microbiological characteristics. It has been demonstrated that cows housed on RMS had a much greater risk (7.0; 95%CI: 2.0, 24.6) of experiencing a clinical mastitis (**CM**) event due to *Klebsiella pneumoniae* compared to cows housed on straw bedding (Frechette et al., 2021). This finding confirmed anecdotal reports from farmers and stakeholders who were worried about the incidence and severity of environmental CM episodes in herds using RMS.

In a study conducted on these same farms, Beauchemin et al., (2021) demonstrated that, prior to usage, microbiological content of RMS bedding was different from straw-bedding. Recycled manure solids bedding had a generally higher bacteriological counts than straw. However, *Klebsiella* spp. counts were lower in RMS vs. straw bedding (Beauchemin et al., 2021). On the other hand, bedding bacterial counts were similar between groups after usage. The experimental design of this study did not allow to follow the *Klebsiella* spp. growth during bedding usage cycle. One hypothesis to explain the higher *Klebsiella* spp. CM incidence in RMS-bedded herds, despite similar or even lower counts in RMS initially, is that RMS bedding would allow a rapid *Klebsiella* spp. growth once inoculated by fecal material. This would quickly expose cow's teats to high infection pressure.

Ability of RMS to promote growth of environmental bacteria has been studied (Godden et al., 2008) and RMS, when compared to wood shavings or sand (recycled or clean), had the highest *K. pneumoniae* magnitude of growth. In that latter study, beddings were sterilized, then inoculated with coliforms (either *Enterococcus faecium* or *K. pneumoniae*), and monitored over time. A common thought about composting is that intrinsic microbiome will impede bacterial growth from external inoculation. Thus, the results from a study where RMS bedding was first sterilized before inoculation may not perfectly represent the real-life. In fact, on a farm, a cow would contaminate the bedding that already contain a very diverse and abundant microbiome.

Our objective with this project was, therefore, to evaluate non-sterilized RMS growth abilities once inoculated with coliforms, when compared to sand, an inorganic bedding. We hypothesized

that RMS would allow a greater growth rate than sand and that the first 24 h following the coliforms inoculation would present the fastest growth rate.

## **4.3 Materials and methods**

### **4.3.1 Bedding sample collection**

A convenience sample of three RMS herds was chosen within the 27 RMS herds recruited in a previous study (Frechette et al., 2021). Selection criteria of these herds have been described elsewhere (Lasprilla-Mantilla et al., 2019, Gagnon et al., 2020, Frechette et al., 2021, 2022), but briefly, herds needed to be located within 250 km of the Faculté de médecine vétérinaire (Saint-Hyacinthe, Qc, Canada) and to have use RMS as primary bedding for their lactating cows for at least six months at the time of the visit (2018-2019). Three RMS herds were visited a second time in January 2020 for the regrowth trial. They were chosen based on their geographical proximity with at the Research and Development Institute for the Agri-Environment's facilities (IRDA, Saint-Bruno-de-Montarville, Qc, Canada) and to represent different bedding preparation methods (maturation in a heap, in a closed container, or in a rotative drum). A fourth herd using sand as bedding was conveniently recruited for comparison purposes. Bedding samples were collected from the center of the storage pile, just prior to usage, in a clean plastic bag. Samples were kept on ice during transport and kept between 2 and 8°C in the lab facilities until the trials.

### **4.3.2 Experimental setup**

Two trials were conducted in controlled conditions at the IRDA laboratory. In each trial, samples (sand and RMS from three farms) were separated into sterile filter bags (25 g per aliquot). Treatments included bacterial inoculation (to illustrate bacterial growth following contamination of the bedding by cows) or not (to illustrate bacterial growth in unused bedding), followed by various incubation period at 15°C for 0, 1, 2, or 3 days. Temperature of 15°C was chosen because it represents the average temperature observed in most dairy farms. For each bedding type, three replicates were performed per treatment group (inoculated or not), per incubation time (0, 1, 2, or 3 days), and per trial. Two different trials were conducted, thus leading to 6 replicates for each condition (**Figure 9**).

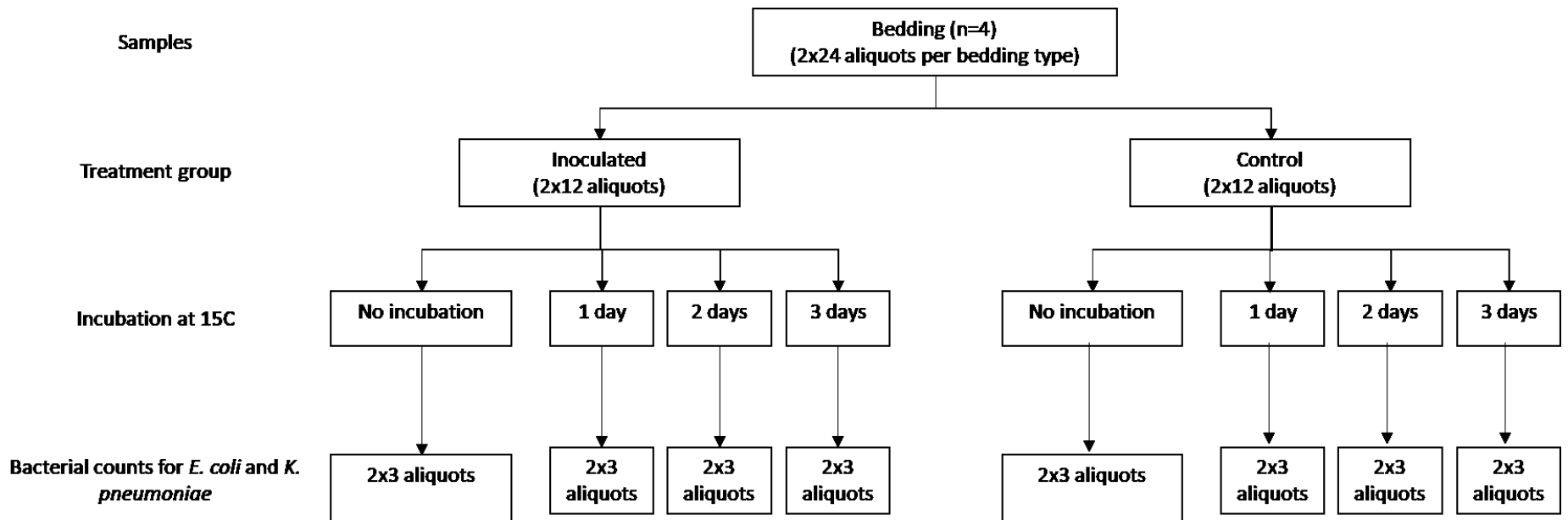


Figure 9. – Experimental design for a study investigating growth of *E. coli* and of *K. pneumoniae* in bedding samples inoculated with 150  $\mu$ l of a solution containing *E. coli* and *K. pneumoniae* (to mimic contamination by cow’s feces) or with 150  $\mu$ l of sterile water (as control).



### 4.3.3 Inoculum preparation

The day before litter inoculation, the inoculum solutions containing approximately  $9 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/ml}$  mixture of three different isolates of *E. coli* or of three different isolates of *K. pneumoniae* obtained from the Mastitis Network Mastitis Pathogen Culture Collection (Dufour et al., 2019) were prepared as follows. One full inoculating loop of each of the three previously tryptic soy agar (TSA)-grown strains ( $35^{\circ}\text{C}$  for 24 h) was transferred into a bottle containing 500 ml of tryptic soy broth (TSB) warmed at  $35^{\circ}\text{C}$  for 3 h. *E. coli* and *K. pneumoniae* inoculum were prepared separately. Bottles were incubated at  $35^{\circ}\text{C}$  overnight at 120 RPM on an orbital shaker.

### 4.3.4 RMS inoculation and incubation

Half of the aliquots of a given bedding type were inoculated with 75  $\mu\text{l}$  of each inoculum preparation to reach approximately  $6 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$  of *E. coli* and  $6 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$  of *K. pneumoniae* per aliquot. Aliquots for the non-inoculated group received 150  $\mu\text{l}$  of sterile water in order to have the same moisture content between samples. All aliquots were incubated at  $15^{\circ}\text{C}$  for up to 3 days, and a set of analyses was performed on day 1, on day 2, and, again, on day 3 post inoculation.

### 4.3.5 Analytical procedures

For each type of bedding abovementioned, bulk density and dry matter (DM) content were determined before inoculation. Briefly, 30 g of each material were weighed in foil plates (wet mass) and dried at  $105^{\circ}\text{C}$  for 24 h before weighing again (dry mass). Dry matter content was calculated by taking the ratio of the material dry mass to its wet mass. For bulk density, a  $100 \text{ cm}^3$  jar filled with litter without compacting was weighed. Density was calculating by dividing the total mass by  $100 \text{ cm}^3$ . Assays were run in triplicate.

Bacterial analyses were performed every day according to treatment and counts of *E. coli* and presumptive *K. pneumoniae* were determined as follows. Briefly, 225 mL of 0.1 % peptone water were added to 25 g of solid material and thoroughly mixed in a stomacher for 60 s. One mL was transferred into 9 mL of 0.1 % peptone water and a series of 1:10 dilutions were completed. For each dilution, 1 mL was plated on a 3M Petrifilm *E. coli*/coliforms count plate (3M Microbiology Products, St. Paul, MN) according to the manufacturer's instructions for *E. coli* counts. Fifty  $\mu\text{l}$  of each dilution were also directly plated on MacConkey no 3 agar (Oxoid Ltd, Basingstoke, UK) and

incubated at 35°C for 24 h. Dilutions presenting between 30 and 300 pale pink mucoid colonies were counted as presumptive *Klebsiella* spp. 3M Petrifilm were incubated at 35°C for 48 h and dilutions presenting 15 to 150 blue colonies associated to entrapped gas were counted as *E. coli*. For each analytical method, negative and positive controls were properly conducted with each batch of samples tested. For positive controls, ATCC standard strains (*E. coli* 25922, *K. pneumoniae* 13883) were added in 0.1 % peptone water, plated and incubated on separated agars as mentioned for samples.

#### **4.3.6 Statistical analysis**

Bacterial concentrations were reported on a dry weight basis and on a volumetric basis, as suggested by Gabler et al. (2001). When comparing only one type of bedding and its bacterial count variations over time, counts on weight basis are adequate. However, when comparing two or more different bedding types (for instance RMS vs. sand), the material density variation may bias the analyses. Since bedding application to stalls is more related to volume needed to cover the stall base and this volume represent the potential teat exposure to pathogen, this unit is increasingly used in bedding analyses (Godden et al., 2008, Harrison et al., 2008, Patel et al., 2019).

Bacterial counts were normalized using log-transformation. To describe the effect of coliform inoculation of different beddings on bacterial counts along time, linear mixed regression models were used. Two mixed models were constructed, one for the *K. pneumoniae* counts and another for the *E. coli* counts. The outcome was the least square mean bacterial count ( $\log_{10}$  UFC/g or  $\log_{10}$  UFC/cm<sup>3</sup>) and the predictors were treatment (inoculated or not), time (day 0 to 3) and bedding type (closed container RMS, heap RMS, rotative drum RMS or sand). Interaction terms were also included in the models: 1) time and treatment; 2) time and bedding type and 3) time, treatment and bedding type. Bedding type random intercept was also added to capture the variations due to triplicate samples realized in all assays. Significance level was set at  $P < 0.05$ . Statistical analyses were realized with SAS 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC). Datasets and SAS scripts are publicly available on <https://doi.org/10.5683/SP3/RM6Y48>.



## 4.4 Results

### 4.4.1 *Klebsiella pneumoniae* model

Results of the *K. pneumoniae* model using a volumetric- or mass-based analysis were similar. For simplicity, only volumetric-based analyses will be presented, although both volumetric- and mass-based analyses are presented in **Figure 10**. On day 0, the *K. pneumoniae* counts of the four non-inoculated bedding types were statistically different (**Figure 10**), with closed container RMS having the largest estimated (least square mean estimates; **LSM**) concentration of *K. pneumoniae* ( $3.56 \log_{10} \text{CFU/cm}^3$ ; 95%CI: 3.31, 3.81) followed by heap RMS ( $2.46 \log_{10} \text{CFU/cm}^3$ ; 95%CI: 2.20, 2.71), sand ( $1.98 \log_{10} \text{CFU/cm}^3$ ; 95%CI: 1.73, 2.23) and rotative drum RMS ( $1.46 \log_{10} \text{CFU/cm}^3$ ; 95%CI: 1.21, 1.71). Closed container RMS experienced an active *K. pneumoniae* growth phase for the first 48 h of the trial while the active growth phase of heap RMS was completed at 24 h. Rotative drum RMS and sand did not show any significant *K. pneumoniae* growth during the entire assay.

Once inoculated, closed container and heap RMS did not undergo any significant *K. pneumoniae* growth phase (LSM estimates ranging from 5.79 to 6.20  $\log_{10} \text{CFU/cm}^3$  for closed container, and from 5.88 to 6.17  $\log_{10} \text{CFU/cm}^3$  for heap). On the other hand, rotative drum RMS and sand experienced a similar active *K. pneumoniae* growth phase during the first 24 h of the trial (LSM from 6.01 to 6.64  $\log_{10} \text{CFU/cm}^3$  for rotative drum and from 6.57 to 7.22  $\log_{10} \text{CFU/cm}^3$  for sand) before entering a stationary phase for the last 48 h.

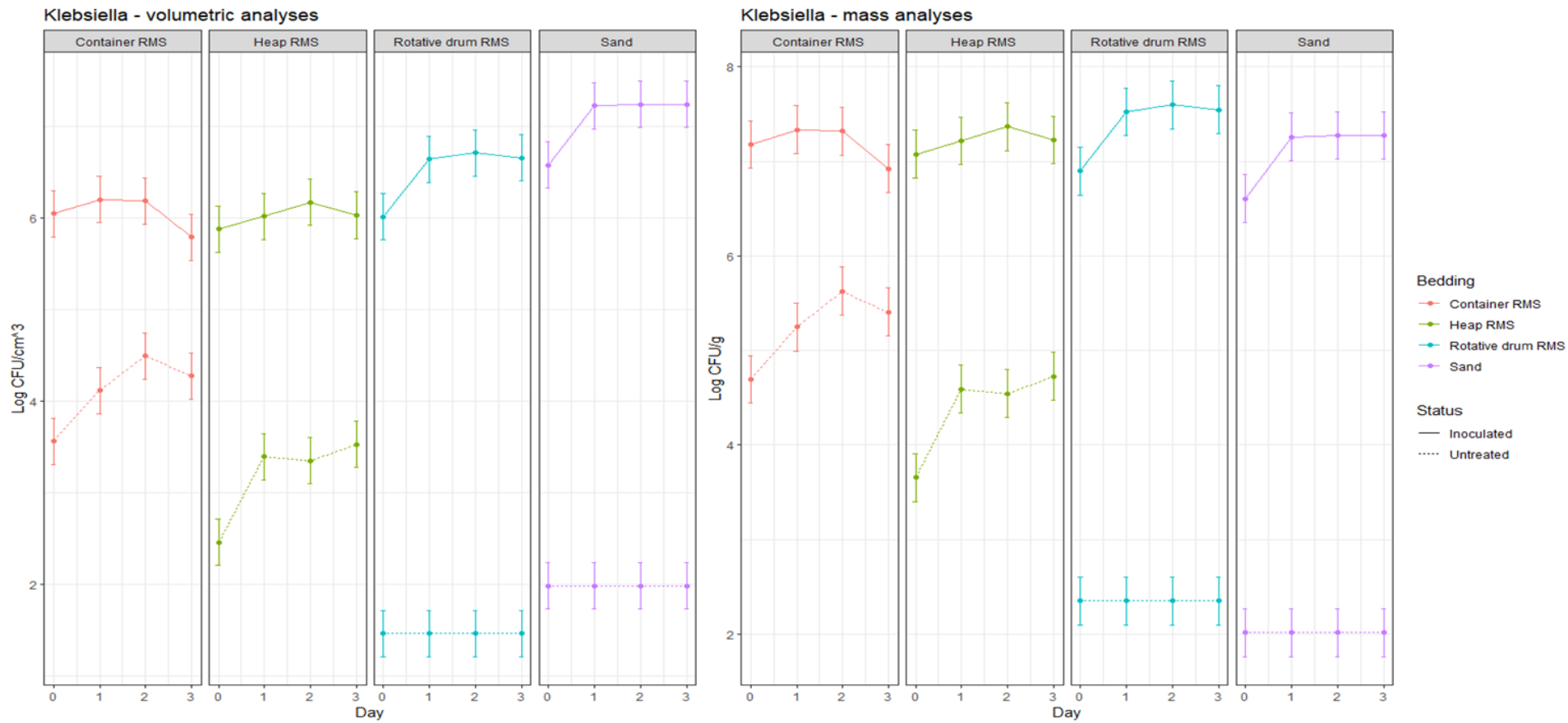


Figure 10. – Estimated concentration (least square means estimates and 95% confidence intervals) of *Klebsiella pneumoniae* for different bedding types, over a 3-day period, and inoculated or not with *Klebsiella pneumoniae*. Results are presented both on a volumetric basis (in  $\log_{10}$  CFU/cm<sup>3</sup>; left figures) and on a dry mass-basis (in  $\log_{10}$  CFU/g; right figures).

#### 4.4.2 *Escherichia coli* model

For *E. coli*, when comparing the mass-based vs. volumetric-based analyses, results were similar. At the beginning of the trial, untreated beddings had different *E. coli* contents (**Figure 11**), with closed container RMS having the greatest *E. coli* counts (LSM estimates of 3.93 log<sub>10</sub> CFU/cm<sup>3</sup>, 95%CI: 3.61, 4.25). Heap and rotative drum RMS had significantly lower *E. coli* counts (LSM estimates of 2.05 log<sub>10</sub> CFU/cm<sup>3</sup>, 95%CI: 1.73, 2.37; 1.66 log<sub>10</sub> CFU/cm<sup>3</sup>, 95%CI: 1.34, 1.98, respectively). Sand had the lowest initial *E. coli* estimated counts at 1.18 log<sub>10</sub> CFU/cm<sup>3</sup> (95%CI: 0.86, 1.50). During the three-days trial *E. coli* counts had decreased in all non-inoculated beddings, with an exception in heap RMS where an initial growth phase was observed during the first 24 h (from a LSM of 2.05 on day 0 to 2.83 log<sub>10</sub> CFU/cm<sup>3</sup> on day 1), followed by a decrease in the counts for the two following days (LSM of 2.39 on day 2, and of 2.19 log<sub>10</sub> CFU/cm<sup>3</sup> on day 3).

When inoculated with *E. coli*, RMS beddings had similar initial counts (approximately 6 log<sub>10</sub> CFU/cm<sup>3</sup>) and did not undergo any significant *E. coli* growth throughout the trial. On the other hand, sand bedding had shown a significant growth of *E. coli* in the first 24 h of the study, going from 6.46 log<sub>10</sub> CFU/cm<sup>3</sup> (95%CI: 6.14, 6.78) to 6.95 log<sub>10</sub> CFU/cm<sup>3</sup> (95%CI: 6.63, 7.27) and then entered a stationary phase for the last 48 h.

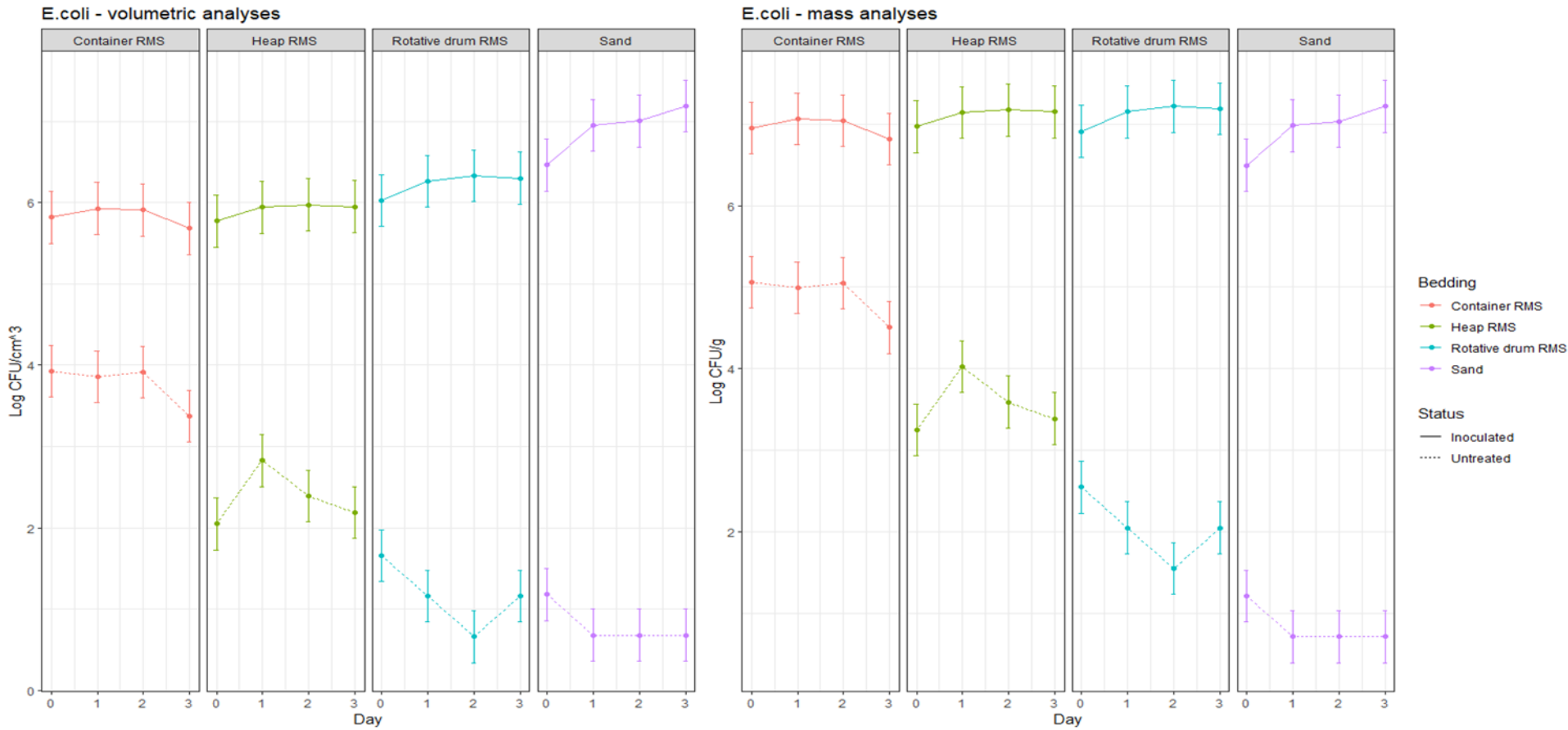


Figure 11. – Estimated concentration (least square means estimates and 95% confidence intervals) of *Escherichia coli* for different bedding types, over a 3-day period, and inoculated or not with *Escherichia coli*. Results are presented both on a volumetric basis (in  $\log_{10}$  CFU/cm<sup>3</sup>; left figures) and on a dry mass-basis (in  $\log_{10}$  CFU/g; right figures).

## 4.5 Discussion

Our results differ from previously published work where RMS appeared to best support growth of *K. pneumoniae* after inoculation (Godden et al., 2008). However, there is a major difference between the bedding production procedures used in our study vs. that of Godden et al. In the Godden trials, RMS bedding type was postdigested manure solids, which was not evaluated in our study. We may hypothesize that after an anaerobic treatment of 30 days, the ready-to-use bedding may have a lower bacterial count than heap RMS. Furthermore, in the same study (Godden et al., 2008), beddings were sterilized before inoculation. In our trials, the bedding with the lowest initial bacterial concentration experienced a greater growth phase than beddings having an important bacterial concentration at day 0. We hypothesize that a similar phenomenon explains the dramatical growth phase in the first 24 h of Godden trials where the absence of an intrinsic bacterial population allows a considerable growth of the bacterial inoculum.

Our trials allowed us to highlight differences between the different RMS types. Closed container and heap RMS, which are the most frequent RMS production systems used in Québec (Frechette et al., 2022), had relatively high initial *K. pneumoniae* counts. These counts further increased during the trial even though no additional inoculation was realized. These two bedding types, with an already high bacterial concentration, did not experience a significant active *K. pneumoniae* growth phase when inoculated. On the other hand, rotative drum RMS was similar to sand since both untreated bedding had very low *K. pneumoniae* counts and did not undergo any growth during the trial. However, once inoculated, these two bedding types experienced a significant *K. pneumoniae* active growth phase during the first 24 h of the trial. These results suggest some saturation effect for *K. pneumoniae*, where beddings with low bacterial counts can support its growth, while beddings with already high counts of *K. pneumoniae* will not. We could still hypothesize that spending a number of hours on a bedding with an initially lower count of *K. pneumoniae* would be beneficial for cows compared to a bedding where the concentration is already high when applied in the stalls. Once contaminated with *K. pneumoniae* from fecal material, however, this initial difference may not be relevant anymore.

In the *E. coli* model where non-inoculated samples were used, closed container RMS was similar to heap RMS, and rotative drum RMS was similar to sand. Overall, in the non-inoculated beddings,

*E. coli* counts decreased over time, suggesting the poor survival capacity of *E. coli* in this environment. Once inoculated, RMS samples did not show any significant *E. coli* growth during the assay, but again, sand had an active growth phase in the first 24 h.

We did not confirm our initial hypothesis using this experiment. In our trials, RMS beddings did not allow a greatest growth phase than sand when inoculated with coliforms. However, our *in vitro* study presents some limitations and do not reflect exactly the farm environment. In a farm environment, inoculation with animal feces, urine and milk may be more frequent. Moreover, in our trial, we chose to incubate the inoculated bedding samples at exactly 15°C to reflect the average barn temperature. On the other hand, on a farm, lying cows will generate heat, which may influence bacterial growth. Besides, in farm conditions, the barn (and bedding) temperature is likely to vary during the day.

As expected, the first 24 h of the trial was the period where an active growth phase could be measured, but only for sand (*E. coli* and *K. pneumoniae* counts) and rotative drum RMS (*K. pneumoniae* counts). Closer monitoring of bacterial growth during these 24 h (i.e., targeting multiple time points during the first 24 h) may be interesting to evaluate links with management action such as frequency of soiled bedding removal to attenuate teats pathogens exposure.

More studies are needed to fully characterize RMS bedding and to identify link between production methods, physicochemical characteristics, bacteriological content and potential risk for cow's mammary health.

## 4.6 Conclusion

Recycled manure solids beddings produced using different systems had different *K. pneumoniae* and *E. coli* concentrations. Heap and closed container RMS were similar while rotative drum RMS was similar to sand. When looking at *K. pneumoniae* counts, inoculated rotative drum RMS and sand experienced an active growth phase during the first 24 h of the essay. Finally, for *E. coli* counts, only sand demonstrated an active growth phase of *E. coli* during the first 24 h of the assay. Our trial suggest that different RMS bedding types are not equivalent and that rotative drum RMS behave, perhaps, similarly to sand in terms of initial coliform concentration and of coliform growth following inoculation.

## **4.7 Data availability statement**

The datasets presented in this study can be found in online repositories. The names of the repository/repositories and accession number(s) can be found at: <https://doi.org/10.5683/SP3/RM6Y48>.

