

Associação entre as características físico-químicas e microbiológicas de cama de *Compost Barn* e a ocorrência de mastite em vacas leiteiras

Gabriela Siqueira Di Leo*

Gustavo Freu

Marcos Veiga dos Santos

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

*gabisiqueira@usp.br

Objetivos

O objetivo deste estudo foi: (a) avaliar a frequência de isolamento dos microrganismos causadores de mastite em vacas leiteiras alojadas em *Compost Bedded Pack Barn* (CB); e (b) avaliar a associação entre o risco de mastite clínica (MC) e subclínica (MSC) e as características microbiológicas e físico-químicas do material usado como cama em sistema CB.

Métodos e Procedimentos

Vacas provenientes de oito rebanhos leiteiros do estado de São Paulo alojadas em CB foram incluídas neste estudo e monitoradas por seis meses. Foram selecionadas vacas com contagem de células somáticas (CCS) >200.000 células/mL para coletas de amostras composta de leite (*pool* dos quatro quartos mamários) de forma asséptica, as quais foram submetidas à identificação microbiológica por ionização/dessorção a laser assistida por matriz acoplada a espectrometria de massa por tempo de voo (MALDI-TOF MS). O mesmo procedimento foi realizado, em nível de quarto mamário, para vacas com MC. Além disso, mensalmente, amostras de cama dos rebanhos foram coletadas para realização de análises físico-químicas (e.g., umidade, pH, matéria orgânica, relação carbono:nitrogênio) e microbiológicas (e.g., contagem bacteriana

total, coliformes, estreptococos e estafilococos). Para isso, foram coletadas amostras representativas da camada superficial (± 10 cm) e da camada profunda (± 20 cm) do material de cama da instalação. A temperatura de ambas camadas foi mensurada com auxílio de termômetro digital. Modelos mistos lineares foram construídos para determinar a associação entre as características físico-químicas e microbiológicas dos CB e o risco de MC e MSC. Foi utilizado procedimento de seleção de variáveis para construção e obtenção dos modelos finais. A significância estatística foi declarada quando $P < 0.05$ e tendência quando $P \geq 0.05$ e < 0.10 .

Resultados

Um total de 933 ($\pm 24,4$) vacas foi incluído neste estudo, no qual 55,16% das vacas foram da raça Holandesa, 42,91% Girolando (mestiças *Bos taurus taurus* x *Bos taurus indicus*), 1,16% Gir e 0,77% mestiças. O número de vacas em lactação médio por rebanho foi de 116 (variação de 45 a 208) com produção média diária de 29 ($\pm 3,7$) L/vaca. O material de cama mais comum entre os rebanhos foi serragem ($n = 6$), seguido por casca de amendoim ($n = 1$) e palha de arroz ($n = 1$).

Um total de 1853 amostras de leite de vacas com MSC foi analisado, e deste total, 39,8% ($n = 738$) das amostras foram cultura negativa (*i.e*

ausência de isolamento microbiano). Os patógenos mais frequentemente isolados foram *Staphylococcus chromogenes* (n = 478; 25,8%), *Streptococcus agalactiae* (n = 84; 4,5%) e *Streptococcus uberis* (n = 74; 3,9%).

Um total de 496 casos de MC foi registrado durante o período do estudo. Deste total, aproximadamente 50% (n = 245) das amostras foram cultura negativa. *Escherichia coli* (n = 49; 9,8%) apresentou maior frequência de isolamento de MC, seguido por *Streptococcus dysgalactiae* (n = 35; 7,0%) e *Streptococcus uberis* (n = 30; 6,0%). O risco de incidência de MSC geral foi de 38,4%, enquanto que para MC foi de 9,7%.

Em relação as características físico-químicas, a média geral de umidade do material de cama nos rebanhos avaliados foi de 43,3% ($\pm 8,7$), de pH foi de 8,3 ($\pm 0,4$), de matéria orgânica foi de 54,2% ($\pm 11,6$), e a relação carbono-nitrogênio média foi de 17,2 ($\pm 7,4$). A média geral de temperatura na superfície da cama foi de 36,5°C (± 5) e na camada profunda foi de 42,4°C (± 7).