## **4.8 Ethics statement**

The animal study was reviewed and approved by Animal Care and Use Committee of the Faculty of Veterinary Medicine (Université de Montréal; protocol 17-Rech-1886). Written informed consent was obtained from the owners for the participation of their animals in this study.

## **4.9 Author contributions**

Authors declare no conflicts of interest. CC, GF and SD contributed to conception and design of the study. MG conducted led the trials and AF analyzed the data (with supervision from SD). AF and MG wrote the first draft of the paper. All authors contributed to manuscript revision, approved and read the submitted version.

## **4.10 Funding**

This project was funded by grants from Novalait, the Consortium de recherche et innovations en bioprocédés industriels au Québec (#2015-044-C17), the Fonds Québécois de la recherche sur la nature et les technologies (#2017-LG-201835) and the Natural sciences and engineering research council of Canada (#CRDPJ 499421-2016). The first author (A.F.) received funding and support from the Natural sciences and engineering research council of Canada Collaborative research and training experience program in milk quality, from the Canadian Dairy Commission, from Fondation Agria, and from Op+lait.

## **4.11 References**

Beauchemin, J., A. Frechette, W. Theriault, S. Dufour, P. Fravallo, and A. Thibodeau. 2022. Comparison of microbiota of recycled manure solids and straw bedding used in dairy farms in eastern Canada. *J Dairy Sci* 105(1); 389-408.

Dufour, S., J. Labrie, and M. Jacques. 2019. The Mastitis Pathogens Culture Collection. *Microbiology Resource Announcements* 8(15):e00133-00119.

Frechette, A., G. Fecteau, C. Cote, and S. Dufour. 2021. Clinical Mastitis Incidence in Dairy Cows Housed on Recycled Manure Solids Bedding: A Canadian Cohort Study. *Front Vet Sci* 8:742868.

Frechette, A., G. Fecteau, C. Cote, and S. Dufour. 2022. Association Between Recycled Manure Solids Bedding and Subclinical Mastitis Incidence: A Canadian Cohort Study. *Front Vet Sci* 9:859858.

Gabler, M. T., J. K. Reneau, and R. J. Farnsworth. 2001. Comparison of number of *Streptococcus uberis* calculated on a volume or weight basis in sand and sawdust bedding. *Am J Vet Res* 62(2):171-173.

Gagnon, M., L. Hamelin, A. Frechette, S. Dufour, and D. Roy. 2020. Effect of recycled manure solids as bedding on bulk tank milk and implications for cheese microbiological quality. *J Dairy Sci* 103(1):128-140.

Godden, S., R. Bey, K. Lorch, R. Farnsworth, and P. Rapnicki. 2008. Ability of organic and inorganic bedding materials to promote growth of environmental bacteria. *J Dairy Sci* 91(1):151-159.

Harrison, E., J. Bonhotal, and M. Schwarz. 2008. Using manure solids as bedding. Ithaca, NY: Cornell Waste Management Institute.

Lasprilla-Mantilla, M. I., V. Wagner, J. Pena, A. Frechette, K. Thivierge, S. Dufour, and C. Fernandez-Prada. 2019. Effects of recycled manure solids bedding on the spread of gastrointestinal parasites in the environment of dairies and milk. *J Dairy Sci* 102(12):11308-11316.

Patel, K., S. M. Godden, E. Royster, B. A. Crooker, J. Timmerman, and L. Fox. 2019. Relationships among bedding materials, bedding bacteria counts, udder hygiene, milk quality, and udder health in US dairy herds. *J Dairy Sci* 102(11):10213-10234.



## 5 Impact of recycled manure solids bedding on hygiene and odds of hock lesions in dairy cows

Annie Fréchette<sup>1,2,3</sup>, Gilles Fecteau<sup>1,4</sup> and Simon Dufour<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Regroupement FRQ-NT Op+Lait, Saint-Hyacinthe, QC, Canada

<sup>2</sup>Mastitis Network, Saint-Hyacinthe, QC, Canada

<sup>3</sup>Department of Pathology and Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Université de Montréal, Montreal, QC, Canada

<sup>4</sup>Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Université de Montréal, Montreal, QC, Canada

This article was published in *Frontiers in Veterinary Science* (veterinary epidemiology and economics section).

**Citation:** Fréchette A, Fecteau G, and Dufour S (2022) Impact of recycled manure solids bedding on hygiene and odds of hock lesions in dairy cows. *Front. Vet. Sci.* 9:1061632. doi: 10.3389/fvets.2022.1061632

## 5.1 Abstract

The use of recycled manure solids (**RMS**) as bedding for dairy cows has become more popular over the last decade. Once producers own the RMS producing equipment, they are not restricted in the amount of bedding they can use in stalls, due to its large availability and low production costs. Thus, they are usually able to provide a soft lying area for their cows. Nevertheless, the potential positive impact of RMS on cows' hygiene and odds of hock lesions is not clearly demonstrated. Objectives of this research were, therefore, to compare RMS-bedded cows' hygiene level and odds of hock lesions to straw-bedded cows (comparative group). To achieve this, an observational cross-sectional study was conducted in 27 RMS- and 61 straw-bedded herds. During the farm visit, 30 cows per herd were scored for hygiene of three body regions (udder, lower legs and flank/ upper legs) using a score ranging from 1 to 4 (1 being the cleanest and 4 the dirtiest). In addition, both hocks were scored (0 to 3) to evaluate the presence of lesions (0 when there was no lesion and 3 when a swelling protrusion > 2.5 cm was present). Continuation-ratio models were used to compute the odds of having a given score to the odds of having a lower score. Recycled manure solids usage was associated with lower odds of having an udder hygiene score  $\geq 3$  (odds ratio (**OR**): 0.43; 95%CI: 0.20, 0.95) and of having a score of 4 (OR: 0.29; 95%CI: 0.09, 0.93). It was also associated, compared to straw, with cleaner lower legs. We observed lower odds of having a score  $\geq 2$  (OR: 0.45; 95%CI: 0.21, 0.98),  $\geq 3$  (OR: 0.16; 95%CI: 0.04, 0.66), or a score of 4 (OR: 0.07; 95%CI: 0.01, 0.40) in RMS-bedded herds. No statistically significant association could be highlighted between RMS usage and flank/upper legs hygiene. Furthermore, we did not observe any statistically significant associations between bedding type (RMS vs. straw) and odds of hock lesions. In conclusion, cows bedded with RMS had generally cleaner udders and cleaner lower legs than straw-bedded ones. No association was found between bedding type and odds of hock lesions.

**Key Words:** dairy, bedding, recycled manure solids, hock lesions, hygiene

## 5.2 Introduction

The choice of using a certain type of bedding in dairy herds is driven by several factors. Bedding must be compatible with the farm's equipment, available in large quantities and at a reasonable cost. From the animal's perspective, an appropriate bedding should allow the expression of normal behaviour, without any risk of slipping (1). Bedding should also contribute to hygiene by its absorption capacity and should provide a soft resting area (2, 3). Recycled manure solids (**RMS**) bedding seems promising due to its ease of installation, although production equipment is costly, in all types of farms (tie-stall vs. free stall) and the large quantity available, once the production cycle is initiated (4, 5). In Quebec, RMS bedding is mostly produced by maturation in heap or in closed container of the solid manure fraction (6). Producers may also let the solid fraction mature in a rotating drum or use it "green" (i.e., use the solid fraction immediately after the separation process). Finally, they may process the manure through a biodigester followed by a separation process. Drying devices are not currently used in Quebec's herds as part of the production process (6).

Studies on association between use of RMS bedding and animal health are scarce and concern mainly udder health. Recycled manure solids bedding has not been associated with an increased incidence of subclinical mastitis (4, 7, 8). The effect of RMS bedding on incidence of clinical mastitis is less clear, with a study reporting RMS usage as a significant risk factor for clinical mastitis (7) while others did not (6, 9, 10). In a recent study (6), however, it was reported that cows housed on RMS bedding had a 7 times greater risk of experiencing a clinical mastitis due to *Klebsiella pneumoniae*. On the other hand, the effect of RMS bedding on cows' hygiene and odds of hock lesions remains to be measured.

Lombard et al. (11) evaluated cows hygiene in a large cross-sectional study (297 free stall American Holstein herds; 28 herds using RMS as bedding) and concluded that severe soiling, defined as cows having large amounts of manure on legs, udder or flanks, was not associated with bedding type. In another study, they observed that hygiene scores for legs, udder and flank were similar between primiparous cows bedded with sand and cows on deep-bedding RMS system

(12). There was a significant difference, however, when these two beddings were used on mattresses (shallow bedding). In such a system, cows on RMS bedding had a poorer hygiene level. Finally, Patel et al. (10) did not detect a difference in udder hygiene score of RMS-bedded cows compared to animals bedded with other organic materials (shavings, straw and other products).

During their study, Lombard et al. (11) concluded that bedding type was associated with severity of hock lesions (hair loss, swelling or draining lesions). Sand bedding (their reference bedding) was associated with the lowest percentage of severe hock lesions when compared to RMS bedding (0.7% vs. 2.7%). Cows housed on RMS, in contrast with sand-bedded ones, had a severe hock lesion incidence rate ratio of 3.75 while straw-bedded cows had an incidence rate ratio of 2.60. Similarly, it was demonstrated in another study that use of sand bedding was associated with a lower prevalence of hock lesions (mild/moderate/severe) than RMS bedding (13). However, these latter authors found no statistically significant difference in the prevalence of severe hock lesions when comparing RMS bedding to sand. In that latter study, incidence of hock lesions were 3.44 higher in RMS herds vs. sand-bedded herds and 9.25 higher for straw herds vs. sand-bedded herds. A difference in hock lesions prevalence between cows bedded with RMS and sand-bedded ones was also observed by Esser et al. (12). However, the greater hock scores observed in RMS-bedded cows in that latter study were, again, entirely associated with use of mattresses (in contrast with deep bedding stall systems). Prevalence of hock lesions and severe hock lesions of cows housed on deep-bedding RMS was also estimated by Husfeldt and Endres (14) at 49.4% (95%CI: 45.4, 53.4) and 6.4% (95%CI: 5.6, 7.3), respectively, in contrast with 67.3% (95%CI: 62.4, 71.9) and 13.2% (95%CI: 11.8, 14.7) in shallow RMS bedding.

In summary, in the available literature, effect of RMS bedding on cows' hygiene is reported to be comparable with other bedding materials. However, association of this product with hock lesions is not clear. Recycled manure solids bedding seems to be associated with higher risk of hock lesions than sand, but when compared to straw, may be more or less beneficial for cows. Finally, it is important to note that bedding thickness may have influenced the results of the aforementioned studies.

Considering this lack of knowledge, our objectives were, therefore, to describe the association between use of RMS bedding and (1) cows' hygiene, and (2) odds of hock lesions, when compared to straw bedding. Straw bedding was the most commonly used bedding product in Quebec at the time. In general, particle size of straw bedding is highly variable from one farm to another, and straw is usually added on top of mattresses or rubber mats. We hypothesized that both animal groups would have the same hygiene level and, for the same farm-bedding strategy (tie-stall vs. free stall, shallow vs. deep bedding), would present the same odds of hock lesions. This paper is part of a larger project where we studied many aspects of RMS bedding: parasitic load and survival (15), bacteriological content and microbiota (16), bulk milk quality (17), pathogen-specific clinical mastitis incidence (6) and subclinical mastitis incidence (8).

### **5.3 Materials and methods**

This project was approved by the Animal Care and Use Committee of the Faculté de Médecine Vétérinaire (Université de Montréal; protocol 17-Rech-1886). An observational cross-sectional study design was chosen to evaluate dairy cows' hygiene level and odds of hock lesions.

#### **5.3.1 Herd recruitment**

We aimed at recruiting 30 cows/herd from 90 herds, of which  $\geq 20$  would be using RMS bedding for lactating cows, and the remainder would be using straw bedding (as a comparative group). This number and ratio were determined by *a priori* power estimations which were conducted for the various outcomes studied (bedding microbiota, (16); parasitic load, (15); clinical mastitis incidence, (6); bulk tank milk quality, (17); subclinical mastitis (8), hygiene, and hock lesions). The number of farms to recruit was determined mainly by the clinical mastitis outcome, which required the largest sample size (see Frechette et al. (6) for details). In the case of hygiene or hock lesions, we computed a power  $> 0.80$ , when using 30 cows/herd from 20 RMS and 70 straw-bedded herds to detect differences corresponding to  $OR > 1.5$  (or  $OR < 0.67$ ) when the reference proportion of diseased animals was 0.10 (note that a greater study power was achieved with larger reference proportion of diseased animals or with more than 20/90 RMS herds).

A list of potential RMS herds was assembled with the help of equipment dealers, veterinarians, dairy producers and through social media. Straw-bedded herds were offered to participate in the project through Dairy herd improvement association (**DHIA**; Lactanet, Ste-Anne de Bellevue, QC, Canada). To be eligible, producers needed to be within 250 km of the research facilities (Saint-Hyacinthe, QC, Canada) and to have used the same bedding for at least 6 months prior to the time of the visit.

Potential participants were contacted between July and December 2017 to verify their eligibility and willingness to participate to the study. If they were not eligible, basic demographic data such as herd size and RMS processing methods were collected to evaluate potential selection bias.

### **5.3.2 Data collection**

At the time of the visit, a questionnaire related to bedding management was completed with the producer, the buildings were visited, and various samples (milk, feces, bedding) were collected for other parts of the study (6, 8, 15-17). Finally, a convenience sample of 30 cows per herd was constituted for evaluation of hygiene and hock lesions. To be eligible, a cow needed to be lactating and housed on the bedding of interest. In the majority of the recruited herds, the 30 cows sample represented > 30% of available cows. In free stall barns, most cows were generally standing when the observer was present in the pen and thus the first thirty cows observed were scored for hygiene and hock lesions. In tie-stall barns, cows from the first thirty stalls were scored. A single trained observer (an animal health technician) did all the evaluations for all farms. The hygiene level of these cows was scored using the Canadian Bovine Mastitis Research Network hygiene chart (2022) (18). This latter chart was adapted from a similar chart developed by the University of Wisconsin-Madison and Pfizer Animal Health. With this chart, cows were assigned a score from 1 to 4 (1 being the cleanest and 4 the dirtiest) for three body regions (udder, lower legs, and flank/upper legs). On the same cows, hocks were scored for presence of lesions. Hocks could be scored from 0 to 3 (**Table 17**), 0 representing a healthy joint (19). If a hock was so dirty that it was impossible to attribute a score, it was excluded and identified as missing data. For a given cow, the hock with the highest score was used in the model.

Tableau 17. – Hock lesions score chart.

Score <sup>a</sup>	Swelling	Cutaneous wound	Hair loss
0	None	None	None
1	No swelling or swelling protrusion < 1 cm	None	Bald area
2	Swelling protrusion 1-2.5 cm	May be present	May be present
3	Swelling protrusion > 2.5 cm	May be present	May be present

<sup>a</sup>Reproduced from Dairy Farmers of Canada (19).

### 5.3.3 Outcomes studied

We computed hygiene score individually for each body region scored (i.e., one score for udder, one for lower legs, and one for flank/upper legs). For each body zone, we estimated the effect of the bedding type (RMS vs. straw) on three hygiene odds using continuation-ratio models (see details below): (1) odds of having a score  $\geq 2$  (compared to a baseline score of 1); (2) odds of having a score  $\geq 3$  (compared to scores of 1 or 2) and (3) odds of having a score of 4 (compared to scores of 1, 2, or 3). The effect of the bedding type on the hock score was similarly estimated using a continuation ratio model with three odds: (1) odds of having a score  $\geq 1$  (compared to a baseline score of 0), (2) odds of having a score  $\geq 2$  (compared to scores of 0 or 1) and (3) odds of having a score of 3 (compared to scores of 0, 1, or 2).

### 5.3.4 Statistical analysis

We first generated descriptive statistics for all dependent and independent variables. Then, bivariate relationship between all variables (dependent and independent) were evaluated to detect potential collinearity issues. To describe the association between bedding and the three hygiene scores, we used continuation-ratio models. Continuation-ratio models can be used to model the odds that an individual would move beyond a stage, once a particular stage has been reached. They are, thus, particularly well suited for ordinal categorical outcomes, such as the various health-related scores used in dairy science (20). In our case, the model was designed to evaluate the effect of the bedding type (RMS vs. straw) on the odds of being in a specified hygiene level, compared to the odds of being in any of the lower hygiene levels. Two putative confounders

previously identified with a directed acyclic graph were included in the models as covariates: housing type (free stall vs. tie-stall), and time since the last renovation of the stalls (in years). Bedding thickness (<10 cm vs.  $\geq 10$  cm of depth) was also identified as a confounder, but could not be included as an independent predictor in the model due to its perfect correlation with housing type and bedding type. Nevertheless, controlling for the first two confounders provided control for the third one, given the perfect correlation between the three confounders. A herd random intercept was included to take into consideration clustering of cows by herd. The continuation-ratio model required three distinct generalized linear mixed models with a binomial distribution and a logit function (20). Using this kind of model, one could estimate the RMS vs. straw-bedding odds ratio of having a specific hygiene score compared with lower hygiene score by exponentiating the bedding variable coefficient.

To estimate the association between bedding type and hock lesion score, a similar continuation-ratio model was used. The only difference was the outcome, which, in this case, was the odds of having a specific hock score compared with lower hock lesion score.

For each generalized linear mixed model used to construct the continuation-ratio models, the linearity assumption of the quantitative predictor (time since the last renovations of the stall) and log odds of the outcomes (hygiene or hock score) was verified by adding polynomial (square or cubic) terms after centering the predictor. Polynomial terms were retained whenever they were significant. Significance level was set at  $P < 0.05$ . Statistical analyses were carried out with SAS 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC). Datasets and SAS scripts are publicly available on <https://doi.org/10.5683/SP3/ZKBAM4>.

## **5.4 Results**

### **5.4.1 Description of herds**

Herd recruitment was previously described (6, 8, 15-17). Briefly, 49 RMS herds and 139 straw-bedded were contacted by phone to verify if they met the inclusion criteria and their willingness to participate to the study. In the RMS group 11 herds were excluded due to their geographic



location, 6 could not be contacted after multiple attempts, 4 had switched to another bedding type and, finally, one did not use the recycled manure solids as bedding for adult dairy cows. All other herds were willing to participate and these 27 herds were, therefore, recruited. In the straw group, the 139 herds contacted had already indicated to their DHI representative that they were willing to participate. Among them, 61 herds were selected on their abilities to provide computerized health data.

All farms were visited between January 15th and July 10th 2018. In the RMS group, one herd used an anaerobic digestion followed by a separation to process the solids. One herd used solids right after the separation process (green bedding), 25 others herds used a maturation process after the separation (rotating drum; n=2, maturation in heap; n=10; maturation in closed container; n=13). Length of maturation was highly variable between herds and varied from 0.4 to 9 days (median: 2.5). The median (range) number of months between visit and installation of the RMS system was 18 months (7 to 112 months). RMS herds were larger than straw herds with a median of 113 vs. 65 milking cows, respectively (**Figure 12**).

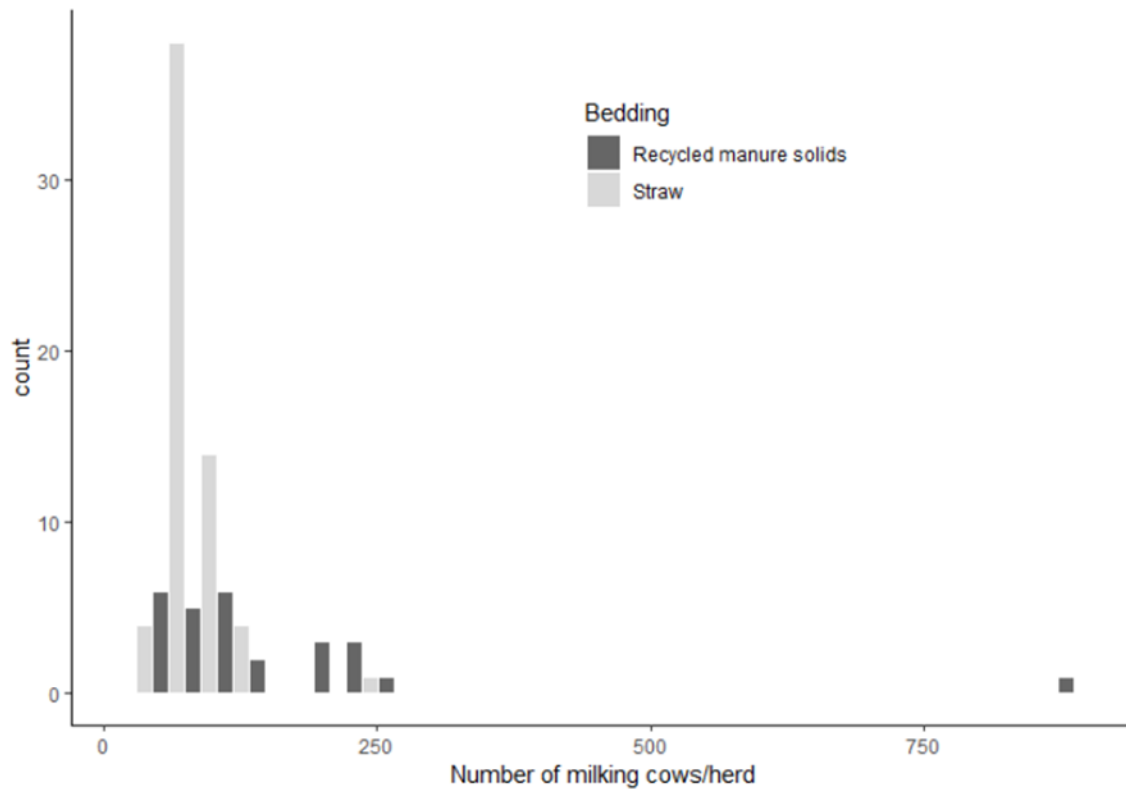


Figure 12. – Distribution of number of milking cows in the sampled herds as function of bedding type used (in the histogram, bins with equivalent number of milking cows in recycled manure solids vs. straw-bedded herds are presented next to each other to facilitate viewing).

The RMS herd size distribution, however, was very skewed due to one very large (n=900 milking cows) herd. Furthermore, RMS farm buildings were more recent, which is demonstrated by the proportion of free stall buildings (RMS: 74% vs. straw: 3%), the number of years since last renovation of the stalls (RMS: 3 vs. straw: 10), and use of deep bedding (RMS: 40% vs. straw: 0%). In the straw group, 36 farms used mattresses as the stall base, 15 used rubber mats, 6 used a combination of mattresses and rubber mats, and 4 farms used a concrete base. In the RMS group, 11 farms used mattresses as the stall base, 11 used a deep bedding system, 3 used a combination of mattresses and rubber mats, and 2 used rubber mats. Straw producers removed manure from stalls more frequently than RMS producers (median 5x/d for straw; range: 1-12 vs. 3x/d for RMS; range: 1-12). Furthermore, bedding was added more frequently to the stalls in straw farms with

a median of 2 additions/d (range: 1-4), than in RMS herds in which the median frequency was 1/d (range: 0.14-4).

## 5.4.2 Data collection

In total, 2,675 cows were evaluated (843 cows for RMS vs. 1,832 cows for straw). As planned, an average of 30 cows per herd were scored for hygiene and hock lesions (range: 29-33). A small proportion of hocks (3%; 158/5350) could not be scored for lesions due to their level of soiling. The number of hocks left unscored was not associated with the bedding type (chi-square test;  $P = 0.24$ ). Given the relatively small herd size in the studied population, in > 75% of herds, sampling of 30 cows/herd resulted in a sample representing > 30% of the available milking cows.

## 5.4.3 Hygiene

### 5.4.3.1 Udder

Udder hygiene scores were similar between the two groups (**Table 18**), but straw-bedded cows tended to have a numerically larger proportion of score 3 and 4 than RMS herds.

Tableau 18. – Percentage (number) of cow’s hygiene score by body region and bedding type obtained on 27 recycled manure solids bedded farms and 61 straw-bedded farms.

Score <sup>a</sup>	RMS bedding			Straw bedding		
	Body area			Body area		
	Udder	Lower legs	Flank/Upper legs	Udder	Lower legs	Flank/Upper legs
1	45.4 (383)	18.4 (155)	33.9 (285)	36.5 (668)	36.4 (666)	27.5 (503)
2	46.1 (389)	67.9 (572)	54.1 (455)	43.0 (787)	50.6 (926)	50.3 (921)
3	7.1 (60)	12.7 (107)	9.3 (78)	13.7 (250)	9.6 (175)	14.1 (259)
4	1.3 (11)	1.1 (9)	2.7 (23)	6.9 (127)	3.6 (65)	8.1 (149)

<sup>a</sup>Mastitis network (21).

The continuation-ratio model could not highlight any statistically significant associations between bedding type and odds of having a score  $\geq 2$  (OR RMS vs. straw: 0.62; 95%CI: 0.37, 1.03). However, RMS bedding had a protective effect on the odds of having a score  $\geq 3$  (OR: 0.43; 95%CI: 0.20, 0.95) and of having a score of 4 (OR: 0.29; 95%CI: 0.09, 0.93; **Table 19**).

#### 5.4.3.2 Lower legs

For the lower legs hygiene score, RMS-bedded cows had a greater proportion of score 2 than straw-bedded ones (**Table 18**). The model estimated that RMS had a statistically significant protective effect on the odds of: (1) having a score  $\geq 2$  (OR RMS vs. straw: 0.45; 95%CI: 0.21, 0.98); (2) having a score  $\geq 3$  (OR: 0.16; 95%CI: 0.04, 0.66); and (3) having a score of 4 (OR: 0.07; 95%CI: 0.01, 0.40; **Table 20**).

#### 5.4.3.3 Flank/upper legs

Hygiene scores for flank and upper legs were similar between the two farm groups (**Table 18**). The estimates produced by the continuation-ratio model were all in the same direction, but not statistically significant, with odds of: (1) having a score  $\geq 2$  (OR RMS vs. straw: 0.57; 95%CI: 0.30, 1.09); (2) having a score  $\geq 3$  (OR: 0.50; 95%CI: 0.20, 1.26); and (3) having a score of 4 (OR: 0.35; 95%CI: 0.11, 1.15; **Table 21**).

Tableau 19. – Udder hygiene odds ratio comparing cows housed on recycled manure solids bedding to straw-bedded cows, and estimated using continuation-ratio mixed model.

		Coefficient	SE	p	OR	CI <sup>§</sup>
Odds of score ≥ 2	Intercept <sup>†</sup>	0.68	0.11			
	Bedding type					
	RMS	-0.48	0.26	0.06	0.62	0.37, 1.03
	Straw	Ref			Ref	
	Housing type <sup>**</sup>					
	Free stall	0.01	0.28	0.96		
	Tie stall	Ref				
	Stall age <sup>**</sup>	-0.01	0.01	0.15		
	<i>Variance</i>					
Farm	0.38					
Odds of score ≥ 3	Intercept <sup>†</sup>	-1.28	0.17			
	Bedding type					
	RMS	-0.84	0.40	0.04	0.43	0.20, 0.95
	Straw	Ref			Ref	
	Housing type <sup>**</sup>					
	Free stall	-0.68	0.44	0.12		
	Tie stall	Ref				
	Stall age <sup>**</sup>	-0.04	0.01	<0.01		
	<i>Variance</i>					
Farm	0.98					
Odds of score = 4	Intercept <sup>†</sup>	-2.71	0.23			
	Bedding type					
	RMS	-1.25	0.60	0.04	0.29	0.09, 0.93
	Straw	Ref			Ref	
	Housing type <sup>**</sup>					
	Free stall	-0.68	0.66	0.31		
	Tie stall	Ref				
	Stall age <sup>**</sup>	-0.05	0.02	0.02		
	<i>Variance</i>					
Farm	1.31					

<sup>§</sup>Confidence interval of the odds ratio (OR). <sup>†</sup>Stall age was centered on 5 years. <sup>\*\*</sup>Putative confounders.

Tableau 20. – Lower legs hygiene odds ratio comparing cows housed on recycled manure solids bedding to straw-bedded cows, and estimated using continuation-ratio mixed model.

		Coefficient	SE	p	OR	CI <sup>§</sup>
Odds of score ≥ 2	Intercept <sup>†</sup>	0.80	0.17			
	Bedding type					
	RMS	-0.80	0.46	0.04	0.45	0.21, 0.98
	Straw	Ref			Ref	
	Housing type <sup>**</sup>					
	Free stall	3.07	0.46	<0.01		
	Tie stall	Ref				
	Stall age <sup>**</sup>	-0.05	0.02	0.02		
	Stall age <sup>2</sup>	7.36E-4	4.32E-4	0.09		
	<i>Variance</i>					
Farm	0.91					
Odds of score ≥ 3	Intercept <sup>†</sup>	-2.25	0.30			
	Bedding type					
	RMS	-1.82	0.71	0.01	0.16	0.04, 0.66
	Straw	Ref			Ref	
	Housing type <sup>**</sup>					
	Free stall	1.61	0.76	0.03		
	Tie stall	Ref				
	Stall age <sup>**</sup>	-0.11	0.06	0.07		
	Stall age <sup>2</sup>	3.47E-3	4.43E-3	0.43		
	Stall age <sup>3</sup>	-3.00E-5	5.60E-5	0.59		
<i>Variance</i>						
Farm	2.66					
Odds of score = 4	Intercept <sup>†</sup>	-3.47	0.28			
	Bedding type					
	RMS	-2.73	0.93	<0.01	0.07	0.01, 0.40
	Straw	Ref			Ref	
	Housing type <sup>**</sup>					
	Free stall	1.44	0.90	0.11		
	Tie stall	Ref				
	Stall age <sup>**</sup>	-0.13	0.04	<0.01		
	Stall age <sup>2</sup>	2.01E-3	7.80E-4	<0.01		
	<i>Variance</i>					
Farm	1.54					

<sup>§</sup>Confidence interval of the odds ratio (OR). <sup>†</sup>Stall age was centered on 5 years. <sup>\*\*</sup>Putative confounders.

Tableau 21. – Flank/upper legs hygiene odds ratio comparing cows housed on recycled manure solids bedding to straw-bedded cows, and estimated using continuation-ratio mixed model.

		Coefficient	SE	p	OR	CI <sup>§</sup>
Odd of score ≥ 2	Intercept <sup>†</sup>	1.18	0.14			
	Bedding type					
	RMS	-0.55	0.33	0.09	0.57	0.30, 1.09
	Straw	Ref			Ref	
	Housing type <sup>**</sup>					
	Free stall	0.17	0.35	0.63		
	Tie stall	Ref				
	Stall age <sup>**</sup>	-0.01	9.71E-3	0.18		
	<i>Variance</i>					
Farm	0.64					
Odd of score ≥ 3	Intercept <sup>†</sup>	-1.36	0.22			
	Bedding type					
	RMS	-0.70	0.47	0.14	0.50	0.20, 1.26
	Straw	Ref			Ref	
	Housing type <sup>**</sup>					
	Free stall	-0.39	0.51	0.45		
	Tie stall	Ref				
	Stall age <sup>**</sup>	-0.02	0.01	0.11		
	<i>Variance</i>					
Farm	1.49					
Odd of score = 4	Intercept <sup>†</sup>	-2.63	0.25			
	Bedding type					
	RMS	-1.04	0.60	0.08	0.35	0.11, 1.15
	Straw	Ref			Ref	
	Housing type <sup>**</sup>					
	Free stall	-0.32	0.65	0.62		
	Tie stall	Ref				
	Stall age <sup>**</sup>	-0.04	0.02	0.05		
	<i>Variance</i>					
Farm	1.63					

<sup>§</sup>Confidence interval of the odds ratio (OR). <sup>†</sup>Stall age was centered on 5 years. <sup>\*\*</sup>Putative confounders.

#### 5.4.4 Hock lesions

Straw-bedded cows had lower proportion of healthy hocks (score 0) than RMS-bedded cows and had higher proportion of score 2 hocks (**Table 22**).

Tableau 22. – Percentage (number) of cow’s hock lesion scores by bedding type on 27 recycled manure solids bedded farms and 61 straw-bedded farms.

Score <sup>a</sup>	RMS bedding		Straw bedding	
	Hock		Hock	
	Left	Right	Left	Right
0	22.7 (372)	26.2 (432)	11.2 (398)	10.5 (374)
1	42.8 (700)	43.8 (722)	46.0 (1630)	45.8 (1628)
2	33.7 (552)	29.1 (480)	42.1 (1494)	42.3 (1504)
3	0.7 (12)	1.0 (16)	0.7 (24)	1.3 (46)

<sup>a</sup>Dairy Farmers of Canada (19).

The continuation-ratio model, however, did not confirm any statistically significant association between bedding type and hock lesions. The odds ratio comparing RMS vs. straw for hock lesion score  $\geq 1$  were 0.91 (95%CI: 0.40, 2.07), the odds ratio for score  $\geq 2$  were 0.96 (95%CI: 0.53, 1.72) and, finally, the odds ratio for score of 3 were 0.43 (95%CI: 0.11, 1.73; **Table 23**).



Tableau 23. – Hock lesions odds ratio comparing cows housed on recycled manure solids bedding to straw-bedded cows, and estimated using continuation-ratio mixed model.

		Coefficient	SE	p	OR	CI <sup>§</sup>
Odds of score ≥ 1	Intercept <sup>†</sup>	2.81	0.19			
	Bedding type					
	RMS	-0.09	0.42	0.82	0.91	0.40, 2.07
	Straw	Ref			Ref	
	Housing type <sup>**</sup>					
	Free stall	-0.89	0.44	0.04		
	Tie stall	Ref				
	Stall age <sup>**</sup>	0.06	0.02	<0.01		
	<i>Variance</i>					
	Farm	0.76				
Odds of score ≥ 2	Intercept <sup>†</sup>	0.13	0.14			
	Bedding type					
	RMS	-0.04	0.30	0.89	0.96	0.53, 1.72
	Straw	Ref			Ref	
	Housing type <sup>**</sup>					
	Free stall	-0.45	0.33	0.17		
	Tie stall	Ref				
	Stall age <sup>**</sup>	0.03	0.02	0.10		
	Stall age <sup>2</sup>	-2.30E-4	3.51E-4	0.51		
	<i>Variance</i>					
Farm	0.57					
Odds of score = 3	Intercept <sup>†</sup>	-4.22	0.28			
	Bedding type					
	RMS	-0.85	0.71	0.23	0.43	0.11, 1.73
	Straw	Ref			Ref	
	Housing type <sup>**</sup>					
	Free stall	0.66	0.73	0.36		
	Tie stall	Ref				
	Stall age <sup>**</sup>	-3.70E-3	0.02	0.85		
	<i>Variance</i>					
	Farm	0.99				

<sup>§</sup>Confidence interval of the odds ratio (OR). <sup>†</sup>Stall age was centered on 5 years. <sup>\*\*</sup>Putative confounders.

## 5.5 Discussion

When adjusting our estimates for type of farm (tie-stall vs. free stall) and time since the last renovation of the stalls, we observed that using RMS bedding had, generally, a protective effect for udder and lower legs hygiene and no effect on flank/upper legs hygiene. This result differs from previous studies who have not observed differences (10-12) in cows' hygiene between beddings. This difference in results may be partly explained by the inclusion of putative confounders (housing type and stall age) in our statistical models, while previous studies did not report accounting for confounding in their study design nor analyses. For instance, in our study, not adjusting the bedding and udder hygiene relationship for confounding was biasing our OR estimates by -23 to +9% (data not shown). Similarly, for the bedding and lower leg hygiene relationship, not adjusting for confounding was creating biases of the OR of +80% (data not shown). The important magnitude of this latter bias is expected, since housing system (tie-stall vs. free stall) is strongly associated with lower leg hygiene and, in our study, with bedding type. A last design characteristic that could explain the differences between our study's conclusions and those from previously published literature, is the use of continuation-ratio models in our study, thus accounting for the four hygiene score categories, while, in previous literature, this score was most often dichotomized in two categories. Nevertheless, none of the previously mentioned studies identified RMS as being worse for hygiene level in cows, which agrees with our findings.

It is interesting to note that, even if the RMS-bedded cows studied had visually cleaner udders, they did not have lower clinical mastitis incidence (6). Conversely, the cows studied in the current research project were at much greater risk (7 times) of having clinical mastitis due to *Klebsiella pneumoniae*, than cows housed on straw bedding (6). Moreover, in these same herds, we found similar and sometimes lower counts of bacteria (including *Klebsiella* spp.) in unused and used RMS vs. straw bedding (16). Thus, the higher *Klebsiella pneumoniae* clinical mastitis incidence observed in RMS herds does not seem to be associated with an increased amount of this bacterial species in the bedding, nor with an increased dirtiness of the udder. A potential hypothesis is that this bedding type would stick more readily to the teat end, and, thus, would promote a more efficient and longer exposure of the teat end to *Klebsiella* spp. In the current study, it would have been interesting to collect teat swabs to investigate the relationship between bacterial populations in

bedding, visual udder hygiene, and teat skin pathogen populations before milk harvesting. This would have improved our understanding of this important health issue.

The lower legs cleanliness of RMS-bedded cows was unexpected. In another research, it was also found that cows housed on RMS in an experimental tie-stall farm had a wetter and softer sole than cows housed on straw (Villettaz-Robichaud, personal communication). For cows housed in tie-stall farms, where they spend all their time on this surface, this could potentially lead to sole diseases and this should be investigated in future research.

The prevalence of hock lesions was not different between the two groups. In the literature, RMS-bedded cows had, generally, poorer hock lesions scores than cows housed on sand bedding. However, if we look at performance of straw bedding specifically, some research estimated that its usage was leading to more hock lesions than RMS (13), while others concluded the opposite, with RMS-bedded cows being more at risk of severe hock lesion (11). Differences between studies may be partly due to inclusion, or not, of putative confounders related to housing type, floor surface, or stall design.

Management of hock lesions is challenging and it was demonstrated that usage of deep-bedding systems results in a decrease of hock lesions prevalence (14, 22). Others also demonstrated that bedding depth, by mitigating the impact of abrasive or hard stall base on cows, may play a more important role for the cow welfare than the bedding type itself (2). Due to its large availability once a farm is equipped, RMS is of great interest since it could be used in large amount in stalls, including deep-bedded stalls. However, RMS is considerably less dense than sand, another common bedding type used in deep bedding system (14). Therefore, when it will be used, RMS will tend to be compressed more easily than sand, which may expose the rear curb of the stalls and cause an increase in hock lesions prevalence. The latter was indeed reported with sawdust bedding in deep-bedding systems (23). This potential negative impact could be attenuated with frequent addition of bedding in stalls (21, 24). When compared to other bedding types, RMS may also be problematic for hock's health in regards to its low dry matter content. Prolonged contact

with wet bedding may compromise the integrity of the skin, which may then be prone to the development of lesions (23, 25). Finally, in our study, we found that cows housed on RMS had cleaner lower legs than cows housed on straw. While having animals with a good hygiene level is desirable, this may put them at a greater risk of developing hock lesions. As a matter of fact, dirt could serve as a sort of protective shield for the skin (25, 26).

The decision of evaluating the cow comfort based on the presence of hock lesions was in a large part driven by the study design (a large number of herds and cows to follow vs. what could have been achieved in an experimental design). Presence of hock lesions is not a robust measure of comfort, and it may be affected by several other aspects of the stalls' design (2, 25). Time since the last renovations of the stall was controlled in the model to reduce the possible impact of old, poorly designed stalls. Other factors could have been evaluated to measure the comfort, such as the number of lying bouts or duration of lying bouts (2, 27). However, recording these measures is not easily achievable in observational studies conducted on a large number of commercial farms. In an experimental study carried out in Québec (2018), the total lying time per 24 h was not different between cows housed on straw vs. RMS (Villettaz-Robichaud, personal communication).

### **5.5.1 Study strengths and limitations**

Another important confounder of the association between bedding type and hock lesions is bedding thickness (< 10 cm vs. ≥ 10 cm of depth). However, due to severe collinearity issues, bedding thickness could not be included in the model. Nevertheless, it was totally corrected by the inclusion of farm housing type, since deep-bedding systems were only found in free stall farms.

Use of a continuation-ratio model is a strength of this study and has allowed us to study each score variation (odds of being in a category to the probability of being in any lower category) and its relation with bedding type (20). With ordinal data (e.g., hygiene or hock scores) the use of linear regression models would not be appropriate, since scores are not quantitative variables (i.e., an increase of one unit, does not necessarily represent the same fixed quantity when going

from a score of 1 to a score of 2 vs. when going from a score of 2 to a score of 3). The other approach that was often used in the literature was to dichotomise the multinomial score into two categories (e.g., 1-2 vs. 3-4). But this latter approach tends to oversimplify the outcome. Indeed, why would we use four points scoring system if the issue at end was truly a yes/no answer? There is a gradation when measuring hygiene, hock lesions, and many other animal scores. The continuation-ratio is quite a simple and efficient method for maintaining this gradation in the analysis phase.

On the other hand, our project presents some limitations due to the observational design. Herds using RMS or straw bedding were selected using different methods; mainly a census of available herds for RMS vs. a selection within DHI participating herds for straw. Nevertheless, 80% of RMS herds were also participating in regular DHI monitoring, thus limiting a potential selection bias. Besides, residual confounding may still be present, although we adjusted our models for the confounders we think had the most impact on the measured associations. Other unmeasured confounders may distort associations in an unpredictable direction and amplitude. Furthermore, the generalizability of our results may be limited to the Quebec province due to the sample population characteristics (predominance of tie-stall farms, small/medium sized herds). Besides, an experimental design would be of great interest to confirm our results, but is unlikely to be conducted given the cost of equipment and the installations required. Another option would be to follow farms transitioning to RMS bedding and record data on health before and after the transition. With time, more studies will be available and meta-analysis or literature reviews of these studies will help us contextualize our results on a larger scale.

Finally, it is important to emphasize that many other, and, perhaps, more important factors can affect hygiene of dairy cows and/or hock lesions prevalence (25). For instance, width of the passageways, stocking density, cleaning frequency could all have greater impact on cows' hygiene than the actual type of bedding used. Similarly, stall design (length, width, position of brisket board or neck rail, lunge space, curb, etc.) certainly has a greater impact on risk of developing hock lesions than bedding type (2).

## **5.6 Conclusion**

In herds in Quebec, cows housed on RMS bedding had, generally better udder and lower legs hygiene than straw-bedded ones. No difference was found between the two bedding types regarding hygiene of the flank/upper legs body region. Furthermore, no difference in odds of hock lesions was detected between RMS-bedded cows and straw-bedded ones.

## **5.7 Data availability statement**

The datasets presented in this study can be found in online repositories. The names of the repository/repositories and accession number(s) can be found at: <https://doi.org/10.5683/SP3/ZKBAM4>.

## **5.8 Ethics statement**

The animal study was reviewed and approved by Animal Care and Use Committee of the Faculty of Veterinary Medicine (Université de Montréal; protocol 17-Rech-1886). Written informed consent was obtained from the owners for the participation of their animals in this study.

## **5.9 Author contributions**

SD and GF designed the study. AF collected and analyzed data with SD supervision. AF wrote the first draft of the paper which has been subsequently reviewed and approved by GF and SD. All authors approved the final version of the paper before the submission process.

## **5.10 Funding**

This project was funded by grants from Novalait, the Consortium de recherche et innovations en bioprocédés industriels au Québec (#2015-044-C17), the Fonds Québécois de la recherche sur la nature et les technologies (#2017-LG-201835) and the Natural sciences and engineering research council of Canada (#CRDPJ 499421-2016). The first author (A.F.) received funding and support from the Natural sciences and engineering research council of Canada Collaborative research and training experience program in milk quality, from the Canadian Dairy Commission, from Fondation Agria, and from Op+lait.

## 5.11 References

1. WOAAH. Introduction to the Recommendations for Animal Welfare. Chapter 7.1 p. 333–5. (2019). Available online at: [https://rr-europe.woah.org/wp-content/uploads/2020/08/oie-terrestrial-code-1\\_2019\\_en.pdf](https://rr-europe.woah.org/wp-content/uploads/2020/08/oie-terrestrial-code-1_2019_en.pdf) (accessed May 05, 2022).
2. McPherson SE, Vasseur E. Graduate student literature review: the effects of bedding, stall length, and manger wall height on common outcome measures of dairy cow welfare in stall-based housing systems. *J Dairy Sci.* (2020) 103:10940–50. doi: 10.3168/jds.2020-18332
3. ProAction. Manuel de Référence ProAction, Chapter 1. p. 1–10. (2021). Producteurs laitiers du Canada. Available online at: <http://www.proaction.quebec/wp-content/uploads/2021/08/proAction-Manuel-de-re%CC%81fe%CC%81rence-juillet-2021-FR.pdf> (accessed May 2022).
4. Leach KA, Archer SC, Breen JE, Green MJ, Ohnstad IC, Tuer S, et al. Recycling manure as cow bedding: Potential benefits and risks for UK dairy farms. *Vet J.* (2015) 206:123–30. doi: 10.1016/j.tvjl.2015.08.013
5. Godbout S. Litière recyclée en production laitière: État des connaissances et balises. CRSAD-IRDA (2019).
6. Frechette A, Fecteau G, Cote C, Dufour S. Clinical mastitis incidence in dairy cows housed on recycled manure solids bedding: a canadian cohort study. *Front Vet Sci.* (2021) 8:742868. doi: 10.3389/fvets.2021.742868
7. Harrison E, Bonhotal J, Schwarz M. Using Manure Solids as Bedding. Ithaca, NY: Cornell Waste Management Institute (2008).
8. Frechette A, Fecteau G, Cote C, Dufour S. Association between recycled manure solids bedding and subclinical mastitis incidence: a canadian cohort study. *Front Vet Sci.* (2022) 9:859858. doi: 10.3389/fvets.2022.859858

9. Rowbotham RF, Ruegg PL. Associations of selected bedding types with incidence rates of subclinical and clinical mastitis in primiparous Holstein dairy cows. *J Dairy Sci.* (2016) 99:4707–17. doi: 10.3168/jds.2015-10675
10. Patel K, Godden SM, Royster E, Crooker BA, Timmerman J, Fox L. Relationships among bedding materials, bedding bacteria counts, udder hygiene, milk quality, and udder health in US dairy herds. *J Dairy Sci.* (2019) 102:10213–34. doi: 10.3168/jds.2019-16692
11. Lombard JE, Tucker CB, von Keyserlingk MA, Koprak CA, Weary DM. Associations between cow hygiene, hock injuries, and free stall usage on US dairy farms. *J Dairy Sci.* (2010) 93:4668–76. doi: 10.3168/jds.2010-3225
12. Esser NM, Su H, Coblenz WK, Akins MS, Kieke BA, Martin NP, et al. Efficacy of recycled sand or organic solids as bedding sources for lactating cows housed in freestalls. *J Dairy Sci.* (2019) 102:6682–98. doi: 10.3168/jds.2018-15851
13. Adams AE, Lombard JE, Fossler CP, Roman-Muniz IN, Koprak CA. Associations between housing and management practices and the prevalence of lameness, hock lesions, and thin cows on US dairy operations. *J Dairy Sci.* (2017) 100:2119–36. doi: 10.3168/jds.2016-11517
14. Husfeldt AW, Endres MI. Association between stall surface and some animal welfare measurements in freestall dairy herds using recycled manure solids for bedding. *J Dairy Sci.* (2012) 95:5626–34. doi: 10.3168/jds.2011-5075
15. Lasprilla-Mantilla MI, Wagner V, Pena J, Frechette A, Thivierge K, Dufour S, et al. Effects of recycled manure solids bedding on the spread of gastrointestinal parasites in the environment of dairies and milk. *J Dairy Sci.* (2019) 102:11308–16. doi: 10.3168/jds.2019-16866
16. Beauchemin J, Frechette A, Theriault W, Dufour S, Fravallo P, Thibodeau A. Comparison of microbiota of recycled manure solids and straw bedding used in dairy farms in eastern Canada. *J Dairy Sci.* (2021) 105:389–408. doi: 10.3168/jds.2021-20523



17. Gagnon M, Hamelin L, Frechette A, Dufour S, Roy D. Effect of recycled manure solids as bedding on bulk tank milk and implications for cheese microbiological quality. *J Dairy Sci.* (2020) 103:128–40. doi: 10.3168/jds.2019-16812
18. Network, M. (2022). Cow Hygiene Evaluation. Mastitis Network.
19. Dairy Farmer of Canada (DFC). Blessures aux jarrets, aux genoux et au cou. (2017). Dairy Farmers of Canada. Available online at: [https://www.dairyresearch.ca/francais/pdf/injury\\_fr.pdf](https://www.dairyresearch.ca/francais/pdf/injury_fr.pdf) (accessed September 2017).
20. Dohoo IWM, Stryhn H. Veterinary Epidemiologic Research. Charlottetown, PEI, Canada: VER Inc (2009).
21. Fulwider WK, Grandin T, Garrick DJ, Engle TE, Lamm WD, Dalsted NL, et al. Influence of free-stall base on tarsal joint lesions and hygiene in dairy cows. *J Dairy Sci.* (2007) 90:3559–66. doi: 10.3168/jds.2006-793
22. Tucker CB, Weary DM, Fraser D. Effects of three types of free-stall surfaces on preferences and stall usage by dairy cows. *J Dairy Sci.* (2003) 86:521–9. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(03)73630-3
23. Weary DM, Tazskun I. Hock lesions and free-stall design. *J Dairy Sci.* (2000) 83:697–702. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(00)74931-9
24. Kester E, Holzhauser M, Frankena K. A descriptive review of the prevalence and risk factors of hock lesions in dairy cows. *Vet J.* (2014) 202:222–8. doi: 10.1016/j.tvjl.2014.07.004
25. Jewell MT, Cameron M, Spears J, McKenna SL, Cockram MS, Sanchez J, et al. Prevalence of hock, knee, and neck skin lesions and associated risk factors in dairy herds in the Maritime Provinces of Canada. *J Dairy Sci.* (2019) 102:3376–91. doi: 10.3168/jds.2018-15080
26. Potterton SL, Green MJ, Millar KM, Brignell CJ, Harris J, Whay HR, et al. Prevalence and characterisation of, and producers' attitudes towards, hock lesions in UK dairy cattle. *Vet Rec.* (2011) 169:634. doi: 10.1136/vr.d5491

27. Cook NB, Marin MJ, Mentink RL, Bennett TB, Schaefer MJ. Comfort Zone-design free stalls: do they influence the stall use behavior of lame cows? *J Dairy Sci.* (2008) 91:4673–8. doi: 10.3168/jds.2007-0910

## 6 Association between recycled manure solids bedding and subclinical mastitis incidence: a Canadian cohort study

Annie Fréchette<sup>1,2,3</sup>, Gilles Fecteau<sup>1,4</sup>, Caroline Côté<sup>1,3,5</sup> and Simon Dufour<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Regroupement FRQ-NT Op+Lait, Saint-Hyacinthe, QC, Canada

<sup>2</sup>Mastitis Network, Saint-Hyacinthe, QC, Canada

<sup>3</sup>Department of Pathology and Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Université de Montréal, Montreal, QC, Canada

<sup>4</sup>Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Université de Montréal, Montreal, QC, Canada

<sup>5</sup>Research and Development Institute for the Agri-Environment (IRDA), Québec City, QC, Canada

This article was published in *Frontiers in Veterinary Science* (veterinary epidemiology and economics section).

**Citation** : Fréchette A, Fecteau G, Côté C and Dufour S (2022) Association Between Recycled Manure Solids Bedding and Subclinical Mastitis Incidence: A Canadian Cohort Study. *Front. Vet. Sci.* 9:859858. doi: 10.3389/fvets.2022.859858

## 6.1 Abstract

Recycled manure solids (**RMS**) are increasingly used as bedding for dairy cows. However, potential impact of RMS bedding on animal health is not well described. The objective of this study was to evaluate subclinical mastitis incidence in cows housed on RMS bedding. Twenty RMS farms and a comparative group of 60 straw-bedded farms were enrolled in a 1-year longitudinal study (2018–2019). Data from 11,031 dairy cows were collected. Variations of individual somatic cell count were evaluated using three different methods. First, we compared the cow's mean lactation linear score between cows housed on the two bedding types. Then, we compared across bedding types the risk for a given cow of having a milk test with a linear score  $\geq 4$ . Finally, we evaluated the dynamics of somatic cell count using pairs of tests within a cow. More specifically, we considered that only pairs of DHI tests where the first test yielded a linear score  $< 4$  were at risk of an incident subclinical mastitis event. Then, we defined a newly acquired subclinical mastitis when the second test was  $\geq 4$ . All models were adjusted for putative confounders. We could not highlight a significant association between bedding type and cow's mean lactational linear score (least square mean of 2.47 in cows from RMS farms vs. 2.37 in straw farms; 95%CI for linear score's difference:  $-0.20, 0.40$ ). Furthermore, we could not find an association between bedding type and the risk of a high linear score ( $\geq 4$ ). For the latter, cows housed on RMS had 0.93 times the risk of having a high linear score than straw-bedded cows (%95 CI: 0.68, 1.28). Moreover, cows on recycled manure solids farms had 0.73 time the risk of acquiring subclinical mastitis when compared to straw-bedded farms. Again, this risk was not statistically significant (%95 CI: 0.54, 1.00). In our study, RMS bedding was not associated with subclinical mastitis, as measured by somatic cell count, when compared to cows housed on a more conventional bedding, straw bedding.

**Keywords:** bedding, subclinical mastitis, somatic cell count, recycled manure solids (RMS), dairy cows

## 6.2 Introduction

Dairy producers have a growing interest for using recycled manure solids (**RMS**) as bedding. Although RMS is used in several countries, scientific data on the impact of this product on cow's health are scarce. Due to the nature of RMS, there are concerns about the pathogen load in this bedding and the resulting risks for cow's and farmworkers' health. Pathogens such as *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* and *Cryptosporidium* spp. have been isolated from fresh unused RMS bedding (1, 2). Furthermore, *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*, the pathogen responsible of Johne's disease, was also found in unused RMS bedding samples (3).

It has been demonstrated that using RMS bedding influences bulk tank milk microbiota (4). Moreover, bulk tank milk bacterial counts of some bacterial species such as *Streptococcus* spp. And *Streptococcus*-like organisms were higher in farms using RMS compared to other organic beddings (5). It is not clear, however, whether RMS bedding affects bulk milk through a change in mammary gland microbiota, or later by contamination during milk harvesting. Thus, it is still debatable as whether RMS bedding can be used on dairies, without negatively affecting udder health. Some studies have not found an increased risk of total (i.e., all causes together) clinical mastitis (**CM**) cases when RMS bedding is used (6, 7). Others have estimated a higher monthly incidence of CM (4.7%) in RMS-bedded cows compared to cows housed on reclaimed sand (2.1%) (5). Few studies have investigated the effect of RMS on pathogen-specific CM risk, but, in one study, the risk of CM due to *Klebsiella pneumoniae*, specifically, was seven times higher in cows housed on RMS compared to cows housed on straw (7).

Beyond CM, another important measure of udder health is subclinical mastitis (**SCM**). Subclinical mastitis is defined as presence of inflammation in the mammary gland, without observable signs of disease (8). It is often measured using somatic cells count (**SCC**) or linear cells score (**LS**) (9). The latter involves a logarithmic transformation of SCC, and is used because of the very skewed distribution of SCC in most herds (10). In an experimental study, Rowbotham and Ruegg found no association between use of RMS bedding and incidence of SCM (defined as a monthly milk sample with SCC > 200,000 cells/ml) in primiparous cows (6). In an observational study conducted by the Cornell Waste Management Institute (3) in a 1,600 cows herd, the type of bedding used (RMS vs.

sand) did not affect the animal's SCC. In a literature review published in 2015, Leach et al. concluded that there was no consistent impact of RMS usage on SCC. On the other hand, use of RMS bedding was recently associated with poorer udder health measures such as the average test day LS, the proportion of cows on test day with a LS  $\geq 4.0$ , and the proportion of cows with a chronic infection when compared to herds using other types of bedding (5).

Objectives of the current study were to contribute to the knowledge on the associations between RMS bedding and SCM by investigating its association with the cows' lactation mean linear score, the risk of SCM on a given test day, and the risk of SCM acquisition, when compared to cows housed on straw bedding. We hypothesized that, given that bedding type would mainly influence intramammary infections of environmental origin, and given that these latter infections have lower impact on the SCC than contagious pathogens, there would be small or no associations between bedding type and SCC-based measures of inflammation. This paper is part of a larger project where we have studied parasitic load and survival in RMS bedding (1), RMS bedding bacteriological content and microbiota (2), the effect of RMS on pathogen-specific CM incidence (7), and the effect of RMS bedding on bulk milk quality (4).

## **6.3 Materials and methods**

This project was approved by the Animal Care and Use Committee of the Faculty of Veterinary Medicine (Université de Montréal; protocol 17-Rech-1886). We conducted an observational cohort study on commercial dairy farms. This paper was elaborated in agreement with the STROBE-Vet statement (11).

### **6.3.1 Herd recruitment**

We aimed at recruiting 90 herds, of which  $\geq 20$  would be using RMS bedding for lactating cows, and the remainder would be using straw bedding (as a comparative group). This number and ratio were determined by *a priori* power estimations which were conducted for the various outcomes studied [bedding microbiota, (2); parasitic load, (1); clinical mastitis incidence, (7); bulk tank milk quality, (4); subclinical mastitis, hygiene, and comfort]. The number of farms to recruit was determined mainly by the clinical mastitis outcome, which required the largest sample size [see

Frechette et al. (7) for details]. Herds using RMS bedding were first identified by contacting equipment dealers, veterinarians, and social media. Straw-bedded herds were invited to participate to the study by the local dairy herd improvement (DHI) company (Lactanet, Ste-Anne-de-Bellevue, QC, Canada). To be included in the study, all farms needed to be within 250 km of the research facilities (Saint-Hyacinthe, QC, Canada) and to have used the same type of bedding for lactating cows for at least 6 months at the time of the visit. Straw-bedded farms needed to record production data using DHI to facilitate the data collection. However, this was not requested for RMS farms since we wanted to recruit as many RMS farms as possible.

All eligible farms were contacted by telephone between July and December 2017 to verify their eligibility and willingness to participate to the project. Descriptive data (such as farm size and type of equipment used for producing bedding) were gathered from RMS herds that did not meet the inclusion criteria.

### **6.3.2 Data collection**

Farmers agreed to share their monthly DHI data for the follow-up period (1 year following the visit of the farm). In the straw group, we selected herds that also used a software to record their individual cow's health data. In the RMS group, some farmers were not participating in regular DHI program. When milking system recordings of SCC were available, these data were obtained. Producers with no DHI and no milking system-based SCC were excluded from the subsequent analyses. For SCC data obtained from the milking system, the data were converted as described by Deng et al. (12) to generate a dataset that was uniform between herds participating or not in DHI. Briefly, a daily mean LS based on a 24 h period was computed and, subsequently, a monthly average LS was generated.

### **6.3.3 Outcomes studied**

We analyzed SCM using three different outcomes. First, we computed the cow's lactational mean LS. Secondly, we computed, for each cow, the number of DHI tests with a  $LS \geq 4$  among the number of available DHI tests. Finally, we computed, for each cow, the number of incidents SCM events among all the periods at risk for that cow. For this third outcome, DHI tests were considered in pairs. During the period between two DHI tests, a cow was defined as being at risk

of developing a SCM if it had a  $LS < 4$  on the first test of the pair. Among cows at risk of acquiring a SCM, an incident SCM was deemed to have occurred if a  $LS \geq 4$  was observed on the second test. If one of the tests had a missing data, the correspondent test pair was discarded from the analyses. For this third outcome, we were, therefore, able to calculate, for each animal, the sum of SCM events during the study period and the total number of days at risk, as described by Dufour et al. (13).

#### **6.3.4 Statistical analysis**

To describe the effect of bedding type (RMS vs. straw) on the cow's lactational mean LS, we used a linear mixed regression model. In this model, the outcome was the lactational mean LS and the main predictor was the bedding type. A cow and a herd random intercepts were used to capture the variation due to clustering of lactations by cows and of cows by herd, respectively. A number of putative confounders previously identified using directed acyclic graphs were included in the models to control for confounding: housing type (free stall vs. tie-stall), bedding thickness ( $<10$  vs.  $\geq 10$  cm of depth), time since the last renovation of the stalls (in years), and herd size (number of milking cows at the time of the visit). For a covariate to be considered as a putative confounder, and thus for inclusion in our models, we applied the following criteria (14): (1) the covariate is a determinant of the exposure in the source population; (2) the covariate is a cause or a surrogate for a cause of the disease; and (3) the covariate is not caused by the exposure nor the disease.

In our second model, the outcome was the number of tests with a  $LS \geq 4.0$  for a given cow during the study period. To model the effect of bedding on this outcome, we used a generalized linear mixed model with a negative binomial distribution, a log function, and the logarithm of the number of milk tests available for this cow as an offset. Again, the main predictor was the bedding type and the same putative confounders described in the first model were included. Finally, a herd random intercept was included to consider the clustering of cows by herds. Thus, using this model one could compute the incidence rate ratio of having SCM in RMS farms as compared to straw-bedded farms simply by exponentiating the bedding variable coefficient.

In our third and last model, the outcome was the number of times a cow acquired a SCM during the study period. To estimate the bedding effect on that variable, we used a generalized linear



mixed model with a negative binomial distribution, a log function, and the logarithm of days at risk for that cow as an offset. Putative confounders and a herd random intercept were, again, included in the model. The incidence rate ratio of having an incident SCM in cows bedded with RMS vs. straw could then be computed by exponentiating the bedding variable coefficient.

For each modeling approach, the assumption of linearity between the quantitative predictors (time since the last renovations of the stall and herd size) and the different outcomes was verified by adding polynomial terms (square and cubic terms) after centering the predictor. Polynomial terms were kept in the model whenever they were significant. The significance level was set at  $P < 0.05$ . If overdispersion was present in the data, defined as a Pearson chi-square  $> 1.2$ , then robust variance was used. Statistical analyses were performed with MLwin 3.05 (U of Bristol) for the first model and SAS 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC) for the second and third model. Finally, normality and homoscedasticity of residuals were evaluated at all levels of the hierarchy (lactation, cow and herd level; for the MLwin analyses), or using marginal residuals (for SAS analyses). The data, the MLwin model and the SAS scripts are publicly available on <https://doi.org/10.5683/SP3/GRPK8W>.

## **6.4 Results**

### **6.4.1 Herds description**

Herds recruited were part of a larger study on RMS bedding and were described elsewhere (1, 2, 4, 7). Briefly, we contacted 49 RMS farms and 139 straw farms to verify their willingness to participate and to evaluate whether they met the inclusion criteria. In the RMS group we excluded 11 farms that were outside the geographic location, six that could not be joined after multiple attempts, four that had changed their bedding to a conventional bedding, and one that was misidentified as using RMS bedding. In total, 27 RMS farms and 61 straw farms were initially enrolled in the study. All had Holstein cows with the exception of one Ayrshire herd (straw bedding), and one Brown Swiss herd (straw bedding).

As can be seen in **Figure 13**, RMS farms produced their bedding with various methods. One farm used an anaerobic digester followed by a separation process and one farm used the bedding immediately after the separation process. The other 25 RMS farms let the RMS mature for various amount of time following the separation process (median: 2.5 days; range: 0.4–9 days). Ten of them let it rest in a single heap, 13 in a closed container, and two used a rotative drum.

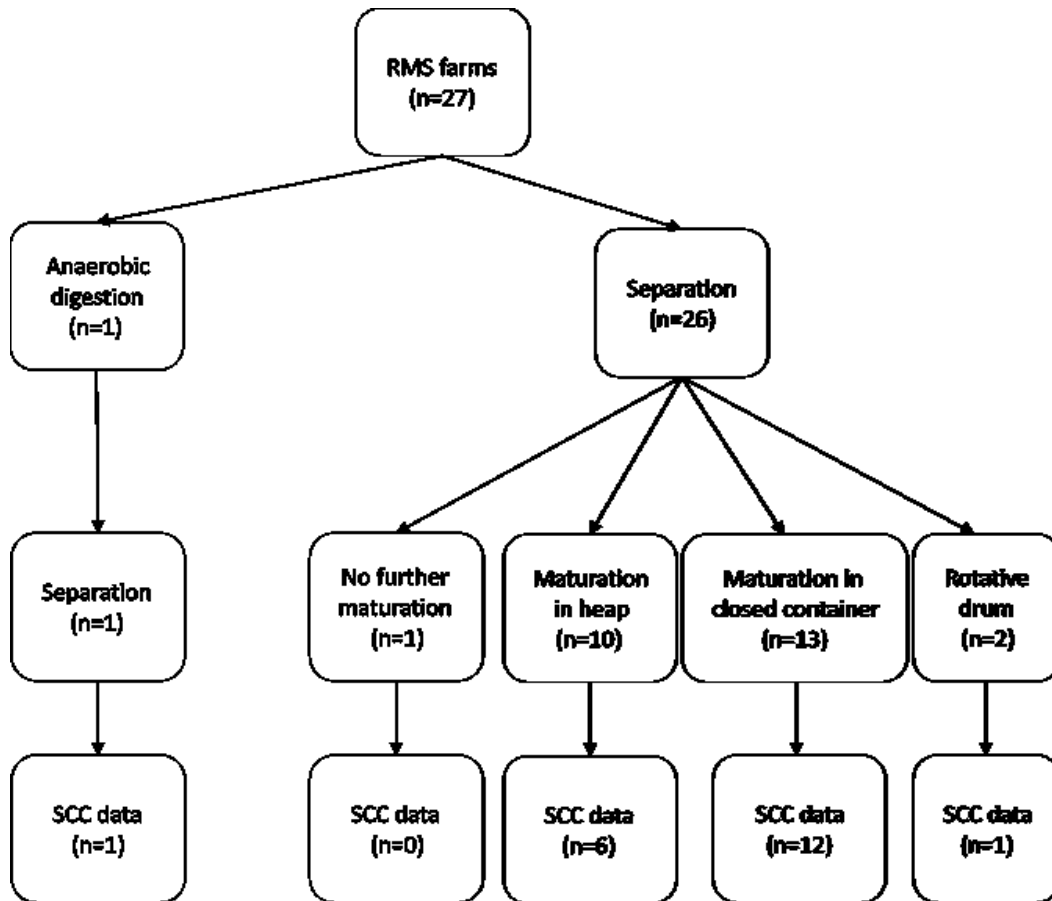


Figure 13. – Description of the farms’ recycled manure solids (RMS) bedding production procedures and of somatic cell count (SCC) data availability.

The earliest initial farm visit was conducted on January 15<sup>th</sup> 2018, and the latest was conducted on July 10<sup>th</sup>, 2018. DHI data were collected, on each farm, for 1 year following the farm visit. Seven RMS herds were excluded of the SCC analyses because their automatic milking system (Delaval, Milkomatic, GEA or Boumatic) did not record any SCC data. Demographic details about the farms with SCC data are shown in **Table 24**. Briefly, RMS farms were larger and had renovated the stalls more recently than straw farms. Furthermore, RMS farms were predominantly free stall, and

almost half of them were using a deep-bedding ( $\geq 10$  cm) system. There were six herds using automatic milking system in our group of 20 RMS herds with SCC data. Four herds had a Lely robot (which recorded SCC data) and two herds, even if they had robots (1 DeLaval and 1 GEA), were DHI participants. Three farms did not have a complete year of follow-up due to a change in the type of bedding during the year (1 straw farm) or if they experienced a fire (1 RMS farm and 1 straw farm).

Tableau 24. – Description of the 20 recycled manure solids farms and 60 straw farms with SCC data included in the study on subclinical mastitis.

	RMS bedding	Straw bedding
	Median (range)	Median (range)
Number of milking cows	113 (55-900)	65 (43-229)
Somatic cell count <sup>*</sup>	170 (110-304)	187.5 (69-384)
Number of years since the last renovations of the stalls	3 (1-23)	10 (0-70)
Proportion of free stall farms (%)	75	3
Proportion of farms with bedding depth $\geq 10$ cm (%)	40	0
Proportion of farms using an automatic milking system (%)	30	3
Proportion of farms participating in DHI (%)	80	100

<sup>\*</sup>Mean somatic cell count of the 12 months preceding the farm visit (x 1,000 cells/mL).

#### 6.4.2 Data collection

Although the participation of straw farms to DHI was a selection criterium, one farm quitted DHI after its recruitment and, therefore, did not collect data during the follow-up period. We have consequently collected DHI data for 60 straw-bedded farms. Sixteen of the RMS farms were also part of the DHI program. Among the 10 additional RMS farms that used an automatic milking

system, we were able to obtain SCC data for four farms. We were, therefore, able to collect SCC data for 20 RMS farms. We followed 15,161 lactations from 11,031 cows during the study period (4,618 cows housed on RMS bedding and 6,413 cows housed on straw bedding).

### 6.4.3 Model 1: Impact of bedding type on the cow mean lactation LS

For this first model, we obtained data from 15,161 lactations of 11,031 cows which, on average, contributed 1.4 lactation each (range: 1–2). Participating herds had an average of 138 cows (range: 34–1354). The median (interquartile range) number of tests per lactation recorded during the study was 4 (2–7). As we can see in **Figure 14**, the mean lactational linear score distributions were very similar in the two farm groups.

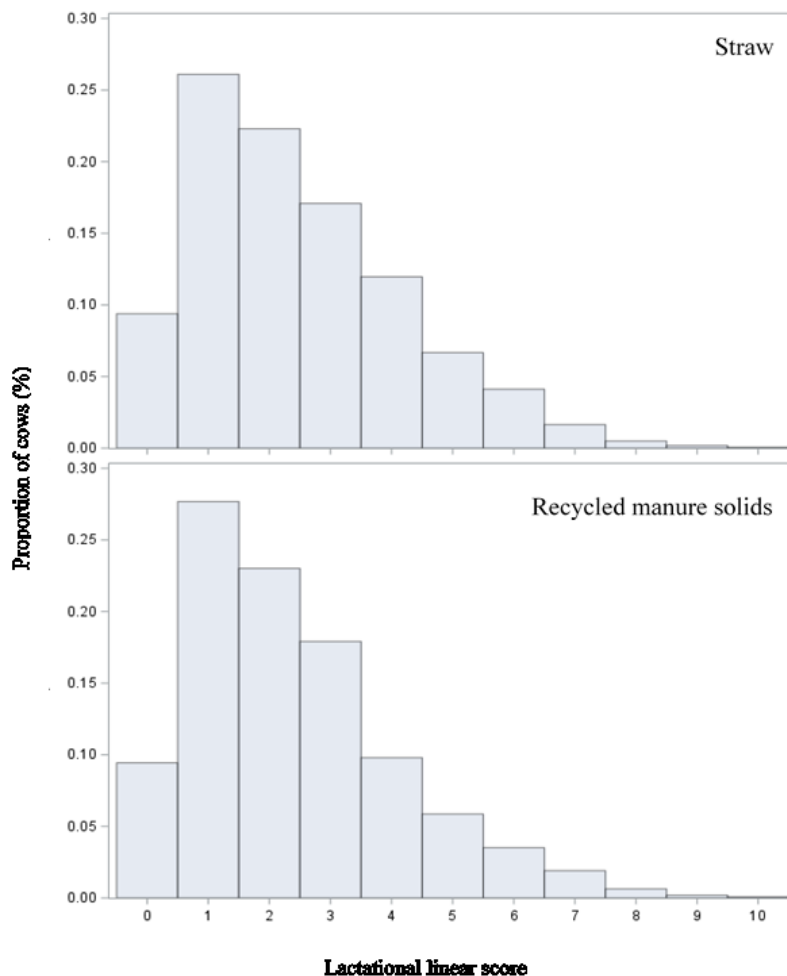


Figure 14. – Cow’s mean lactational linear score distributions by bedding type for 15,161 lactations of 11,031 cows from and 60 straw-bedded farms (top) and 20 RMS farms (bottom).

After adjusting for putative confounders, we did not find a significant association between bedding type and mean lactation LS, with a mean LS of 2.47 in RMS farms compared to a mean LS of 2.37 in straw farms (**Table 25**). Mean lactational LS was estimated to be 0.10 points higher in RMS farms (95%CI: -0.20, 0.40).

Tableau 25. – Impact of bedding on the cow’s mean lactation linear score estimated using a generalized linear mixed model using the data from 15,161 lactations of 11,031 cows from 20 recycled manure solids (RMS) farms and 60 straw-bedded farms.

	Coefficient	SE	CI	p
Intercept <sup>†</sup>	2.37	0.06	2.25, 2.49	
<b>Bedding type</b>				
RMS	0.10	0.15	-0.20, 0.40	0.50
Straw	Ref			
<b>Housing type<sup>**</sup></b>				
Free stall	0.25	0.17	-0.09, 0.59	0.15
Tie stall	Ref			
<b>Bedding depth<sup>**</sup></b>				
≥ 10 cm	-0.06	0.19	-0.44, 0.32	0.77
< 10 cm	Ref			
Stall age <sup>‡,**</sup>	0.09	0.04	0.01, 0.17	0.04
Herd size <sup>*,**</sup>	-0.11	0.04	-0.2, -0.02	0.01
<i>Variance</i>				
Farm	0.11			
Cow	0.93			
Lactation	1.88			

<sup>†</sup>Stall age and herd size were centered on 5 years and 100 cows, respectively. The intercept, therefore, represents the cows’ mean LS for a cow in a 100 milking cows herd that had renovated its stalls 5 years ago. <sup>‡</sup>Coefficient represent an increase of 10 years. <sup>\*</sup>Coefficient represent an increase of 100 cows. <sup>\*\*</sup>Putative confounders.

#### 6.4.4 Model 2: Impact of bedding type on risk of a test with $LS \geq 4$ for a given cow

In this model we used data from 11,031 cows. On average, data from 138 cows per herd (range: 34–1,354) were available. The distribution of the cow's proportion of milk tests with a  $LS \geq 4$ , as function of bedding type, is illustrated in **Figure 15**.

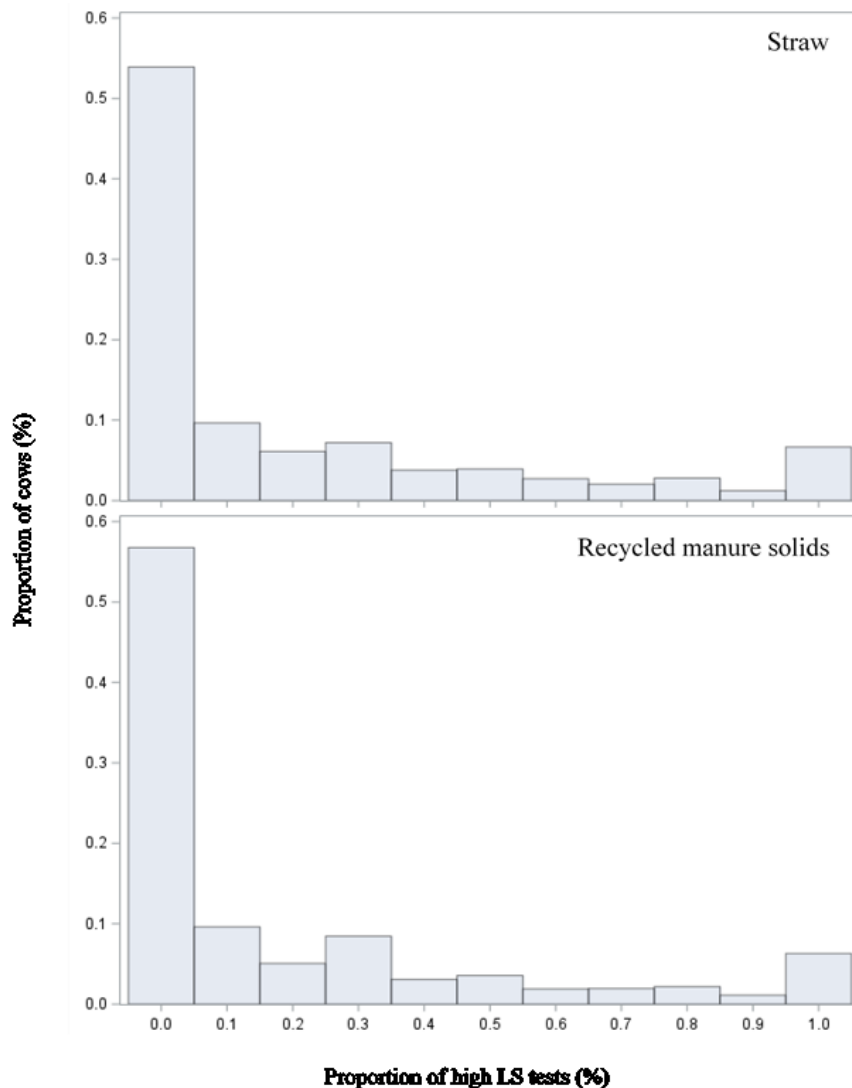


Figure 15. – Distributions of the cow's proportion of milk tests with a linear score  $\geq 4$  by bedding type for 11,031 cows 60 straw-bedded farms (top) and from 20 recycled manure solid farms (bottom).

The relationship between herd size and this outcome appeared to be non-linear on the logarithmic scale. Therefore, the square and cubic polynomial herd size terms were retained in the model. After adjusting for confounding, RMS-bedded cows had a 0.93 times (%95 CI: 0.68, 1.28) the risk of having a LS  $\geq$  4.0 than straw-bedded cows (**Table 26**).

Tableau 26. – Impact of bedding type on the risk of a DHI test with a linear score  $\geq$  4.0 in 11,031 cows from 20 RMS farms and 60 straw-bedded farms and estimated using a generalized linear mixed model.

	Coefficient	SE	p	IR	CI <sup>§</sup>
Intercept <sup>†</sup>	-1.71	0.06			
<b>Bedding type</b>					
RMS	-0.07	0.16	0.65	0.93	0.68, 1.28
Straw	Ref				
<b>Housing type<sup>**</sup></b>					
Free stall	-0.04	0.17	0.82	0.96	0.69, 1.34
Tie stall	Ref				
<b>Bedding depth<sup>**</sup></b>					
$\geq$ 10 cm	0.09	0.19	0.65	1.09	0.75, 1.59
< 10 cm	Ref				
Stall age <sup>†, **</sup>	0.07	0.04	0.08	1.07	0.99, 1.19
Herd size <sup>*, **</sup>	-0.14	0.11	0.22	0.87	0.70, 1.08
Herd size <sup>2</sup>	8.20E-6	0.00	<0.01		
Herd size <sup>3</sup>	-8.26E-9	0.00	<0.01		
<b>Variance</b>					
Farm	0.10				

<sup>§</sup>Confidence interval of the incidence ratio (IR). <sup>†</sup>Stall age and herd size were centered on 5 years and 100 cows, respectively. The intercept, therefore, represents the cow's log risk of having a linear score > 4.0 for a cow in a 100 milking cow herd that had renovated its stalls 5 years ago. <sup>†</sup>Coefficient represent an increase of 10 years. <sup>\*</sup>Coefficient represent an increase of 100 cows. <sup>\*\*</sup>Putative confounders.

### 6.4.5 Model 3: Impact of bedding type on risk of acquisition of SCM

In this last model we used 43,546 pairs of DHI tests from 11,031 cows. Distribution of incidence of SCM episodes by bedding type is illustrated in **Figure 16**.

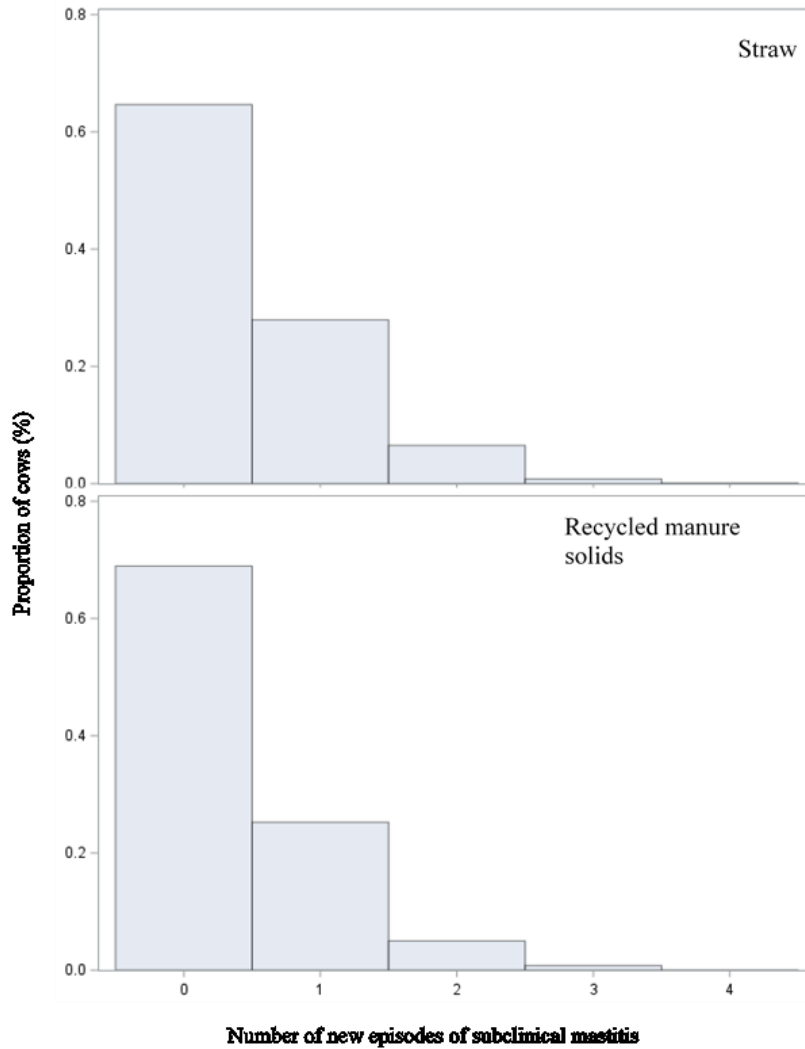


Figure 16. – Distributions of number of newly acquired subclinical mastitis (defined as a linear score < 4.0 on first test followed by a linear score  $\geq 4.0$  on second test) for a given cow by bedding type in 43,546 pairs of DHI tests from 11,031 cows from 60 straw-bedded farms (top) and from 20 RMS farms (bottom).

Again, the relationship between herd size and the outcome appeared to be non-linear on the logarithmic scale. The square and cubic polynomial herd size terms were, therefore, retained in the model. After controlling the putative confounders, the risk of acquiring a new SCM in RMS-



bedded cows was estimated to be 0.73 times (%95 CI: 0.54, 1.00) that of cows housed on straw (Table 27).

Tableau 27. – Risk of acquiring a new subclinical mastitis as function of bedding type estimated using a generalized linear mixed model applied to 43,546 pairs of DHI tests from 11,031 cows from 20 RMS farms and 60 straw-bedded farms.

	Coefficient	SE	p	IR	CI <sup>§</sup>
Intercept <sup>†</sup>	-5.88	0.06			
Bedding type					
RMS	-0.31	0.16	0.05	0.73	0.54, 1.00
Straw	Ref				
Housing type <sup>**</sup>					
Free stall	0.22	0.18	0.24	1.24	0.88, 1.77
Tie stall	Ref				
Bedding depth <sup>**</sup>					
≥ 10 cm	0.17	0.18	0.36	1.19	0.83, 1.69
< 10 cm	Ref				
Stall age <sup>‡,***</sup>	0.05	0.04	0.16	1.05	0.97, 1.14
Herd size <sup>*,**</sup>	0.05	0.10	0.64	1.05	0.86, 1.28
Herd size <sup>2</sup>	-0.10E-4	0.00	<0.01		
Herd size <sup>3</sup>	1.58E-8	0.00	<0.01		
<i>Variance</i>					
Farm	0.08				

<sup>§</sup>Confidence interval of the incidence ratio (IR). <sup>†</sup>Stall age and herd size were centered on 5 years and 100 cows, respectively. The intercept, therefore, represents the cow's log risk of acquiring a new subclinical mastitis for a cow in a 100 milking cows herd that had renovated its stalls 5 years ago. <sup>‡</sup>Coefficient represent an increase of 10 years. <sup>\*</sup>Coefficient represent an increase of 100 cows. <sup>\*\*</sup>Putative confounders.

## 6.5 Discussion

We analyzed SCM dynamics, in small to medium size herds typical of Eastern Canada, using three different measures and we were not able to find statistically significant associations between use of RMS and the prevalence nor incidence of SCM in any of our models. The mean LS was slightly in favor of straw-bedded cows. On the other hand, RMS-bedded cows were at slightly lower risk of having a  $LS \geq 4.0$  and of having an incident SCM. In general, we can conclude that cows on RMS farms were, at least, not at a greater risk of SCM than cows from straw-bedded farms.

We previously identified that pathogens were generally, found in greater concentrations in RMS bedding than in straw (2). These elevated counts of bacteria could increase the risk of environmental intra-mammary infections (IMI) (15) in RMS-bedded cows. Environmental pathogens are well-known to cause mainly clinical mastitis, which will affect few animals and for a short duration of time (16). Consequently, short duration IMIs on a few cows probably has a low impact on SCC, in general, and this may explain why we did not observe any bedding effect in our models. If RMS bedding would have increased the risk of more chronic IMI, we would then have possibly captured these differences in our models. Our results are in agreement with the work of de Haas et al. (17) who have found that high cow's SCC are associated with incidence of contagious rather than environmental pathogens. Shook et al. (16) have also demonstrated that each 1-point increase in LS was associated with a 2.3% increase in prevalence of contagious pathogens while an increase of 5.5% prevalence of environmental pathogen was required to obtain an equivalent LS increase.

Rowbotham and Ruegg (6) were also unable to detect an association between bedding type (RMS vs. sand) and SCM risk in primiparous cows housed on a research facility. In our study, we extended these conclusions to multiparous cows and to cows housed in a commercial farm context. Moreover, another of our study's strengths is the number of cows recruited and followed during the study period. This is, to our knowledge, the first study of this magnitude on the topic. Furthermore, we analyzed the SCC variations with three different methods to confirm our results.

On the other hand, since this is an observational study, our project presents some limitations. First, the herd's selection was not random and since we required straw-bedded farms to be

enrolled in DHI program, they may have been more aware or concerned of their cow's mammary health than the general population of dairy farmers. If this is the case, then our estimates would be biased toward a better measured udder health in straw-bedded farms than the true udder health in that population, thus biasing the comparison with RMS farms. Since RMS farms performed in general slightly better than straw farms for most outcome studied, this would only support our conclusions that RMS farms do not have worse SCM performances than straw-bedded herds. Nevertheless, our estimates of SCM incidence were very close to significant and in favor of RMS herds, and such a bias, if present, could have led to a type II error (i.e., not being able to conclude on a difference in favor of RMS farms while a true difference exist). On the other hand, a large proportion of the RMS herds recruited in our study were indeed enrolled in DHI program or had access the robotic milker-generated SCC data (20/27), so this bias, if present, is likely to be small.

A second limitation, is the potential for residual confounding. Given that the study design was an observational study design and that the exposure (i.e., bedding type) could not be randomly assign to farms, some important confounders could potentially distort the observed associations. We adjusted in our analyses for the most important theoretical confounders, but we cannot exclude the possibility of residual confounding by other unknown confounders. Nevertheless, given the important costs in machinery associated with producing RMS bedding, it would be impossible to randomly assign the bedding type to farms, thus precluding using an experimental study design on a large number of farms. One other study design that could be used is a before and after comparison in herds that have recently implemented RMS bedding, and, with such a design, any difference in other factors than bedding type occurring between the pre- and post-implementation periods could also biased the estimates. Moreover, it would be difficult to assemble a large number of farms transitioning to RMS bedding in a given region over a relatively short period of time. In the future, with more and more studies on this topic becoming available, meta-analyses could possibly help appraising our results in a larger context.

## **6.6 Conclusion**

We could not detect any difference in the mean lactational LS of cows bedded with RMS when compared to cows housed on straw. Moreover, we were not able to highlight difference in the risk for a given cow of having a DHI test with a LS  $\geq$  4.0 or with the risk of acquiring a SCM event. In general, the SCM situation did not appear worse in cows housed on RMS bedding as compared to cows housed on straw bedding.

## **6.7 Data availability statement**

The datasets presented in this study can be found in online repositories. The names of the repository/repositories and accession number(s) can be found at: <https://doi.org/10.5683/SP3/GRPK8W>.

## **6.8 Ethics statement**

The animal study was reviewed and approved by Animal Care and Use Committee of the Faculty of Veterinary Medicine (Université de Montréal; protocol 17-Rech-1886). Written informed consent was obtained from the owners for the participation of their animals in this study.

## **6.9 Author contributions**

GF, CC, and SD contributed to conception and design of the study. AF collected and analyzed the data (with help from SD) and wrote the first draft of the paper. All authors contributed to manuscript revision, approved and read the submitted version.

## **6.10 Funding**

This project was funded by grants from Novalait, the Consortium de recherche et innovations en bioprocédés industriels au Québec (#2015-044-C17), the Fonds Québécois de la recherche sur la nature et les technologies (#2017-LG-201835), and the Natural sciences and engineering research council of Canada (#CRDPJ 499421-2016). AF received funding and support from the Natural sciences and engineering research council of Canada Collaborative research and training experience program in milk quality, from the Canadian Dairy Commission, from Fondation Agria, and from Op+lait.

## 6.11 Acknowledgements

The authors want to thank the producers involved in the project, the staff from Lactanet and Dre Sarah McBurney, Lely FMS consultant.

## 6.12 References

1. Lasprilla-Mantilla MI, Wagner V, Pena J, Frechette A, Thivierge K, Dufour S, et al. Effects of recycled manure solids bedding on the spread of gastrointestinal parasites in the environment of dairies and milk. *J Dairy Sci.* (2019) 102:11308–16. doi: 10.3168/jds.2019-16866
2. Beauchemin J, Frechette A, Theriault W, Dufour S, Fravallo P, Thibodeau A. Comparison of microbiota of recycled manure solids and straw bedding used in dairy farms in eastern Canada. *J Dairy Sci.* (2021) 105:389–408. doi: 10.3168/jds.2021-20523
3. Harrison E, Bonhotal J, Schwarz M. *Using Manure Solids As Bedding.* Ithaca, NY: Cornell Waste Management Institute (2008).
4. Gagnon M, Hamelin L, Frechette A, Dufour S, Roy D. Effect of recycled manure solids as bedding on bulk tank milk and implications for cheese microbiological quality. *J Dairy Sci.* (2020) 103:128–40. doi: 10.3168/jds.2019-16812
5. Patel K, Godden SM, Royster E, Crooker BA, Timmerman J, Fox L. Relationships among bedding materials, bedding bacteria counts, udder hygiene, milk quality, and udder health in US dairy herds. *J Dairy Sci.* (2019) 102:10213–34. doi: 10.3168/jds.2019-16692
6. Rowbotham RF, Ruegg PL. Associations of selected bedding types with incidence rates of subclinical and clinical mastitis in primiparous Holstein dairy cows. *J Dairy Sci.* (2016) 99:4707–17. doi: 10.3168/jds.2015-10675
7. Frechette A, Fecteau G, Cote C, Dufour S. clinical mastitis incidence in dairy cows housed on recycled manure solids bedding: a canadian cohort study. *Front Vet Sci.* (2021) 8:742868. doi: 10.3389/fvets.2021.742868
8. NMC. *National Mastitis Council: Current Concepts of Bovine Mastitis.* New Prague, MN, USA (2016).

9. Dohoo IR, Meek AH. Somatic cell counts in bovine milk. *Can Vet J.* (1982) 23:119–25
10. Shook GE. Genetic improvement of mastitis through selection on somatic cell count. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* (1993) 9:563–81. doi: 10.1016/S0749-0720(15)30622–8
11. Sargeant JM, O'Connor AM, Dohoo IR, Erb HN, Cevallos M, Egger M, et al. Methods and processes of developing the strengthening the reporting of observational studies in epidemiology-veterinary (STROBE-Vet) statement. *J Food Prot.* (2016) 79:2211–9. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-16-016
12. Deng Z, Hogeveen H, Lam T, van der Tol R, Koop G. Performance of online somatic cell count estimation in automatic milking systems. *Front Vet Sci.* (2020) 7:221. doi: 10.3389/fvets.2020.00221
13. Dufour S, Dohoo IR. Monitoring herd incidence of intramammary infection in lactating cows using repeated longitudinal somatic cell count measurements. *J Dairy Sci.* (2013) 96:1568–80. doi: 10.3168/jds.2012-5902
14. Rothman KJ, Greenland S, Lash TL. *Modern Epidemiology.* Philadelphia, PA: Lippincot Williams & Wilkins (2008).
15. Hogan JS, Smith KL. Bacterial counts in bedding materials used on nine commercial dairies. *J Dairy Sci.* (1989) 69:250–258. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(89)79103-7
16. Shook GE, Kirk RLB, Welcome FL, Schukken YH, Ruegg PL. Relationship between intramammary infection prevalence and somatic cell score in commercial dairy herds. *J Dairy Sci.* (2017) 100:9691–701. doi: 10.3168/jds.2017-12810
17. de Haas Y, Barkema HW, Schukken YH, Veerkamp RF. Associations between somatic cell count patterns and the incidence of clinical mastitis. *Prev Vet Med.* (2005) 67:55–68. doi: 10.1016/j.prevetmed.2004.10.006

## 7 Clinical mastitis incidence in dairy cows housed on recycled manure solids bedding: a Canadian cohort study

Annie Fréchette<sup>1,2,3</sup>, Gilles Fecteau<sup>1,4</sup>, Caroline Côté<sup>1,3,5</sup> and Simon Dufour<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Regroupement FRQ-NT Op+Lait, Saint-Hyacinthe, QC, Canada

<sup>2</sup>Mastitis Network, Saint-Hyacinthe, QC, Canada

<sup>3</sup>Department of Pathology and Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Université de Montréal, Montreal, QC, Canada

<sup>4</sup>Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Université de Montréal, Montreal, QC, Canada

<sup>5</sup>Research and Development Institute for the Agri-Environment (IRDA), Québec City, QC, Canada

This article was published in *Frontiers in Veterinary Science* (veterinary infectious diseases section).

**Citation** : Fréchette A, Fecteau G, Côté C and Dufour S (2021) Clinical Mastitis Incidence in Dairy Cows Housed on Recycled Manure Solids Bedding: A Canadian Cohort Study. *Front. Vet. Sci.* 8:742868. doi: 10.3389/fvets.2021.742868

## 7.1 Abstract

Bedding can affect mammary health of dairy cows. The objectives of this study were to evaluate clinical mastitis incidence in cows housed on recycled manure solids bedding and, more specifically, to determine which pathogens were involved. We followed 26 recycled manure solids farms and 60 straw-bedded farms as a comparative group during 1 year (2018–2019). For each episode of clinical mastitis, defined as a visual alteration of the milk, with or without local or systemic signs of infection, producers sampled aseptically the affected quarter, provided some details about the animal, and sent the sample to the research team at the Université de Montréal. We received and analyzed 1,144 milk samples. The samples were cultured according to the National Mastitis Council guidelines and the different colony phenotypes were subsequently identified with mass spectrometry. In 54.6% of CM cases, a single phenotype of bacteria was cultured (pure culture), while two different phenotypes were found in 16.8% of the samples (mixed culture), and no growth was observed in 14.4% of the samples. Samples with three or more phenotypes were considered contaminated and were not included in the pathogen-specific analyses (14.3% of the submitted samples). The most frequently identified bacterial species in pure and mixed culture in farms using recycled manure solids were *Streptococcus uberis* (16.0%), *Escherichia coli* (13.8%), *Klebsiella pneumoniae* (13.2%), *Streptococcus dysgalactiae* (6.2%), and *Staphylococcus aureus* (3.4%). In straw farms, the most frequent species were *S. aureus* (16.6%), *S. uberis* (11.0%), *E. coli* (9.1%), *S. dysgalactiae* (8.0%), and *K. pneumoniae* (1.1%). The incidence of clinical mastitis (all cases together) was not higher in recycled manure solids farms (14.0 cases/100 cow-year; 95% CI: 8.3–23.7) compared with straw-bedded farms (16.3 cases/100 cow-year; 95% CI: 9.0–29.6). However, *K. pneumoniae* clinical mastitis episodes were 7.0 (95% CI: 2.0–24.6) times more frequent in recycled manure solids farms than in straw farms. Adjusted least square means estimates were 1.6 *K. pneumoniae* clinical mastitis cases/100 cow-year (95% CI: 0.8–3.4) in recycled manure solids farms vs. 0.2 cases/100 cow-year (95% CI: 0.1–0.6) in straw-bedded farms. *Klebsiella pneumoniae* clinical mastitis is in general severe. Producers interested in this bedding alternative need to be aware of this risk.

**Keywords:** recycled manure solids, dairy cows, bedding, housing, clinical mastitis



## 7.2 Introduction

Dairy producers are interested in alternative bedding products that may be less expensive to buy or produce, easily available in large quantities, and secure for animals and humans. There is a growing interest in Eastern Canada to use recycled manure solids (**RMS**) as bedding. This product is already used in many countries such as the United States, United Kingdom, and the Netherlands. However, there is no consensus on the best technique to produce RMS to ensure its safety. The method used to produce RMS and the different climates where it is used will influence its physicochemical and, possibly, its microbiological characteristics (1, 2). Recycled manure solids is an organic bedding with a high moisture content and, therefore, represents a favorable environment for bacterial growth. Indeed, previous studies demonstrated the high bacterial content of this product (3, 4) and its potential to sustain bacterial growth (5).

There are few studies on the association between RMS usage and animal health. It was demonstrated that *Cryptosporidium* parasites were found more frequently from the feces of cows in RMS farms compared with cows housed on straw bedding (6). In the same project, the presence of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. was more frequently detected in RMS bedding samples, showing that the processing methods used to produce RMS were not efficient to eliminate these zoonotic pathogens (7). There are also some concerns about the survival of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* throughout the RMS maturation process (8).

Associations between the use of RMS bedding and the risk of clinical mastitis (**CM**) were evaluated in two studies that yielded conflicting results. In an experimental study in one dairy facility of 309 primiparous Holstein cows, associations between type of bedding (RMS or sand) and CM incidence could not be highlighted (9). In a second study, 1,600 cows housed together in one farm were followed using an observational study design, and in this study, the use of RMS was associated with a greater risk of CM with an odds ratio of 2.1, compared with cows housed on sand (10).

There are anecdotal reports from veterinarians and producers about an increased incidence of CM and particularly CM caused by *Klebsiella* spp. on farms using RMS bedding. There are two main hypotheses explaining this potential increase in CM incidence. First, this bedding may

contain an increased amount of *Klebsiella* spp. before usage compared with more conventional bedding. However, this hypothesis was refuted in two studies which observed that unused RMS, on average, contained less *Klebsiella* spp. than straw (4, 7). Another possible explanation is that this CM may be due to the ability of *Klebsiella* spp. to multiply in this type of bedding during its use in the stalls. Indeed, the ability of RMS to support the growth of *Klebsiella pneumoniae* and *Enterococcus faecium* was investigated and shown to be superior to those of sand and wood products (5).

An increased incidence of *Klebsiella* spp. CM on farms using RMS was not yet confirmed in the scientific literature. Moreover, only one study has described CM incidence in a large number of farms using RMS bedding (11). Finally, pathogen-specific CM incidence was never reported on RMS farms. The objectives of this study were, therefore, to describe the total incidence of CM in dairy cows housed on recycled manure solids bedding and CM incidence by the main bacterial species and to compare these to herds using a more conventional type of bedding, straw. The results presented in this paper are part of a larger study on RMS farms, and results about milk quality, parasite survival, and bedding bacteriological analyses can be found elsewhere (6, 7, 12).

## **7.3 Materials and methods**

### **7.3.1 Ethical statement**

This project was approved by the Animal Care and Use Committee of the Faculty of Veterinary Medicine (University de Montréal; protocol 17-Rech-1886). This paper was elaborated using the “STROBE-Vet statement” guidelines (12).

### **7.3.2 Herd recruitment**

A list of farms using RMS was generated by contacting RMS equipment dealers and veterinarians and through social media. Straw farms were recruited with the help of Québec Dairy Herd Improvement Association (DHIA, Lactanet, Ste-Anne de Bellevue, QC, Canada). For both type of herds, to be eligible, farmers needed to be located within 250 km of the research facilities (St-Hyacinthe, QC), to have used the same bedding for > 6 months prior to the farm visit, and for the straw farms, to be enrolled in a DHIA milk recording program. This latter condition was added for

another part of the study on subclinical mastitis. We aimed at recruiting ~ 90 farms. This number was determined by an *a priori* power estimation. We estimated that, using 90 herds (20%: RMS bedding vs. 80%: straw bedding), milking an average of 50 cows, and a baseline probability of clinical mastitis of 20%, we would have > 95% power to detect a difference of probability of mastitis corresponding to an odds ratio  $\geq 1.4$ . For this calculation, we did not account for clustering of cows by herd. Thus, the real power is likely to be smaller than 95%.

All potential farms were contacted by telephone between July and December 2017 to verify their eligibility and willingness to participate. Basic demographic information such as the number of milking cows in the herd, type of bedding used, and for RMS farms, which equipment they used were also gathered from herds that were excluded, to study their similarities with participants and assess the presence of a selection bias.

### **7.3.3 Sample Collection and bacteriological analyses**

Farm visits were described elsewhere (6, 12). Briefly, farms were visited once and producers had to answer a standardized questionnaire about their bedding management. Methods used to produce bedding were recorded and bedding samples as well as bulk tank milk samples were collected. Herd size was recorded as the number of lactating cows. We also recorded housing type (free or tie stall), time since the last renovations of the stalls (in years), and bedding thickness defined as shallow bedding (< 10 cm of depth) or deep bedding ( $\geq 10$  cm of depth). These latter covariables were pre-identified using directed acyclic graph as putative confounders of the association between bedding type and CM incidence.

During 1 year following the initial visit, producers were asked to sample aseptically each quarter of cows experiencing a CM. Farmers had to provide information regarding the identification of the cow, its parity, the position of the quarter affected, and the severity of the CM. For the latter, farmers had to categorize CM events as score 1 (abnormal milk only), score 2 (abnormal milk and udder, without systemic signs), or score 3 (systemic signs of illness such as fever, depression, and anorexia) as described by Sears and McCarthy (14). Two consecutive cases of CM in the same quarter of a cow were considered distinct if they were  $\geq 8$  days apart (15). Samples were sent on ice to the Faculty of Veterinary Medicine Laboratory (St-Hyacinthe, QC, Canada). The

bacteriological analyses were realized following the National Mastitis Council guidelines (16). Briefly, 0.01 ml of milk was plated on blood agar and incubated for 24–48 h at 35°C. The sample was then classified as negative (no growth), pure intramammary infection (**IMI**) (one single phenotype of CFU), mixed IMI (two types of CFU), or contaminated ( $\geq 3$  types of CFU). An IMI was defined as the isolation of  $\geq 100$  CFU/ml of a given phenotype. Pure and mixed IMI bacterial isolates were then identified by mass spectrometry (MALDI-TOF) using the database of the manufacturer (BDAL-8468) and a custom database validated specifically for staphylococci identification (17). Isolates needed to be identified to the species level (vs. genus level solely) to be retained for pathogen-specific statistical analyses.

#### **7.3.4 Statistical analyses**

The number of CM episodes was compiled for each farm, as well as the number of severe (score 3) CM episodes. Finally, we compiled the CM episodes by specific pathogens. To account for the varying herd size and the exact time period of follow-up, the number of milking cows in each herd and the length of the follow-up period were also compiled.

Most CM studies have to deal with different levels of the compliance of producers for reporting CM cases and/or submitting samples. To investigate this potential bias, we used two different approaches to estimate the herd animal-time denominator used to adjust CM incidence. First, we used a common approach which is the exact number of milking cows and the exact period of follow-up (18) to compute the number of animal-year at risk of the herd.

Then, as a sensitivity analysis, we also estimated the follow-up period using the interval between the first and last sampling dates as the definition. Thus, with this alternative method, farms who did not send any samples or that sent only one sample during the 1 year study period were excluded (i.e., they would contribute 0 animal-year at risk). Moreover, farms that may have sent  $> 1$  sample but then stopped sending samples at some point in time would be included, but with a shorter time at risk period (i.e., only the time between the first and last sent samples would be compiled). Then, we computed the number of cow-year at risk of the herd for each farm by multiplying the number of milking cows of the herd by the follow-up time. Using this alternative

method allowed to exclude producers who sent < 2 samples during the study period and weighted down producers who possibly stopped sending samples during the study.

Statistical analyses were performed using SAS 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Descriptive statistics were used to explore relations between predictors. To compare the incidence of CM in RMS and straw farms, we used a binomial negative model with the number of CM cases on a given farm as the outcome (firstly total number of CM cases, then severe CM cases only, then CM cases by bacterial species), type of bedding used (RMS or straw) as the main predictor, and the natural logarithm of the number of cow-year at risk as an offset term. In this model, we also included a number of putative confounding variables as predictors: housing type (free or tie stall), time since the last renovations of the stalls (in years), bedding thickness (deep or shallow bedding), and herd size (number of milking cows). With such a model, we could thus compute the CM incidence ratio (**IR**) between RMS- and straw-bedded farms, after adjusting for these confounders, simply by exponentiating the bedding coefficient. Moreover, the mean estimated CM incidence (in cases/100 cow-year) for a given type of herd could be computed simply by adding the intercept and the coefficients corresponding to that farm description, then exponentiating the results and, finally, multiplying the results by 100 cows (to obtain an incidence per 100 cow-year). Finally, all models were ran twice, initially using the complete follow-up period to compute the animal-time at risk of the herd and, then, using the animal-time at risk computed using the alternative method.

The assumption of linearity of the relation between quantitative predictors (time since the last renovation of the stalls and herd size) and the outcome (logarithmic transformation of the incidence ratio) was verified with the addition of polynomial terms (square and cubic terms) after centering the predictor. If the polynomial terms were significant ( $P < 0.05$ ), the polynomial presentation of the variable was retained in the final model. If overdispersion was observed in the data (Pearson chi-square > 1.2), robust variance was used. Significance level was fixed at  $P \leq 0.05$ . Data and the SAS code used to construct the models are publicly available at <https://doi.org/10.5683/SP2/KIEMHY>.

## 7.4 Results

### 7.4.1 Herds description

We obtained a list of 49 RMS and 139 straw farms and recruited 27 and 61 RMS and straw farms, respectively. Reasons for exclusion of RMS farms were as follows: four had recently changed their bedding type to non-RMS bedding, 11 were outside the defined geographic location, one did not use RMS under the milking cows, and six could not be reached despite several attempts. From the 139 straw farms interested in the project, 61 were selected on their ability to provide computerized health records.

We visited the farms between January 15th and July 10th, 2018. The farms recruited have been described in Lasprilla-Mantilla et al. (6) and Gagnon et al. (12). Briefly, recruited RMS farms had 55–900 lactating cows (median 111) and straw farms had 43–229 lactating cows (median 65). An automatic milking system was in use in 37% of RMS farms and in 3% of straw farms. Furthermore, 59% of RMS farms and 98% of straw farms participated regularly in a DHI program. Even though participating in a DHI program was an inclusion criterion in straw herds, one farm did not record any data (i.e., dropped out of DHI) during the follow-up period. In the 27 RMS farms, 26 used a separation process as first step for producing RMS bedding. One RMS farm used an anaerobic digester as the first step and a separation process as the second and last step. From the 26 farms who did a separation first, one used the solid fraction immediately after separation, two used a rotative drum to turn into compost the solid fraction, 10 allowed the solid fraction to mature in a heap, and 13 allowed the solid fraction to mature in an enclosed container. During the monitoring year, two farms (one RMS and one straw) burned and five others (one RMS and four straw) dropped out of the project. Two of these farms (one RMS and one straw) dropped off very early and without sending any milk samples. They were, therefore, excluded from the analyses. For the three other farms, data collected until they left the project were used in the analyses. When we used the alternative follow-up period (from the first to the last sampling dates) to compute the animal-time at risk, 28% of RMS farms and 35% of straw-bedded farms had a follow-up time of 6 months or less. The characteristics of the general herds are reported in **Table 28**.

Tableau 28. – Description of the 26 recycled manure solids farms and 60 straw farms.

	RMS bedding	Straw bedding
	Median (range)	Median (range)
Follow-up period in year	1.0 (0.4-1.0)	1.0 (0.2-1.0)
Number of milking cows	111 (55-900)	65 (43-229)
Number of years since the last renovations of the stalls	3.0 (0.1-23.0)	10.0 (0.0-70.0)
Proportion of freestall	70.4 <sup>a</sup>	3.3 <sup>a</sup>
Proportion of deep bedding ( $\geq$ 10cm)	38.5 <sup>a</sup>	0.0 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Proportion (in %)

#### 7.4.2 Milk samples

We received 1,247 samples during the study period (**Figure 17**). We excluded 11 samples because they were collected on the same mammary gland quarter < 8 days since the last CM episode. From the 1,236 remaining samples, there were no information about CM severity in 69 (5.6%) of the samples, 92 (7.4%) were submitted as score 0 (no clinical mastitis), 492 (39.8%) as score 1, 426 (34.5%) as score 2, and 157 (12.7%) as score 3. We excluded the 92 samples for which the producers explicitly reported a severity score of 0. Samples with no reported severity were, however, retained. We observed a pure IMI in 624 (54.5%) of the 1,144 remaining samples, a mixed IMI in 192 (16.8%), and no growth in 165 (14.4%). Of the collected samples, 163 (14.2%) were considered contaminated. The proportion of contaminated samples was not associated with bedding type (chi-square test;  $P = 0.89$ ).

The most frequent recovered pathogens (in pure or mixed IMI) by bedding type and severity are reported in **Table 29**. Briefly, in RMS farms, the most frequent pathogens were *Streptococcus uberis* (16.0%), *Escherichia coli* (13.8%), *K. pneumoniae* (13.2%), *Streptococcus dysgalactiae* (6.2%), and *Staphylococcus aureus* (3.4%). In straw-bedded farms, *S. aureus* (16.6%), *S. uberis*

(11.0%), *E. coli* (9.1%), *S. dysgalactiae* (8.0%), and *K. pneumoniae* (1.1%) were the most frequent pathogens. Clinical mastitis episodes due to coliforms (*K. pneumoniae* and *E. coli*) were more often severe. Clinical mastitis episodes due to *S. uberis*, *S. dysgalactiae*, or *S. aureus* were, in general, mainly mild or moderate (**Table 29**).

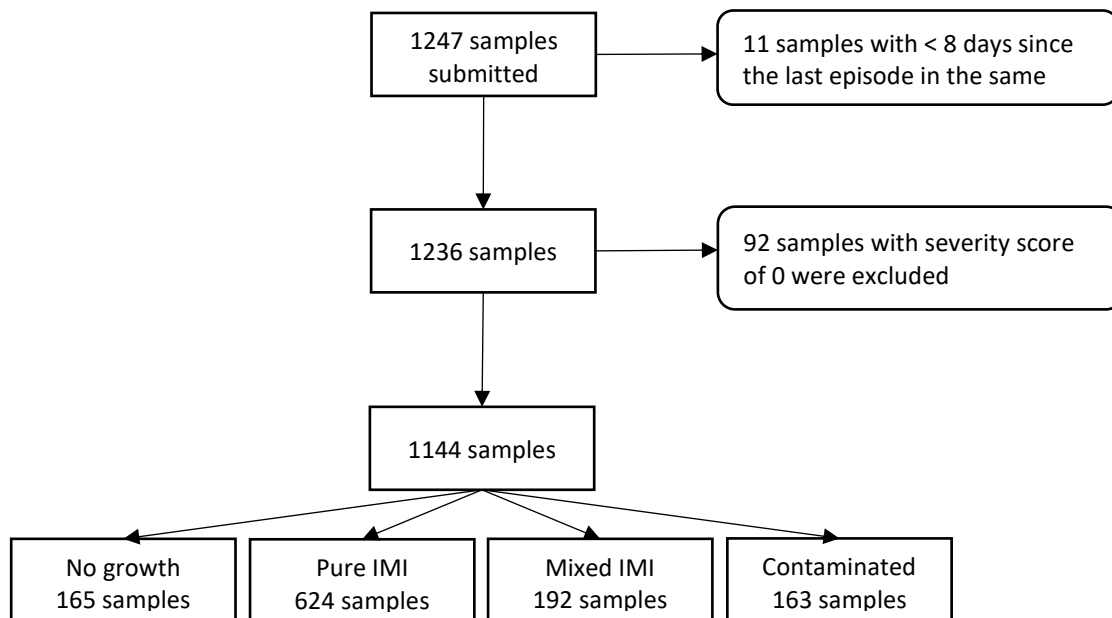


Figure 17. – Flow chart representing clinical mastitis samples submitted and retained in a study comparing clinical mastitis incidence in 26 farms using recycled manure solids bedding and 60 farms using straw bedding.



Tableau 29. – Percentage (number) of clinical mastitis cases by bedding type, bacterial species, and severity among 1,144 clinical mastitis cases obtained on 26 farms using recycled manure solid (RMS) bedding and 60 farms using straw bedding.

Category	RMS bedding					Straw bedding				
	Total <sup>a</sup>	Severity <sup>b</sup>				Total <sup>a</sup>	Severity <sup>b</sup>			
		Unknown	Mild	Moderate	Severe		Unknown	Mild	Moderate	Severe
All cases	100 (356)	13.2 (47)	28.7 (102)	34.3 (122)	23.9 (85)	100 (788)	2.8 (22)	49.5 (390)	38.6 (304)	9.1 (72)
<i>Streptococcus uberis</i>	16.0 (57)	7.0 (4)	28.0 (16)	59.6 (34)	5.3 (3)	11.0 (87)	1.1 (1)	37.9 (33)	57.5 (50)	3.4 (3)
<i>Escherichia coli</i>	13.8 (49)	8.2 (4)	10.2 (5)	32.7 (16)	49 (24)	9.1 (72)	1.4 (1)	12.5 (9)	37.5 (27)	48.6 (35)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	13.2 (47)	6.4 (3)	8.5 (4)	31.9 (15)	53.2 (25)	1.1 (9)	0 (0)	33.0 (3)	33.0 (3)	33.0 (3)
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	6.2 (22)	18.2 (4)	40.9 (9)	22.7 (5)	18.2 (4)	8.0 (63)	0.0 (0)	34.9 (22)	55.6 (35)	9.5 (6)
<i>Staphylococcus aureus</i>	3.4 (12)	8.3 (1)	33.3 (4)	25 (3)	33.3 (4)	16.6 (131)	3.8 (5)	55.7 (73)	37.4 (49)	3.1 (4)
Other pathogen	19.4 (69)	23.2 (16)	34.8 (24)	26.1 (18)	15.9 (11)	28.6 (225)	2.7 (6)	57.8 (130)	35.1 (79)	4.4 (10)
No growth	16.9 (60)	6.7 (4)	48.3 (29)	30 (18)	15.0 (9)	13.3 (105)	1.9 (2)	61.0 (64)	28.6 (30)	8.6 (9)

<sup>a</sup> Proportion of clinical mastitis cases in % (absolute number of cases) within a type of farm where a given bacterial species was found. Note that sum within a column may add to more than 100% since some samples may yield more than one bacterial species. <sup>b</sup> Distribution of severity of clinical mastitis cases in % (absolute number of cases) within a type of farm and for a given bacterial species. Severity was scored as described before (37) as: unknown, mild (1; abnormal milk only), moderate (2; abnormal quarter), or severe (3; abnormal cow).

### 7.4.3 Effect of bedding on CM incidence

Clinical mastitis (all cases) incidence distribution estimated using a period at risk extending from start to end of the study is illustrated in **Figure 18**.

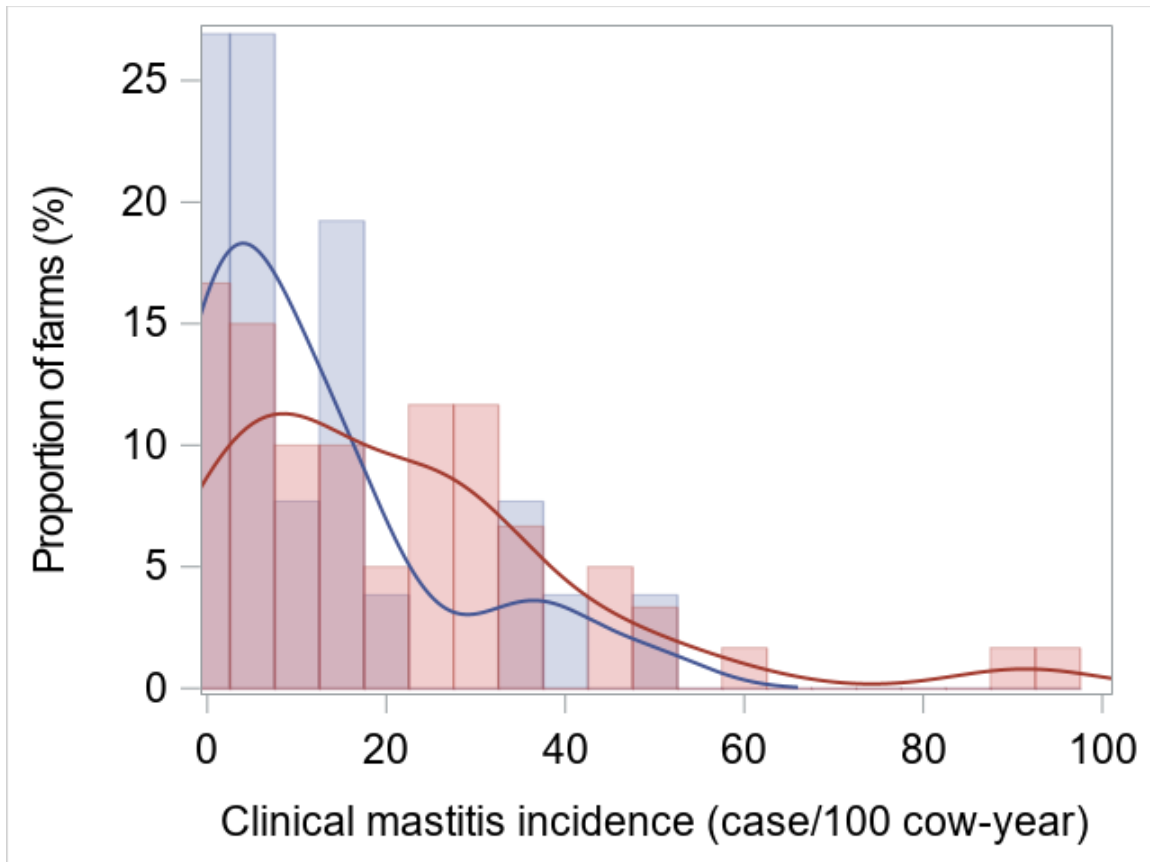


Figure 18. – Clinical mastitis incidence distribution estimated using a period at risk extending from start to end of the study in a study comparing 26 farms using recycled manure solids bedding (blue) and 60 farms using straw bedding (red).

Unconditional least square means (**LSM**) estimates (i.e., not adjusted for putative confounding variables) are presented as **Supplementary Table 1**. After adjusting for potential confounders, there was no statistical difference in the general CM incidence between the two farm types. A LSM estimate of 14.0 cases/100 cow-year (95% CI: 8.3, 23.7) was obtained for RMS farms, whereas a LSM of 16.3 cases/100 cow-year (95% CI: 9.0, 29.6) was obtained for straw farms (**Table**

**30).** Moreover, there was no difference in the incidence of severe CM episodes (severity score 3) between the two types of farm. A LSM of 2.1 severe cases/100 cow-year (95% CI: 1.1, 4.1) was obtained for RMS farms, and straw farms had a LSM of 1.6 severe cases/100 cow-year (95% CI: 0.8, 3.4).

The estimated incidence of *K. pneumoniae* CM, however, was higher in RMS farms with a LSM of 1.6 cases/100 cow-year (95% CI: 0.8, 3.4) compared with 0.2 cases/100 cow-year (95% CI: 0.1, 0.6) for straw farms. For this comparison, a 7.0 times (95% CI: 2.0, 24.6) higher incidence was observed in RMS farms. There was no significant difference between the two types of farms regarding the incidence of CM due to *S. uberis*, *E. coli*, *S. dysgalactiae*, or *S. aureus*.

Tableau 30. – Least square means clinical mastitis incidence estimates (in cases/100 cow-year) and incidence ratio (IR) between 26 RMS farms and 60 straw-bedded farms and computed using a binomial negative model.

Clinical mastitis category	Estimated incidence		IR (95%CI)
	in cases/100 cow-year (95%CI)		
	RMS farms	Straw farms	
All clinical mastitis	14.0 (8.3-23.7)	16.3 (9.0, 29.6)	0.9 (0.4-1.9)
Severe clinical mastitis	4.0 (2.5-6.3)	2.7 (1.6-4.6)	1.5 (0.7-3.1)
By bacterial species involved			
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1.6 (0.8-3.4) <sup>a</sup>	0.2 (0.1-0.6) <sup>b</sup>	7.0 (2.0-24.6)
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	0.6 (0.2-1.2)	0.8 (0.3-1.8)	0.7 (0.3-1.9)
<i>Escherichia coli</i>	0.5 (0.2-1.2)	0.7 (0.3-1.5)	0.8 (0.3-2.0)
<i>Streptococcus uberis</i>	0.4 (0.1-1.5)	0.8 (0.3-2.5)	0.5 (0.1-2.3)
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.4 (0.1-1.2)	0.9 (0.3-3.0)	0.4 (0.1-1.4)

A period at risk extending from start to end of study was used to compute the animal-time denominator. Models were adjusted for confounding by housing type, time since the last renovation of the stalls, bedding thickness, and herd size. Means within a row with different superscripts are statistically different.

#### 7.4.4 Sensitivity analysis

When using the alternative approach for computing period at risk, we ended up excluding 8 RMS farms and 11 straw-bedded farms that sent < 2 samples during the study period (**Table 31**).

Tableau 31. – Variation of number of cows-year at risk in the two groups (26 RMS farms and 60 straw farms) when using different follow-up periods.

		RMS bedding	Straw bedding
		Median (range)	Median (range)
Cow-year at risk	Method 1	109 (55-900)	64 (10-229)
	Method 2	63 (0-230)	45 (0-109)

Method 1 correspond to a follow-up period of one year and method 2 is a follow-up period calculated as the interval between the first and last sampling dates.

Using this alternative approach, the general estimated CM incidence was different between the two groups (**Supplementary Table 2**) with a LSM estimate of 26.5 cases/100 cow-year (95% CI: 19.2, 36.6) for RMS farms and a LSM of 46.2 cases/100 cow-year (95% CI: 30.2, 70.8) for straw-bedded farms. Furthermore, the total incidence of severe CM was not different between the two farms groups with a LSM estimate of 10.2 cases/100 cow-year (95% CI: 6.9, 15.0) in RMS farms and a LSM of 13.6 cases/100 cow-year (95% CI: 7.1, 26.1) in straw-bedded farms.

As in our first approach, the estimated incidence of CM due to *K. pneumoniae* was significantly higher in RMS farms with a LSM of 3.4 cases/100 cow-year (95% CI: 1.6, 7.1) compared with 0.6 cases/100 cow-year (95% CI: 0.2, 1.6) in straw farms. This was equivalent to a 5.9 times (95% CI: 1.6, 21.2) higher incidence in RMS farms. There was still no difference between the two groups concerning the incidence of CM due to *S. uberis*, *E. coli*, *S. dysgalactiae*, or *S. aureus*.

## 7.5 Discussion

To our knowledge, this is the first study to report pathogen-specific CM incidence on RMS farms. In our study, the proportion of contaminated samples was similar to a previously published work (19) and was not associated with the bedding type. Using the approach most often used in

mastitis research to compute total CM incidence (i.e., considering the complete time period of follow-up), we did not observe a statistically significant association between the use of RMS as bedding and the incidence of CM. This finding is in agreement with those of an experimental study realized at the University of Wisconsin-Madison (9). In both studies, quarter milk was sampled and analyzed for each CM event, rather than just relying on the farm records for analysis of incidence. In the Rowbotham and Ruegg (9) study, environmental *Streptococcus*, *E. coli*, and *Klebsiella* spp. were identified in 50% of CM culture-positive samples. In that latter study, however, pathogen-specific CM incidence was not reported.

In our study, we were able to investigate the most common CM pathogens. Prior to conducting this study, veterinarians and producers in our province anecdotally reported *K. pneumoniae* CM outbreaks in RMS farms. This hypothetical higher incidence of *K. pneumoniae* CM in RMS farms was confirmed in the current study. One hypothesis to explain these mastitis episodes is that, right from the start, RMS bedding may contain a higher concentration of *K. pneumoniae* than straw. In a parallel study conducted on the same herds during the same period, we observed that unused RMS contained lower concentrations of *Klebsiella* spp. than unused straw (7). However, at the end of the usage cycle (prior to removal from the stall), the concentrations of *Klebsiella* spp. were similar between the two bedding types. Another hypothesis is that the growth rate of *Klebsiella* spp. would be higher in RMS bedding than in other bedding types. Thus, despite lower bacterial concentrations to start with, the rapid growth of *Klebsiella* spp. in this bedding type after contamination with feces would quickly lead to increased concentrations of *Klebsiella* spp. A previous study demonstrated the high potential of RMS for supporting the growth of *Klebsiella* spp. (5). Still, Beauchemin et al. also reported similar concentrations of *Klebsiella* spp. in samples using RMS and straw bedding. Thus, RMS did not seem to lead to a riskier environment (based solely on bacterial concentration) for *Klebsiella* spp. CM, even at the end of the usage cycle. Some other properties of this bedding, for instance its ability to stick to the teats, may better explain the higher *K. pneumoniae* CM incidence. This latter hypothesis, however, was not investigated in the current study.

Clinical mastitis episodes due to *K. pneumoniae* are usually severe (20). In our study, CM episodes due to *K. pneumoniae* were moderate or severe in 66% of cases in straw-bedded farms and in

85% of cases in RMS farms. In one study, they estimated a loss of 700 kg of milk in a multiparous cow experiencing clinical mastitis due to *Klebsiella* spp. at 30 days in milk (21). In comparison, a CM due to *E. coli* was causing a loss of 354 kilos. Moreover, cows experiencing *Klebsiella* spp. CM had a 22.3 times greater risk of culling than healthy cows (22).

Nevertheless, in our study, there was no difference in the total incidence of severe CM episodes between the two types of bedding. Since *K. pneumoniae* is just one of the multiple bacterial species that can cause severe CM, this result is not surprising. For instance, *E. coli* is another pathogen that was responsible for severe mastitis and *E. coli* CM incidence was similar between the two types of beddings.

When we used the alternative follow-up period (from the first to the last sampling dates) to compute the animal-time at risk, there were significantly more cases of CM in straw farms. Since herd size varied as function of bedding type, the impact of this more restrictive follow-up period affected differentially the incidence denominator for straw- and RMS-bedded herds. Consequently, since our results on the total CM incidence are affected by the method used to compute them, we can hardly conclude on whether the general CM incidence varied between the two groups of farms. The most commonly used approach in CM research (i.e., considering herds with few CM cases reported as herds with a low CM incidence) would conclude on similar CM incidence between bedding types. The more conservative approach (where herds reporting few CM cases or reporting for a limited period of time would be considered noncompliant and excluded) would conclude to a larger general CM incidence in straw-bedded farms. Nevertheless, regardless of the method used, the general CM incidence was never higher in RMS herds. Moreover, our results on species-specific CM incidence appeared to be robust and consistent between both computation methods.

A strength of our study was the number of participating farms and the number of cows recruited. To our knowledge, this is the largest number of herds and cows assembled to study the effect of RMS bedding on CM incidence. This is also the first time, to our knowledge, that pathogens responsible of CM were identified. We can now confirm that there are some differences in the

pathogen patterns causing CM according to the bedding type. However, since this is an observational study, our study presents some limitations.

First, the sampling strategy was not random and some regions were overrepresented due to our proximity criteria. However, to our knowledge, most of the farms using RMS bedding in these regions and during this period were recruited. The bias may be more important regarding recruitment of farms using straw bedding, since we selected only herds enrolled in DHIA for that group. This criterion was not used for RMS farms. Producers enrolled in DHIA may be more concerned about udder health of their cows than the general population of dairy farmers, possibly generating a bias when measuring the association between bedding used and CM incidence. Nevertheless, a good proportion of RMS farms were also enrolled in DHIA, thus limiting the magnitude of this potential bias.

Second, the exposition to each type of bedding was not randomly assigned and many confounding factors were possibly operating within these farms. We were able to include in our models some potentially important confounding factors. Thus, our incidence estimates were adjusted for some of the other differences that we observed between RMS- and straw-bedded farms. Nevertheless, some residual confounding is likely to be present. Our results would have to be confirmed using an experimental study design where cows from one or many farms would be randomly assigned to different bedding types while monitoring pathogen-specific CM incidence.

Finally, a well-known challenge in studies on CM is the relatively low compliance of farmers for recording CM episodes, which may represent an information bias. We hypothesize that this lack of reporting was similar in the two groups of farms. In our study, to improve the reporting of CM episodes, we covered the costs for all the milk analyses conducted during the year of follow-up, provided timely results (i.e., < 2 days) to the herd veterinarian, and called all participants every 4 months to keep them engaged and motivated. Moreover, using the alternative method for computing time of follow-up allowed for the exclusion of some herds that were possibly low-compliance herds.

In the future, experimental studies could help in confirming the results observed in this observational study. For instance, a randomized controlled trial or a crossover study design

conducted in one or a few large herds and over a sufficiently long period of time (since *Klebsiella* spp. CM is an uncommon health event) would be of great value to confirm these initial findings.

## **7.6 Conclusion**

The general incidence of CM and of severe CM was not higher in RMS- compared with straw-bedded herds. However, the distribution of bacterial species causing the CM cases was different. The incidence ratio of CM due to *K. pneumoniae* was seven times greater in RMS farms than in straw farms. These mastitis cases are usually very severe. Producers interested to adopt this type of bedding must be aware of this risk.

## **7.7 Data availability statement**

The datasets presented in this study can be found in online repositories. The names of the repository/repositories and accession number(s) can be found at: <https://doi.org/10.5683/SP2/KIEMHY>.

## **7.8 Ethics statement**

The animal study was reviewed and approved by Animal Care and Use Committee of the Faculty of Veterinary Medicine, University de Montréal. Written informed consent was obtained from the owners for the participation of their animals in this study.

## **7.9 Author contributions**

All authors listed have made a substantial, direct and intellectual contribution to the work, and approved it for publication.

## **7.10 Funding**

This project was funded by grants from Novalait, the Consortium de recherche et innovations en bioprocédés industriels au Québec, the Fonds Québécois de la recherche sur la nature et les technologies (2017-LG-201835), and the Natural sciences and engineering research council of Canada (CRDPJ 499421 - 2016). The first author (AF) received funding and support from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada Collaborative Research and Training



Experience program in milk quality, from the Canadian Dairy Commission, from Fondation Agria, and from Op+lait.

## **7.11 Acknowledgments**

The authors would like to thank the producers involved in the project, the staff from the diagnostic laboratory, and Caroline Forest, animal health technician, who helped with data collection.

## **7.12 Supplementary material**

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fvets.2021.742868/full#supplementary-material>

## **7.13 References**

1. Jorgensen K, Jensen LS. Chemical and biochemical variation in animal manure solids separated using different commercial separation technologies. *Bioresour Technol.* (2009) 100:3088–96. doi: 10.1016/j.biortech.2009.01.065
2. Husfeldt AW, Endres MI, Salfer JA, Janni KA. Management and characteristics of recycled manure solids used for bedding in Midwest freestall dairy herds. *J Dairy Sci.* (2012) 95:2195–203. doi: 10.3168/jds.2011-5105
3. Patel K, Godden SM, Royster E, Crooker BA, Timmerman J, Fox L. Relationships among bedding materials, bedding bacteria counts, udder hygiene, milk quality, and udder health in US dairy herds. *J Dairy Sci.* (2019) 102:10213–34. doi: 10.3168/jds.2019-16692
4. Robles I, Kelton DF, Barkema HW, Keefe GP, Roy JP, von Keyserlingk MAG, et al. Bacterial concentrations in bedding and their association with dairy cow hygiene and milk quality. *Animal.* (2020) 14:1052–66. doi: 10.1017/S1751731119002787
5. Godden S, Bey R, Lorch K, Farnsworth R, Rapnicki P. Ability of organic and inorganic bedding materials to promote growth of environmental bacteria. *J Dairy Sci.* (2008) 91:151–9. doi: 10.3168/jds.2007-0415

6. Lasprilla-Mantilla MI, Wagner V, Pena J, Frechette A, Thivierge K, Dufour S, et al. Effects of recycled manure solids bedding on the spread of gastrointestinal parasites in the environment of dairies and milk. *J Dairy Sci.* (2019) 102:11308–16. doi: 10.3168/jds.2019-16866
7. Beauchemin J, Fréchette A, Thériault W, Dufour S, Fravallo P, Thibodeau A. Comparison of Microbiota of Recycled Manure Solids and Straw Bedding used in Dairy Farms in Eastern Canada. *J Dairy Sci.* (2022) 105(1):389-408. doi: 10.3168/jds.2021-20523
8. Leach KA, Archer SC, Breen JE, Green MJ, Ohnstad IC, Tuer S, et al. Recycling manure as cow bedding: potential benefits and risks for UK dairy farms. *Vet J.* (2015) 206:123–30. doi: 10.1016/j.tvjl.2015.08.013
9. Rowbotham RF, Ruegg PL. Associations of selected bedding types with incidence rates of subclinical and clinical mastitis in primiparous Holstein dairy cows. *J Dairy Sci.* (2016) 99:4707–17. doi: 10.3168/jds.2015-10675
10. Harrison E, Bonhotal J, Schwarz M. *Using Manure Solids as Bedding.* Ithaca, NY: Cornell Waste Management Institute (2008).
11. Husfeldt AW, Endres MI. Association between stall surface and some animal welfare measurements in freestall dairy herds using recycled manure solids for bedding. *J Dairy Sci.* (2012) 95:5626–34. doi: 10.3168/jds.2011-5075
12. Gagnon M, Hamelin L, Frechette A, Dufour S, Roy D. Effect of recycled manure solids as bedding on bulk tank milk and implications for cheese microbiological quality. *J Dairy Sci.* (2020) 103:128–40. doi: 10.3168/jds.2019-16812
13. Sargeant JM, O'Connor AM, Dohoo IR, Erb HN, Cevallos M, Egger M, et al. Methods and processes of developing the strengthening the reporting of observational studies in epidemiology-veterinary (STROBE-Vet) statement. *J Food Prot.* (2016) 79:2211–9. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-16-016
14. Sears PM, McCarthy KK. Diagnosis of mastitis for therapy decisions. *Vet Clin North America Food Anim Pract.* (2003) 19:93–108. doi: 10.1016/S0749-0720(02)00074-9

15. Jamali H, Barkema HW, Jacques M, Lavallee-Bourget EM, Malouin F, Saini V, et al. Invited review: incidence, risk factors, and effects of clinical mastitis recurrence in dairy cows. *J Dairy Sci.* (2018) 101:4729–46. doi: 10.3168/jds.2017-13730
16. NMC. *Laboratory Handbook on Bovine Mastitis*. 3rd ed. New Prague: NMC (2017).
17. Cameron M, Perry J, Middleton JR, Chaffer M, Lewis J, Keefe GP. Short communication: evaluation of MALDI-TOF mass spectrometry and a custom reference spectra expanded database for the identification of bovine-associated coagulase-negative staphylococci. *J Dairy Sci.* (2018) 101:590–5. doi: 10.3168/jds.2017-13226
18. Olde Riekerink RG, Barkema HW, Kelton DF, Scholl DT. Incidence rate of clinical mastitis on Canadian dairy farms. *J Dairy Sci.* (2008) 91:1366–77. doi: 10.3168/jds.2007-0757
19. Makovec JA, Ruegg PL. Results of milk samples submitted for microbiological examination in Wisconsin from 1994 to 2001. *J Dairy Sci.* (2003) 86:3466–72. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(03)73951-4
20. Schukken Y, Chuff M, Moroni P, Gurjar A, Santisteban C, Welcome F, et al. The “other” gram-negative bacteria in mastitis: *Klebsiella*, *serratia*, and more. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* (2012) 28:239–56. doi: 10.1016/j.cvfa.2012.04.001
21. Grohn YT, Wilson DJ, Gonzalez RN, Hertl JA, Schulte H, Bennett G, et al. Effect of pathogen-specific clinical mastitis on milk yield in dairy cows. *J Dairy Sci.* (2004) 87:3358–74. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(04)73472-4
22. Grohn YT, Gonzalez RN, Wilson DJ, Hertl JA, Bennett G, Schulte H, et al. Effect of pathogen-specific clinical mastitis on herd life in two New York State dairy herds. *Prev Vet Med.* (2005) 71:105–25. doi: 10.1016/j.prevetmed.2005.06.002

## 8 Discussion générale

Ce projet de recherche était un projet d'envergure alors que la litière de fumier recyclé était plutôt méconnue des différents intervenants du secteur laitier. Alors que le projet était mis en branle, plusieurs collaborations au sein de la FMV, mais aussi avec l'IRDA et l'Université Laval ont été développées. Ces partenariats sont mentionnés ici puisque l'expertise très variée des différents collaborateurs a permis d'étudier cette litière en profondeur et sous de multiples facettes. Dans cette discussion, je me permettrai de référer aux travaux de ces collaborateurs puisque leurs analyses, combinées aux nôtres, permettent une compréhension plus globale des enjeux reliés à l'utilisation de LFR sous les vaches laitières.

Afin d'analyser les performances des fermes utilisant la LFR, un groupe de fermes comparatifs devait être constitué. Pour être en mesure de comparer des caractéristiques bactériologiques et physicochimiques entre différents types de litière (LFR vs comparatif), il a été décidé que les fermes du groupe comparatif devaient utiliser un seul type de litière et non une combinaison (ex. : mélange de litière de bois et paille). De plus, afin d'augmenter la puissance de l'étude, les fermes comparatives devaient toutes utiliser le même type de litière. La litière de paille a donc été choisie puisqu'elle était la litière la plus fréquemment utilisée au Québec au moment de l'étude. Afin de recruter rapidement ces fermes, une diffusion a été faite auprès des clients de Lactanet. Ce type de recrutement pourrait entraîner un certain biais de sélection. Cependant, il est important de noter que parmi les fermes LFR recrutées, 20 troupeaux sur 27 étaient aussi clients de Lactanet, ce qui limite grandement la possibilité d'un biais de sélection ou du moins, son amplitude.

La première étape du projet consistait d'abord à déterminer de quelle façon les fermes utilisant la LFR avaient intégré ce bioprocédé dans leurs bâtiments et quelles étaient les pratiques de gestion qui s'y rattachaient. Nous avons pu constater que la mise en place d'un système de production de LFR peut se faire dans n'importe quel type de bâtiment (neuf ou plus ancien, stabulation libre ou entravée) et que les producteurs laitiers peuvent se révéler très créatifs en

ce qui a trait au choix de contenants utilisés pour laisser reposer la litière. Sans grande surprise, les producteurs se tournaient vers les avenues les moins coûteuses.

Lors de la mise en place du projet, la perception quant à l'innocuité de la LFR découlait d'une extrapolation sur les principes théoriques du compostage général. Il a en effet été démontré qu'un compostage adéquat de matière organique réduit sa concentration en agents pathogènes (2). Il était donc supposé que la litière de fumier, une fois compostée, présenterait une concentration jugée acceptable d'agents pathogènes. Une autre théorie avancée sur la LFR était que le microbiome intrinsèque résultant du compostage empêcherait la croissance bactérienne d'agents pathogènes reconnus nocifs pour la santé de la vache, en particulier la santé de la glande mammaire. L'équipe de recherche a pu constater que sur le terrain, à l'exception de la ferme qui utilisait un biodigesteur, les fermes n'effectuaient pas un compostage en bonne et due forme de la fraction solide du fumier. Que ce soit secondaire à une contrainte logistique (ex. : manque d'espace) ou par besoin rapide de litière, les producteurs ne laissaient mûrir le substrat que quelques jours. En contexte de production de litière par recyclage de la fibre du fumier, le terme compostage n'est donc pas, à notre avis, approprié. La présente équipe de recherche suggérerait plutôt le terme « traitement post-séparation ».

L'impact sur les fermes étudiées d'un traitement suboptimal du substrat sur ses caractéristiques microbiologiques a pu être décrit par les travaux de bactériologie de nos collègues de la Chaire de recherche en salubrité de viandes de la FMV. Ces chercheurs ont pu démontrer que la LFR en pré-utilisation contenait généralement des concentrations plus importantes d'agents pathogènes que la litière de paille (34). La seule exception était la concentration de *Klebsiella* spp. qui était significativement plus élevée dans la litière de paille. De plus, toujours en pré-utilisation, la LFR contenait une concentration significativement plus élevée de *Salmonella* spp. et de *Listeria monocytogenes* que la litière de paille. Nous avons donc été en mesure de démontrer que les méthodes de préparation de LFR actuellement utilisées dans les fermes du Québec ne permettaient pas d'abaisser de façon importante la concentration en agents pathogènes, zoonotiques ou non, du substrat. Après utilisation sous les vaches, les différences entre les deux litières quant aux concentrations de streptocoques, staphylocoques et coliformes s'amenuisaient et reflétaient alors plutôt la contamination de la litière par les déjections animales.

Des analyses parasitologiques réalisées à la FMV sur les mêmes échantillons ont aussi révélé que les méthodes de conditionnement actuelles de la LFR ne permettaient pas de réduire significativement la concentration de *Cryptosporidium* spp. et d'*Eimeria* spp. dans la litière prête à l'emploi (35). L'utilisation de LFR en cycle continu permettait donc de disséminer dans l'ensemble de la ferme des agents parasitaires et zoonotiques (*Cryptosporidium* spp.). Un nombre important de fermes LFR (23/27) présentaient des oocystes de *Cryptosporidium* spp. dans les échantillons de fumier du troupeau. Cette proportion était significativement plus élevée que celle des fermes sur litière de paille (30/61).

L'utilisation de la LFR semblait donc associée à une exposition accrue des vaches et en particulier de leur glande mammaire à une concentration importante d'agents pathogènes. La suite du projet visait donc à déterminer comment évoluerait la litière lorsqu'elle serait en contact avec des animaux et qu'elle serait contaminée par des déjections animales. De par sa composition (humidité élevée et abondance de nutriments), nous soupçonnions que cette litière fournirait un excellent milieu de recroissance d'agents pathogènes lorsqu'elle serait contaminée. Cette hypothèse avait déjà fait l'objet d'une étude et s'était révélée concluante (12). Comme nous avons pu observer que le traitement en ferme de la LFR ne correspond pas à un compostage, nous n'avons pas supposé qu'une compétition par le microbiote intrinsèque de la LFR ferait obstacle à la croissance d'agents pathogènes. En s'inspirant des travaux de Godden et al. (12), nous avons élaboré des essais de recroissance qui seraient représentatifs des fermes québécoises en termes de méthodes de production utilisées. Nous avons sélectionné des LFR produites de différentes façons (traitement en tas, contenant ou en cuve rotative) et avec des durées de traitement suboptimales, mais couramment utilisées. Nous avons aussi décidé, afin de refléter la situation en ferme commerciale, de ne pas stériliser les échantillons de litière préalablement à leur inoculation par des coliformes. Nous supposons qu'une litière pourrait présenter un comptage bactérien élevé secondaire à la croissance d'agents pathogènes inoculés par les animaux, mais qu'un comptage bactérien élevé pourrait aussi être en partie secondaire à la réplication d'agents pathogènes initialement présents dans le substrat. Les résultats de nos essais de recroissance nous ont permis de poursuivre nos réflexions sur le « comportement » de cette litière. D'abord, nous avons pu constater que des LFR produites de différentes façons n'étaient pas équivalentes

et que la LFR produite par cuve rotative réagissait à une inoculation par des *Klebsiella pneumoniae* un peu comme la litière de sable, c'est-à-dire qu'elle avait une concentration intrinsèque initiale très faible de *K. pneumoniae* et qu'une fois inoculée, elle démontrait une période active de croissance bactérienne pendant les 24 premières heures de l'essai. D'un autre côté, les LFR produites en contenant ou en tas (les deux LFR les plus souvent utilisées au Québec) non-inoculées présentaient une concentration initiale relativement élevée de *K. pneumoniae* et cette concentration continuait d'augmenter au cours de l'essai. De plus, ces deux types de LFR n'ont pas démontré de phase de croissance bactérienne active au cours de l'essai lorsqu'elles étaient inoculées. Le support pour la recroissance bactérienne par les litières semblait dicté par un effet de saturation, c'est-à-dire qu'une litière présentant déjà une concentration élevée d'agent pathogène ne démontrait pas de croissance bactérienne significative lorsqu'inoculée, alors qu'une litière avec une concentration initiale faible d'agents pathogènes expérimentait une croissance bactérienne significative lorsqu'inoculée. Du point de vue de la santé des vaches laitières, il serait préférable de minimiser leur exposition (en termes de temps de contact) à une litière contenant une concentration élevée de *K. pneumoniae*, puisque cet agent pathogène est reconnu pour causer des mammites cliniques sévères et pouvant menacer la vie de l'animal (38, 39). Une question qui demeure en suspens est la fréquence à laquelle la litière souillée devrait être retirée afin de minimiser l'exposition de la glande mammaire des vaches à des concentrations élevées de *K. pneumoniae*. Nous avons identifié qu'une LFR ayant une concentration initiale faible de *K. pneumoniae* démontrerait une phase de croissance bactérienne lors des premières 24 h, mais il serait intéressant de refaire des essais afin de mieux détailler les événements qui se déroulent durant les premières 24 h d'utilisation. En effet, il serait très pertinent d'être en mesure de déterminer un nombre d'heures maximal d'utilisation de la litière afin de limiter l'exposition des vaches à une concentration trop élevée d'agents pathogènes. Lors du projet, l'ajout de nouvelle LFR dans les stalles (tout système de logettes confondues) à une fréquence > 1 fois/jour était réalisée chez 9 des 27 fermes participantes.

Des analyses physicochimiques des litières ont aussi été réalisées par les collaborateurs de l'IRDA. Les échantillons de litière ont été analysés afin de déterminer leur constitution en termes de matière sèche, de cendre, de matière organique, de pH, de carbone et d'azote. Par contre, les

liens entre les composantes physicochimiques et la santé des animaux n'ont pas encore été démontrés. La caractéristique physicochimique la plus discutée parmi les intervenants laitiers est sans contredit la teneur en matière sèche de la litière. Une théorie des intervenants du milieu laitier est qu'une litière plus sèche est gage de qualité et sera donc sécuritaire pour la santé de la glande mammaire. Un seuil souvent véhiculé dans le milieu est l'atteinte d'un taux de matière sèche de 34% dans la litière prête à l'emploi. Après plusieurs recherches d'articles et lectures, ce seuil semble avoir été largement véhiculé suite à une étude exploratoire réalisée par Bradley et al. en 2014 (40). Lorsque cette étude est analysée en profondeur, on réalise que ce seuil a en fait été proposé par les équipementiers et ne s'appuie pas sur des données probantes en lien avec la santé animale. Dans le cadre de notre projet, la LFR, lorsqu'étalée sous les vaches, continuait de sécher au cours de son utilisation (données non présentées). Ceci nous a emmenés à nous questionner sur la pertinence de ce taux de matière sèche comme critère de qualité de litière. En effet, pourquoi accorder une valeur à la proportion de matière sèche dans la litière prête à l'emploi, alors que cette proportion sera appelée à évoluer rapidement lors de son utilisation?

Une des limites du projet est le nombre relativement restreint de fermes LFR. Lorsque nous tentons de déterminer l'impact d'une méthode de production en particulier sur les caractéristiques bactériologiques et physicochimiques d'une LFR, les 27 fermes peuvent être sous-divisées en plusieurs petits groupes selon l'équipement utilisé pour produire la litière et les pratiques de gestion en place à la ferme. Il devient donc difficile d'établir des associations statistiquement valides. Il est toutefois à noter que cette hétérogénéité des fermes est également retrouvée dans la littérature, alors que les fermes utilisant la LFR sont très souvent rapportées comme un seul groupe, peu importe la façon dont ils produisent ou gèrent la litière. C'est donc pour enrichir cette base de données qu'une collaboration avec un groupe de chercheurs de l'université du Minnesota a été débutée. Nous supposons que des liens existent entre les méthodes de production et les caractéristiques bactériologiques et physicochimiques de la LFR et nous allons analyser ces relations par des analyses en composantes principales avec la collaboration de la plateforme IA Agro-santé de la FMV. Nous aimerions aussi faire le lien avec les caractéristiques de la LFR et les impacts possibles sur la santé de la glande mammaire des animaux. Finalement, nous aimerions aussi particulièrement valider l'impact de la teneur en



matière sèche de la litière sur les caractéristiques bactériologiques de la litière et sur la santé des animaux.

Après avoir caractérisé la LFR d'un point de vue microbiologique, nous avons voulu vérifier de quelle façon cette litière influençait la santé des animaux. Nous avons d'abord validé si cette litière était bénéfique pour la santé des jarrets des vaches. Nous avons supposé que la litière, puisque produite en grande quantité, serait appliquée généreusement dans les stalles et serait associée avec des jarrets plus sains. Cependant, nous n'avons pas été en mesure de démontrer cette hypothèse puisque nous n'avons pas réussi à mettre en évidence une différence dans les prévalences de lésions aux jarrets entre les deux groupes d'animaux. Notre hypothèse de recherche visait la démonstration d'une association entre la litière utilisée et la prévalence de lésions aux jarrets. Cependant, il importe de rappeler que plusieurs aspects entourant les stalles peuvent influencer l'état des jarrets de façon plus importante que le type de litière utilisé. Parmi eux, notons l'utilisation d'un système de logettes profondes, la configuration et la dimension des stalles et la régie de la litière (ex. : fréquence d'ajout).

Du point de vue de la propreté des animaux, nous avons pu démontrer que les vaches logées sur la LFR avaient, comme supposé, une meilleure propreté que celles du groupe comparatif. D'un point de vue anatomique, les flancs et le haut des pattes n'étaient pas significativement plus propres que ceux des vaches logées sur paille. Cependant, le bas des pattes et le pis des vaches logées sur LFR étaient significativement plus propres chez les vaches logées sur LFR. Puisque la santé de la glande mammaire était une inquiétude importante du groupe de recherche, la propreté du pis, d'un point de vue macroscopique, était un constat encourageant. Il fallait ensuite valider concrètement comment cette litière affectait la composition du lait, les CCS et l'incidence de MC chez les vaches.

Lors de la visite des fermes, un échantillon du réservoir de lait a aussi été prélevé pour analyse par les collaborateurs de l'université Laval. Cette collaboration visait à répondre à quelques inquiétudes des transformateurs laitiers. D'abord, est-ce qu'un changement aussi important dans l'environnement des vaches laitières influencerait le microbiote du lait? Est-ce qu'un traitement de la litière impliquant une élévation de la température favoriserait l'émergence de populations

bactériennes thermoduriques ou thermorésistantes? Si tel était le cas, comment le lait provenant de ces fermes pourrait-il être traité en usine où la pratique en cours est aussi un traitement lié à l'exposition à une température élevée (c.-à-d. la pasteurisation)? La prévalence de bactéries thermorésistantes ou thermoduriques aérobies n'était pas différente entre les deux groupes de fermes (36). Par contre, le microbiote du lait variait selon la litière utilisée. Le lait de fermes LFR contenait une plus grande proportion de streptocoques et d'entérocoques. Ces changements de populations bactériennes n'ont pas entraîné de problème de qualité dans un modèle de production fromagère de cheddar frais. La présence de ces bactéries pourrait cependant entraîner des défauts organoleptiques lors de la production de fromages à plus longue période d'affinage. Cette théorie n'a cependant pas été vérifiée dans la présente étude. À l'heure actuelle, le nombre de fermes utilisant la LFR demeure faible. Par conséquent, le lait des fermes LFR est grandement dilué avec du lait de fermes utilisant des litières plus conventionnelles à l'usine de transformation. Si l'utilisation de cette litière continue de gagner en popularité dans les prochaines années, ces différences de microbiote et les impacts en usine de transformation devront être revalidés.

De notre côté, nous n'avons pas étudié la qualité du lait au niveau du réservoir, mais nous sommes plutôt concentrés du point de vue de chaque animal. Nous avons évalué la dynamique de CCS par plusieurs modèles statistiques. Comme nous l'avons supposé, la prévalence et l'incidence de MSC n'étaient pas différentes entre les deux groupes. Les MSC sont plus souvent liées à la présence d'agents pathogènes contagieux qui se transmettent d'un animal à l'autre durant la traite, alors que les MC, de leur côté, résultent à la fois d'IIM par des agents pathogènes d'origine environnementale et/ou contagieuse (31-33). Notre hypothèse ici était qu'en introduisant la LFR dans un troupeau, un changement important surviendrait principalement au niveau des agents pathogènes d'origine environnementale, mais sans affecter les agents pathogènes d'origine contagieuse. Nous avons supposé que les vaches seraient exposées à une concentration élevée d'agents pathogènes dans l'environnement et présenteraient donc une incidence plus élevée de MC d'origine environnementale que les vaches du groupe comparatif. Au final, l'incidence de MC n'était pas différente entre les deux groupes. Cependant, une des forces de notre projet résidait dans le fait que chaque cas de MC échantillonné par le producteur faisait l'objet d'une analyse

par culture suivie de spectrométrie de masse. Grâce à ces analyses, nous avons pu déterminer que les agents pathogènes responsables des MC n'étaient pas les mêmes dans les deux groupes de fermes. Les vaches sur LFR avaient 7 fois plus de chance que les vaches logées sur paille de subir un épisode de MC dû à *K. pneumoniae*. Comme mentionné précédemment, les MC causées par cet agent ont un effet dévastateur sur les vaches qui en sont atteintes. Il s'agit d'un résultat très important de notre projet, d'abord par la force de l'association qui a été trouvée, et d'autre part parce que ce résultat confirme des impressions cliniques provenant du terrain et qui nous avaient été rapportées par des producteurs laitiers, des agronomes et des médecins vétérinaires.

Des interrogations demeurent sur la problématique du *K. pneumoniae* chez les fermes utilisatrices de LFR et l'ensemble des analyses réalisées dans le cadre du projet peuvent aider à tirer certaines conclusions et orienter vers de futures pistes de recherche. On pourrait supposer que les vaches logées sur LFR ont plus de MC causées par *K. pneumoniae* car elles y sont exposées à une concentration plus importante comparées aux vaches logées sur paille. Or, nous avons vu que ce n'est pas le cas et que c'est la paille qui présente la plus forte concentration en *Klebsiella* spp. en pré-utilisation. Nous avons aussi constaté que la LFR prête à l'emploi, telle qu'elle est la plus souvent produite au Québec (traitement post-séparation en tas ou en contenant), contient une concentration non-négligeable de *K. pneumoniae* et que, même sans contamination par des déjections animales, cette concentration augmentera rapidement dans les premières 24 h après étalement sous les animaux. Par contre, *in vitro*, cette litière semble démontrer un effet de saturation lorsqu'inoculée par du *K. pneumoniae*. C'est-à-dire que, passé une certaine concentration, le rythme de réplique bactérienne semblait stagner. Bien que ce n'était pas dans les objectifs initiaux des essais de recroissance, il aurait été intéressant d'analyser les profils de virulence des *K. pneumoniae* intrinsèques à la litière. On pourrait supposer que l'utilisation de la litière en continu a favorisé la sélection de souches de *K. pneumoniae* plus virulentes pour la glande mammaire. Il aurait aussi été intéressant de marquer les *K. pneumoniae* inoculées pour ensuite être en mesure de valider si ce sont les bactéries intrinsèques qui ont connu la plus grande croissance, celles inoculées ou un mélange des deux. Finalement, si des essais de recroissance devaient être refaits, il serait pertinent de se concentrer sur les premières 24 h post-inoculation afin d'évaluer plus précisément les patrons de croissance bactérienne.

Nous aurions aussi pu supposer que les vaches logées sur LFR seraient sales et seraient donc plus à risque d'introduction d'agents pathogènes dans le trayon au moment de la récolte du lait. Cependant, nos analyses ont permis de démontrer que les pis et le bas des pattes des vaches logées sur LFR étaient plus propres que ceux des vaches du groupe comparatif. Il s'agissait cependant d'évaluations visuelles de l'hygiène. Avec le recul, il aurait été très pertinent de réaliser des écouvillons de trayons afin d'établir l'association entre un trayon d'apparence propre et le comptage bactérien de *K. pneumoniae* retrouvées à sa surface. Des écouvillons prélevés après la désinfection des trayons auraient aussi permis de valider l'efficacité des procédures en place à la ferme pour nettoyer les trayons. Nous supposons que par son faible taux en matière sèche et sa nature légère et duveteuse, la LFR aurait la possibilité d'adhérer aux trayons et qu'il pourrait être difficile de bien désinfecter les trayons avant l'installation de l'unité de traite, ce qui constituerait un risque d'introduction d'agents pathogènes dans le canal du trayon. Ce dernier point, une meilleure adhérence de la LFR aux trayons, permettrait d'expliquer la plus grande prévalence de MC causée par *K. pneumoniae* dans les troupeaux sur LFR, alors que cette litière contient des quantités égales ou même moindres de cet agent pathogène. Plus de recherches seront nécessaires afin de comprendre la problématique entourant l'incidence élevée de MC à *K. pneumoniae*, mais aussi afin de continuer à étayer les connaissances sur la LFR.

## 9 Conclusion

Nos travaux nous ont permis de mettre en évidence certains risques liés à l'utilisation de LFR pour la santé des animaux, plus particulièrement, une incidence élevée de mammite clinique à *Klebsiella pneumoniae*. Par contre, l'utilisation de cette litière n'entraînait pas d'impact négatif au niveau des dynamiques de CCS chez les vaches, de leur propreté et de la santé des jarrets. Ce système de litière semble être une solution facile à mettre en place pour créer de la litière à la ferme à partir d'un sous-produit animal (fumier). Cependant, il est simpliste de penser que les mesures de production actuellement utilisées permettent de produire une litière de qualité semblable, de par son contenu en agents pathogènes, aux autres litières (inorganiques ou organiques) actuellement disponibles sur le marché. Après nos travaux, nous sommes toujours incapables de nous prononcer à savoir si une méthode de production est supérieure à une autre et sur les critères sur lesquels nous devrions nous baser pour déterminer qu'une LFR est supérieure à une autre (ex. : concentrations d'agents pathogènes, taux de matière sèche, etc.). Les collaborations en cours avec la plateforme IA Agrosanté devraient nous permettre d'aller plus loin dans ces réflexions.

Au cours de nos différentes analyses, nous avons pu constater que la LFR n'était pas avantageuse pour les animaux lorsque comparée à la paille, à l'exception du niveau d'hygiène des animaux. La problématique des MC à *K. pneumoniae* constitue un risque important pour la santé des animaux qui surpasse, à notre avis, l'attrait d'un bon niveau de propreté.

D'un point de vue vétérinaire, nous avons plus de réserves que d'enthousiasme à recommander l'utilisation de ce type de litière. Cependant, les producteurs laitiers peuvent avoir des motivations qui diffèrent des nôtres, que ce soit par la disponibilité d'un produit ou par des motivations d'ordre économique par exemple. Le rôle du médecin vétérinaire praticien sera alors d'accompagner le producteur dans cette gestion de risque que représente l'intégration de cette pratique à la ferme. À cet effet, le médecin vétérinaire pourra faire une analyse de la santé du troupeau en veillant à ce que le système immunitaire des vaches soit le plus efficace possible. La résistance des vaches aux infections peut être améliorée en diminuant les éléments stressants

auxquels elles sont soumises (ex. : densité d'élevage adéquate), en leur offrant une alimentation de qualité, en contrôlant l'incidence d'autres maladies immunosuppressives (ex. : suivi rigoureux de condition d'hypercétonémie en période post-partum) et en ayant une couverture vaccinale appropriée. De plus, l'inspection du système de traite, de la méthode de traite ainsi que l'évaluation de l'état des bouts de trayons des vaches devraient faire l'objet d'investigations par le médecin vétérinaire. On peut ainsi espérer qu'en contrôlant plusieurs points critiques à la ferme, le risque pour la santé de la glande mammaire des vaches introduit par l'utilisation de la LFR sera amoindri.

## Références bibliographiques

1. Centre de référence en agriculture et agroalimentaire du Québec (CRAAQ). La biométhanisation à la ferme. Repéré à: <https://www.craaq.qc.ca/data/DOCUMENTS/EVC033.pdf>. 2008.
2. Rynk RvdK, Maarten; Willson, George B.; Singley, Mark E.; Richard, Tom L.; Kolega, John J.; Gouin, Francis R.; Laliberty, Lucien; Kay, David; Murphy, Dennis, W.; Hoitink, Harry A. J.; Brinton, William F. On-farm composting handbook. Ithaca, NY: Northeast Regional Agricultural Engineering Service, Cooperative Extension; 1992.
3. Ontario Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (OMAFRA). Ministère de l'Agriculture de l'Alimentation et des Affaires Rurales de l'Ontario. Introduction au compostage agricole 2015k [Available from: <http://www.omafra.gov.on.ca/french/engineer/facts/05-024.htm>].
4. Godbout S. Litière recyclée en production laitière : État des connaissances et balises. CRSAD-IRDA, . 2019.
5. Fournel S, Godbout S, Ruel P, Fortin A, Genereux M, Cote C, et al. Production of recycled manure solids for bedding in Canadian dairy farms: I. Solid-liquid separation. *J Dairy Sci.* 2019;102(2):1832-46.
6. Burton CH. The potential contribution of separation technologies to the management of livestock manure. *Livestock Science.* 2007;112(3):208-16.
7. Ontario Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (OMAFRA). Ministère de l'Agriculture de l'Alimentation et des Affaires Rurales de l'Ontario. Utilisation de solides de fumier comme litière compostée. 2016 [Available from: <http://www.omafra.gov.on.ca/french/engineer/facts/15-020.htm#2>].
8. Husfeldt AW, Endres MI, Salfer JA, Janni KA. Management and characteristics of recycled manure solids used for bedding in Midwest freestall dairy herds. *J Dairy Sci.* 2012;95(4):2195-203.
9. Cole KJ, Hogan JS. Short communication: Environmental mastitis pathogen counts in freestalls bedded with composted and fresh recycled manure solids. *J Dairy Sci.* 2016;99(2):1501-5.
10. Robles I, Kelton DF, Barkema HW, Keefe GP, Roy JP, von Keyserlingk MAG, et al. Bacterial concentrations in bedding and their association with dairy cow hygiene and milk quality. *Animal.* 2020;14(5):1052-66.
11. Patel K, Godden SM, Royster E, Crooker BA, Timmerman J, Fox L. Relationships among bedding materials, bedding bacteria counts, udder hygiene, milk quality, and udder health in US dairy herds. *J Dairy Sci.* 2019;102(11):10213-34.
12. Godden S, Bey R, Lorch K, Farnsworth R, Rapnicki P. Ability of organic and inorganic bedding materials to promote growth of environmental bacteria. *J Dairy Sci.* 2008;91(1):151-9.
13. Hogan JS, Bogacz VL, Thompson LM, Romig S, Schoenberger PS, Weiss WP, et al. Bacterial counts associated with sawdust and recycled manure bedding treated with commercial conditioners. *J Dairy Sci.* 1999;82(8):1690-5.
14. Sorter DE, Kester HJ, Hogan JS. Short communication: Bacterial counts in recycled manure solids bedding replaced daily or deep packed in freestalls. *J Dairy Sci.* 2014;97(5):2965-8.
15. Lombard JE, Tucker CB, von Keyserlingk MA, Kopral CA, Weary DM. Associations between cow hygiene, hock injuries, and free stall usage on US dairy farms. *J Dairy Sci.* 2010;93(10):4668-76.
16. Esser NM, Su H, Coblenz WK, Akins MS, Kieke BA, Martin NP, et al. Efficacy of recycled sand or organic solids as bedding sources for lactating cows housed in freestalls. *J Dairy Sci.* 2019;102(7):6682-98.
17. Schreiner DA, Ruegg PL. Effects of tail docking on milk quality and cow cleanliness. *J Dairy Sci.* 2002;85(10):2503-11.

18. Husfeldt AW, Endres MI. Association between stall surface and some animal welfare measurements in freestall dairy herds using recycled manure solids for bedding. *J Dairy Sci.* 2012;95(10):5626-34.
19. Reneau JK, Seykora AJ, Heins BJ, Endres MI, Farnsworth RJ, Bey RF. Association between hygiene scores and somatic cell scores in dairy cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association.* 2005;227(8):1297-301.
20. Adams AE, Lombard JE, Fossler CP, Roman-Muniz IN, Koprak CA. Associations between housing and management practices and the prevalence of lameness, hock lesions, and thin cows on US dairy operations. *J Dairy Sci.* 2017;100(3):2119-36.
21. Flower FC, Weary DM. Effect of hoof pathologies on subjective assessments of dairy cow gait. *J Dairy Sci.* 2006;89(1):139-46.
22. National Mastitis Council (NMC). *National Mastitis Council: Current Concepts of Bovine Mastitis.* 5 ed. New Prague, MN, USA 2016.
23. Dohoo IR, Meek AH. Somatic cell counts in bovine milk. *Can Vet J.* 1982;23(4):119-25.
24. Shook GE. Genetic improvement of mastitis through selection on somatic cell count. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 1993;9(3):563-81.
25. Rowbotham RF, Ruegg PL. Associations of selected bedding types with incidence rates of subclinical and clinical mastitis in primiparous Holstein dairy cows. *J Dairy Sci.* 2016;99(6):4707-17.
26. Harrison E, Bonhotal J, Schwarz M. *Using manure solids as bedding.* Ithaca, NY: Cornell Waste Management Institute.; 2008.
27. Leach KA, Archer SC, Breen JE, Green MJ, Ohnstad IC, Tuer S, et al. Recycling manure as cow bedding: Potential benefits and risks for UK dairy farms. *Vet J.* 2015;206(2):123-30.
28. Rowbotham RF, Ruegg PL. Association of bedding types with management practices and indicators of milk quality on larger Wisconsin dairy farms. *J Dairy Sci.* 2015;98(11):7865-85.
29. Bonhotal J, Schwarz M, Stehman SM. How *Mycobacterium avium* paratuberculosis is affected by the composting process. *Trends in Animal & Veterinary Sciences Journal.* 2011;2(1):5-10.
30. Conditions of Use in Relation to the Use of Recycled Manure Solids as Bedding for Dairy Cattle 2016 [Available from: [https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment\\_data/file/585281/guid-ab143.pdf](https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/585281/guid-ab143.pdf).
31. Shook GE, Kirk RLB, Welcome FL, Schukken YH, Ruegg PL. Relationship between intramammary infection prevalence and somatic cell score in commercial dairy herds. *J Dairy Sci.* 2017;100(12):9691-701.
32. de Haas Y, Barkema HW, Schukken YH, Veerkamp RF. Associations between somatic cell count patterns and the incidence of clinical mastitis. *Prev Vet Med.* 2005;67(1):55-68.
33. Reyher KK, Dohoo IR. Diagnosing intramammary infections: evaluation of composite milk samples to detect intramammary infections. *J Dairy Sci.* 2011;94(7):3387-96.
34. Beauchemin J, Frechette A, Theriault W, Dufour S, Fravallo P, Thibodeau A. Comparison of microbiota of recycled manure solids and straw bedding used in dairy farms in eastern Canada. *J Dairy Sci.* 2022;105(1): 389-408.
35. Lasprilla-Mantilla MI, Wagner V, Pena J, Frechette A, Thivierge K, Dufour S, et al. Effects of recycled manure solids bedding on the spread of gastrointestinal parasites in the environment of dairies and milk. *J Dairy Sci.* 2019;102(12):11308-16.
36. Gagnon M, Hamelin L, Frechette A, Dufour S, Roy D. Effect of recycled manure solids as bedding on bulk tank milk and implications for cheese microbiological quality. *J Dairy Sci.* 2020;103(1):128-40.
37. Sears PM, McCarthy KK. Diagnosis of mastitis for therapy decisions. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice.* 2003;19(1):93-108.



38. Grohn YT, Gonzalez RN, Wilson DJ, Hertl JA, Bennett G, Schulte H, et al. Effect of pathogen-specific clinical mastitis on herd life in two New York State dairy herds. *Prev Vet Med.* 2005;71(1-2):105-25.
39. Grohn YT, Wilson DJ, Gonzalez RN, Hertl JA, Schulte H, Bennett G, et al. Effect of pathogen-specific clinical mastitis on milk yield in dairy cows. *J Dairy Sci.* 2004;87(10):3358-74.
40. Bradley AJ. Scoping Study on the Potential Risks (and Benefits) of using Recycled Manure Solids as Bedding for Dairy Cattle. Report prepared by QMMS, The Dairy Group & The University of Nottingham on behalf of DairyCo. 2014.

# Annexes

## Annexe 1 : Certificat du comité d'éthique de l'utilisation des animaux de l'université de Montréal



### AUTORISATION DU CÉUA *(section réservée à l'usage du CÉUA uniquement)*

Numéro d'autorisation du CÉUA : 17-Rech-1886

**Titre du projet :** Impacts des méthodes de préparation de la litière à base de fumier recyclé sur ses qualités microbiennes, sur la santé des vaches laitières et sur la qualité du lait.


- Autorise cette demande  
 Refuse cette demande

Classe/espèce	Nombre demandé	Nombre autorisé
Bovine	7000	7000
Sélectionnez		
Sélectionnez		
Sélectionnez		

Date d'évaluation par le CÉUA : 27 janvier 2017

Date de début de l'autorisation (valable pour un an) : 3 mai 2017

Date d'échéance de l'autorisation : 1<sup>er</sup> mai 2018

Signature du Président : 

Date : 3 mai 2017

## Annexe 2 : Questionnaire administré aux producteurs laitiers lors de la visite de ferme

### FERMES LFR

#### Descriptif général

- 1) Nombre de vaches en lactation : \_\_\_\_\_
- 2) Nombre de vaches en première lactation : \_\_\_\_\_
- 3) Production moyenne journalière par vache : \_\_\_\_\_
- 4) Le système de traite est-il vérifié annuellement?
  - Oui (SVP Précisez par qui) \_\_\_\_\_
  - Non
  - Autre (SVP Précisez) : \_\_\_\_\_
- 5) Est-ce que les **vaches en lactation** ont eu accès au pâturage dans les **derniers 12 mois**?
  - Non, elles sont gardées à l'intérieur à l'année longue.
  - Non, mais elles ont eu accès à un parc d'exercice gazonné (moins de 5 acres par 100 vaches)
  - Non, mais elles ont eu accès à un parc d'exercice non-gazonné (Pavé ou terre) (moins de 5 acres par 100 vaches)
  - Oui, elles étaient au pâturage à partir du mois de \_\_\_\_\_ jusqu'au mois de \_\_\_\_\_.  
(Mois) (Mois)

#### Bâtiment et équipement

- 6) Âge du bâtiment de ferme principal (environ): \_\_\_\_\_ ans
- 7) Âge des logettes/stalles : \_\_\_\_\_ ans
- 8) Date d'installation du système de litière de fumier recyclé : \_\_\_\_\_ mois/année
- 9) Si vous avez une **stabulation libre**, combien de fois par jour les allées sont-elles nettoyées?
  - Ne s'applique pas
  - \_\_\_\_\_ fois/jour.  
(Nombre)

10) Si vous avez une **stabulation libre**, combien de fois par jour les zones autour de l'abreuvoir et autres régions non accessible mécaniquement sont-elles nettoyées?

- Ne s'applique pas
- \_\_\_\_\_ fois/jour.  
(Nombre)
- Autre (SVP Précisez) \_\_\_\_\_

### Gestion de la litière

11) À quelle fréquence **retirez-vous les fumiers** dans les logettes (ou les parcs pour les étables sur litière accumulée) de vos **vaches en lactation**?

- Jamais
- \_\_\_\_\_ fois/jour  
(Nombre)
- Autre (SVP Précisez) \_\_\_\_\_

12) À quelle fréquence **ajoutez-vous de la nouvelle litière** dans les logettes (ou les parcs pour les étables sur litière accumulée) des **vaches en lactation**?

- Ne s'applique pas
- \_\_\_\_\_ fois/jour  
(Nombre)
- \_\_\_\_\_ fois/semaine  
(Nombre)
- \_\_\_\_\_ fois/an  
(Nombre)

13) Si vous **grattez la litière sale avant d'ajouter de la litière** à vos **vaches en lactation** quelle partie de la logette grattez-vous complètement?

- Je n'en enlève pas
- Le tiers arrière de la logette
- La moitié arrière de la logette
- La logette entière
- Litière souillée seulement
- Autre (SVP Précisez) \_\_\_\_\_

14) Si vous avez des logettes creuses ou des parcs sur litière accumulée, à quelle fréquence **retirez-vous et remplacez-vous complètement** la litière des logettes de vos **vaches en lactation**?

- Ne s'applique pas
- Jamais
- \_\_\_\_\_ fois/semaine  
(Nombre)
- \_\_\_\_\_ fois/mois  
(Nombre)
- Autre (SVP Précisez) \_\_\_\_\_

15) Ajoutez-vous un produit afin de limiter la croissance bactérienne dans la litière et/ou dans les logettes de vos **vaches en lactation**? (ex: chaux...)

- Oui (SVP précisez le produit utilisé, la quantité et la fréquence d'utilisation)  
\_\_\_\_\_
- Non

### Méthode de préparation de la litière

16) Décrivez-moi la procédure de production de litière étape par étape :

---

---

Pourcentage du fumier utilisé pour produire de la litière	
Provenance du fumier utilisé	
Méthode d'entreposage	
Méthode d'épandage	
Ajout d'eau ou autres (décrivez)	

17) Décrivez la durée des différentes étapes de production (**cochez et remplissez tous les énoncés applicables**) :

- Durée du compostage en cuve \_\_\_\_\_ h
- Durée entreposage en tas/andain \_\_\_\_\_ h
- Durée entreposage en boîte \_\_\_\_\_ h
- Durée entreposage en avant des vaches \_\_\_\_\_ h
- Autre (**SVP Précisez**) \_\_\_\_\_ h

18) Lorsque la litière est entreposée, la retournez-vous/déplacez-vous pour l'aérer?

- Oui (**SVP Précisez**) \_\_\_\_\_
- Non

19) Qui supervise le plus souvent la procédure?

- Propriétaire
- Employé
- Autre (**SVP Précisez**) \_\_\_\_\_

20) Combien de personne sont formées pour superviser la procédure?

- 1
- 2
- 3
- Autre (**SVP Précisez**) \_\_\_\_\_

21) Qui effectue la maintenance de l'équipement ?

- Propriétaire
- Employé
- Vendeur d'équipement
- Autre (**SVP Précisez**) \_\_\_\_\_

22) Depuis l'installation du système obtenez-vous une litière de qualité constante?

- Qualité constante
- Qualité variable (**Si oui, svp détaillez ce qui avait varié et la cause de cette variation**) \_\_\_\_\_

23) Si vous avez obtenu de la litière de qualité variable avez-vous modifié votre technique de production?

- Non-applicable**
- Non
- Oui (**SVP précisez**) :

---

---

24) Obtenez-vous suffisamment de litière pour vos animaux?

- Oui
- Non (SVP précisez comment vous palliez à ce manque) : \_\_\_\_\_

25) Décrivez-moi la gestion de litière faite avec vos différents groupes d'animaux (veaux naissants, vaches tarées, etc) et le temps passé sur les différentes litières, ainsi que le type de logements (attaché, libre, en groupe etc) \_\_\_\_\_

Logement et litière parc vêlage	
Logement et litière veaux naissants à sevrage	
Logement et litière veaux sevrés à saillie	
Logement et litière taures gestantes	
Logement et litière vaches en lait	
Logement et litière vaches tarées	

### Santé animale

26) Comptage cellules somatiques moyen des douze derniers mois : \_\_\_\_\_

27) Nombre de cas de mammite clinique dans les douze derniers mois : \_\_\_\_\_

28) Utilisez-vous un vaccin ou produit médicamenteux pour prévenir les cas de mammite?

- Oui (SVP détaillez) \_\_\_\_\_
- Non

29) Avez-vous vermifugé vos vaches adultes durant la dernière année?

- Oui (SVP indiquez la date, le produit utilisé et la dose)  
\_\_\_\_\_
- Non

## Appréciation globale

30) Jusqu'à présent, en général diriez-vous que vous êtes :

- Pleinement satisfait de votre LFR
- Plutôt satisfait de votre LFR
- Incertain de votre LFR
- Plutôt déçu de votre LFR
- Très déçu de votre LFR

31) Compte tenu de l'investissement initial requis pour implanter cette procédure, quel est votre degré de satisfaction :

- Pleinement satisfait de votre LFR
- Plutôt satisfait de votre LFR
- Incertain de votre LFR
- Plutôt déçu de votre LFR
- Très déçu de votre LFR

32) À votre avis, quel est l'impact de l'utilisation de LFR sur votre comptage de cellules somatiques?

- Augmentation des cellules somatiques
- Pas d'effet sur les cellules somatiques
- Diminution des cellules somatiques

33) À votre avis, quel est l'impact de l'utilisation de LFR sur le nombre de cas de mammites cliniques

- Augmentation du nombre de cas de mammites
- Pas d'effet sur le nombre de cas de mammites
- Diminution du nombre de case de mammites

34) À votre avis, quel est l'impact de l'utilisation de LFR sur la propreté des vaches

- Augmentation de la propreté des vaches
- Pas d'effet sur la propreté des vaches
- Diminution de la propreté des vaches

35) À votre avis, quel est l'impact de l'utilisation de LFR sur le confort des vaches

- Augmentation du confort des vaches
- Pas d'effet sur le confort des vaches
- Diminution du confort des vaches



36) À votre avis, quel est l'impact de l'utilisation de LFR sur la santé des veaux

- Ne s'applique pas
- Meilleur état de santé des veaux
- Pas d'effet sur la santé des veaux
- Détérioration de l'état de santé des veaux

37) Vos impressions générales sur cette procédure? Auriez-vous quelque chose à ajouter qui n'a pas été couvert? \_\_\_\_\_

---

---

### Observations directes

38) Type de système de traite

- Conventionnel
- Salon de Traite
- Robot de traite

39) Équipement utilisé pour produire la litière (cochez tous les énoncés qui s'appliquent et notez marque et modèle)

- Séparateur (SVP Précisez le type : centrifuge, presse à rouleaux ou vis sans fin) \_\_\_\_\_
- Cuve rotative \_\_\_\_\_
- Biodigester
- Compostage en andains
- Compostage en tas
- Compostage en boîte
- Autre (SVP précisez) : \_\_\_\_\_

40) Dimensions des contenants de litière

- Non applicable
- Tas \_\_\_\_\_ Largeur x longueur x hauteur
- Boîte \_\_\_\_\_ Largeur x longueur x hauteur

41) Si vous avez une **stabulation libre**, de quelle manière les **allées** sont-elles nettoyées?

- Ne s'applique pas
- Planché latté
- Grattées
- Autre (SVP Précisez) \_\_\_\_\_

42) De quel type de matériel est constitué **la base** des logettes (ou des parcs pour les étables sur litière accumulée) de vos **vaches en lactation**? (Cochez tout ce qui s'applique)

- Ciment
- Matelas
- Tapis de caoutchouc
- Logette creuse
- Autre (SVP Précisez) \_\_\_\_\_

43) Quel genre de **régie de la litière** utilisez-vous?

- J'applique une petite quantité de litière sur le dessus (moins de 2-5 cm d'épais)
- J'utilise des logettes creuses de \_\_\_\_\_ pouces emplies de litière
- Autre (SVP Précisez) \_\_\_\_\_

44) Noter le nombre d'heures depuis la dernière visite du camion à lait au moment de la récolte du lait : \_\_\_h

45) Noter le nombre d'heures d'utilisation de la litière au moment de la récolte de litière utilisée : \_\_\_h

## FERMES PAILLE

### Descriptif général :

- 1) Nombre de vaches en lactation : \_\_\_\_\_
- 2) Nombre de vaches en première lactation : \_\_\_\_\_
- 3) Production moyenne journalière par vache : \_\_\_\_\_
- 4) Le système de traite est-il vérifié annuellement?
  - Oui (SVP Précisez par qui) \_\_\_\_\_
  - Non
  - Autre (SVP Précisez) : \_\_\_\_\_
  
- 5) Est-ce que les **vaches en lactation** ont eu accès au pâturage dans les **derniers 12 mois**?
  - Non, elles sont gardées à l'intérieur à l'année longue.
  - Non, mais elles ont eu accès à un parc d'exercice gazonné (moins de 5 acres par 100 vaches)
  - Non, mais elles ont eu accès à un parc d'exercice non-gazonné (Pavé ou terre) (moins de 5 acres par 100 vaches)
  - Oui, elles étaient au pâturage à partir du mois de \_\_\_\_\_ jusqu'au mois de \_\_\_\_\_.  
(Mois) (Mois)

### Bâtiment et équipement

- 6) Âge du bâtiment de ferme principal (environ): \_\_\_\_\_ années
- 7) Âge des logettes/stalles : \_\_\_\_\_ années
- 8) Si vous avez une **stabulation libre**, combien de fois par jour les allées sont-elles nettoyées?
  - Ne s'applique pas
  - \_\_\_\_\_ fois/jour.  
(Nombre)
- 9) Si vous avez une **stabulation libre**, combien de fois par jour les zones autour de l'abreuvoir et autres régions non accessible mécaniquement sont-elles nettoyées?
  - Ne s'applique pas
  - \_\_\_\_\_ fois/jour.  
(Nombre)
  - Autre (SVP Précisez) \_\_\_\_\_

## Gestion de la litière

10) À quelle fréquence **retirez-vous les fumiers** dans les logettes (ou les parcs pour les étables sur litière accumulée) de vos **vaches en lactation**?

- Jamais
- \_\_\_\_\_ fois/jour  
(Nombre)
- Autre (SVP Précisez) \_\_\_\_\_

11) À quelle fréquence **ajoutez-vous de la nouvelle litière** dans les logettes (ou les parcs pour les étables sur litière accumulée) des **vaches en lactation**?

- Ne s'applique pas**
- \_\_\_\_\_ fois/jour  
(Nombre)
- \_\_\_\_\_ fois/semaine  
(Nombre)
- \_\_\_\_\_ fois/an  
(Nombre)

12) Si vous **grattez la litière sale avant d'ajouter de la litière** à vos **vaches en lactation** quelle partie de la logette grattez-vous complètement?

- Je n'en enlève pas
- Le tiers arrière de la logette
- La moitié arrière de la logette
- La logette entière
- Litière souillée seulement
- Autre (SVP Précisez) \_\_\_\_\_

13) Si vous avez des logettes creuses ou des parcs sur litière accumulée, à quelle fréquence **retirez-vous et remplacez-vous complètement** la litière des logettes de vos **vaches en lactation**?

- Ne s'applique pas**
- Jamais
- \_\_\_\_\_ fois/semaine  
(Nombre)
- \_\_\_\_\_ fois/mois  
(Nombre)
- Autre (SVP Précisez) \_\_\_\_\_

14) Ajoutez-vous un produit afin de limiter la croissance bactérienne dans la litière et/ou dans les logettes de vos **vaches en lactation**? (ex: chaux...)

Oui (SVP précisez le produit utilisé, la quantité et la fréquence d'utilisation) \_\_\_\_\_

Non

15) Décrivez-moi la gestion de litière faite avec vos différents groupes d'animaux (veaux naissants, vaches tarées, etc) et le temps passé sur les différentes litières, ainsi que le type de logements (attaché, libre, en groupe etc) \_\_\_\_\_

Logement et litière parc vêlage	
Logement et litière veaux naissants à sevrage	
Logement et litière veaux sevrés à saillie	
Logement et litière taures gestantes	
Logement et litière vaches en lait	
Logement et litière vaches tarées	

### Santé animale

16) Comptage cellules somatiques moyen des douze derniers mois : \_\_\_\_\_

17) Nombre de cas de mammite clinique dans les douze derniers mois : \_\_\_\_\_

18) Utilisez-vous un vaccin ou produit médicamenteux pour prévenir les cas de mammite?

Oui (SVP détaillez) \_\_\_\_\_

Non

19) Avez-vous vermifugé vos vaches adultes durant la dernière année?

Oui (SVP indiquez la date, le produit utilisé et la dose)

\_\_\_\_\_

Non

### Observations directes

20) Type de système de traite

Conventionnel

Salon de Traite

Robot de traite

21) Si vous avez une **stabulation libre**, de quelle manière les **allées** sont-elles nettoyées?

Ne s'applique pas

Planché latté

Grattées

Autre (SVP Précisez) \_\_\_\_\_

22) De quel type de matériel est constitué **la base** des logettes (ou des parcs pour les étables sur litière accumulée) de vos **vaches en lactation**? (Cochez tout ce qui s'applique)

Ciment

Matelas

Tapis de caoutchouc

Logette creuse

Autre (SVP Précisez) \_\_\_\_\_

23) Quel genre de **régie de la litière** utilisez-vous?

J'applique une petite quantité de litière sur le dessus (moins de 2-5 cm d'épais)

J'utilise des logettes creuses de \_\_\_\_\_ pouces emplies de litière

Autre (SVP Précisez) \_\_\_\_\_

24) Noter le nombre d'heures depuis la dernière visite du camion à lait au moment de la récolte du lait : \_\_\_\_\_ h

25) Noter le nombre d'heures d'utilisation de la litière au moment de la récolte de litière utilisée : \_\_\_\_\_ h

## Annexe 3 : Présentation orales, affiches et activités de transfert de connaissances réalisées dans le cadre du projet

### Conférences, présentations orales et affiches

- Fréchette A. et Dufour S. Atténuer l'impact de l'utilisation de litière de fumier recyclé sur la santé du troupeau. 2022 Colloque santé des troupeaux laitiers, Drummondville, Qc, Canada.
- Fréchette A., Fecteau G., Côté C., and Dufour S. Impact of recycled manure solids bedding on mammary health. 2022. Annual meeting National Mastitis Council, San Diego, USA (Poster and presentation; NMC scholar)
- Fréchette A., Fecteau G., Côté C., and Dufour S. L'utilisation de litière de fumier recyclé : les résultats de notre étude. 2021 Colloque santé des troupeaux laitiers, Drummondville, Qc, Canada.
- Fréchette A., Fecteau G., Côté C., and Dufour S. Le rôle important de *Klebsiella pneumoniae* dans les mammites cliniques des vaches laitières logées sur litière de fumier recyclé. 2021. Forum Techno Novalait. (1er prix présentation étudiante – Production)
- Fréchette A., Fecteau G., Côté C., and Dufour S. Subclinical mastitis in dairy cows housed on recycled manure solids bedding. 2021. Rencontre annuelle du regroupement Op+lait.
- Fréchette A., Fecteau G., and Dufour S. Impact de l'utilisation de litière à base de fumier recyclé sur l'incidence de mammite clinique chez la vache laitière. Journée de la recherche de la FMV. 2021. Saint-Hyacinthe, Canada.
- Fréchette A., Fecteau G., Côté C., and Dufour S. Incidence of clinical mastitis in dairy cows housed on recycled manure solids bedding. 2020. Rencontre annuelle du regroupement Op+lait. (2e prix concours d'affiches)
- Fréchette A., Fecteau G., Côté C., and Dufour S. Incidence of clinical mastitis in dairy cows housed on recycled manure solids bedding. 2020. Annual Scientific Meeting of the Mastitis Network. (2e prix concours d'affiches).
- Fréchette, A., Beauchemin J., and Dufour S. La litière de fumier recyclé: bonne ou mauvaise idée? 2020. Rencontre de la clinique ambulatoire du bureau vétérinaire de Richmond. Ste-Christine, Qc, Canada.
- Fréchette, A., Beauchemin J., and Dufour S. La litière de fumier recyclé: bonne ou mauvaise idée? 2020. Rencontre du service ambulatoire bovin de la Faculté de médecine vétérinaire de St-Hyacinthe. La présentation, Qc, Canada.
- Fréchette, A., Beauchemin J., and Dufour S. La litière de fumier recyclé: bonne ou mauvaise idée? 2020. Rencontre du club bovin (club étudiant) de la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal. St-Hyacinthe, Qc, Canada.

- Fréchette A., Fecteau G., Côté C., and Dufour S. Methods for preparing recycled manure solids bedding and their impact on cow's health and milk quality. Mastitis Research Worker. 2019. Columbia, Missouri, USA.
- Fréchette A. et Dufour S. En apprendre davantage sur les litières de fumier recyclé. 2018. Congrès de l'AMVPQ, Saguenay, Qc, Canada.

### **Activités de transfert de connaissances**

- Articles de vulgarisation :
  - Fréchette A., S. Dufour. La litière de fumier recyclé représente-elle un risque pour la santé de la glande mammaire des bovins? Le Praticien. Mars 2021.
  - Fréchette A., Beauchemin J., Lasprilla-Mantilla, M. I., S. Dufour, G. Fecteau. Utilisation de la litière du fumier recyclé : où en est la science? Le Producteur de lait Québécois. Novembre 2020.
  - Fréchette, A., J. Beauchemin, M. Lasprilla-Mantilla et S. Dufour. La litière de fumier recyclé : pas sans risques. La Terre de chez nous. Mars 2020.
  - Fréchette, A. Démystifier la litière de fumier recyclé. Le Producteur de Lait Québécois. Octobre 2018.
- Balado :
  - Production laitière – Épisode 5 : Litière de fumier recyclé (CRAAQ)
- Collaboration à la version 2 du guide « Litière de fumier recyclé en production laitière, état des connaissances et balises » produit par l'IRDA et le CRSAD (intégration des résultats obtenus dans le cadre de la présente thèse; réédition à venir)