Em relação às características microbiológicas do material de cama, as médias de contagem bacteriana total na camada superficial e profunda das camas foram 8,0 ($\pm 0,5$) e 7,7 ($\pm 0,5 \log_{10}$ ufc/g), respectivamente e da contagem de coliformes foram 5,8 ($\pm 0,9$) e 5,3 ($\pm 1,0 \log_{10}$ ufc/g), respectivamente. Por outro lado, a média da contagem de estreptococos na superfície e na camada profunda das camas foram 6,4 ($\pm 0,5$) e 6,0 ($\pm 0,6$), respectivamente e a média geral da contagem de estafilococos foram 6,8 ($\pm 0,5$) e 6,6 ($\pm 0,5 \log_{10}$ ufc/g).

O tipo de material utilizado como cama foi associado com o risco de incidência de MC ($P = 0,02$; Tabela 1). A cama composta por casca de amendoim apresentou maior risco de incidência de MC do que a cama composta por palha de arroz ($P = 0,025$) e tendência de maior risco do que a cama composta por serragem ($P = 0,056$). A comparação entre as médias da cama composta por palha de arroz e serragem não foi estatisticamente diferente ($P = 0,13$). A umidade apresentou tendência de associação com o risco de incidência de MC ($P = 0,06$). A CCST foi a única variável associada com o risco de incidência de MSC ($P = 0,0006$).

Tabela 1. Associação entre as variáveis explanatórias (características microbiológicas e físico-químicas da cama) e as variáveis resposta (risco de incidência de MC e MSC) originadas dos modelos multivariáveis.

Variável	Estimativa	DP ¹	P-valor
Risco de incidência de mastite clínica ²			
β^3	-12,89	10,21	
Tipo de cama			0,02
Casca de amendoim	8,98	3,33	
Palha de arroz	-12,30	5,75	
Serragem	Ref.		
Umidade	0,43	0,23	0,06
CCST ⁴	0,01	0,01	0,24
Risco de incidência de mastite subclínica ⁵			
β	30,01	2,74	
CCST	0,02	0,01	0,0006

¹ Desvio padrão

² O risco de incidência de MC foi estimado pela divisão do número de vacas com MC pelo número de vacas em risco no mês de avaliação multiplicado por 100.

³ Intercepto

⁴ Contagem de células somáticas do leite de tanque

⁵ O risco de incidência de MSC foi definido como o número de casos de MSC dividido pelo número de vacas em risco no mês de avaliação multiplicado por 100

Conclusões

E. coli e *Strep. dysgalactiae* foram as principais causas de MC, enquanto que *Staph. chromogenes* foi a principal causa de MSC nos rebanhos leiteiros avaliados. Adicionalmente, a umidade da cama e o tipo de material de cama foram associados com a incidência de MC, enquanto que a CCST foi associada ao risco de incidência de MSC.

Association between the physical-chemical and microbiological characteristics of Compost Barn bedding and the occurrence of mastitis in dairy cows

Gabriela Siqueira Di Leo*

Gustavo Freu

Marcos Veiga dos Santos

School of Veterinary Medicine and Animal Science at the University of São Paulo

*gabisiqueira@usp.br

Objectives

The present study aimed: (a) to evaluate the frequency of isolation of pathogens causing mastitis in dairy cows housed in Compost Bedded Pack Barn (CB); and (b) to evaluate the association between the risk of clinical (CM) and subclinical (SCM) mastitis and the microbiological and physicochemical characteristics of the bedding material in CB system.

Materials and Methods

Cows from eight dairy herds of São Paulo State housed in CB were included in this study and monitored for six months. Cows with somatic cell count (SCC) >200,000 cells/mL were selected for milk sample collection (pool of four mammary quarters) in an aseptic manner, which were submitted to microbiological identification by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). The same procedure was performed at the quarter mammary level for cows with MC. In addition, monthly, bedding samples from herds were collected to perform physical-chemical (e.g., moisture, pH, organic matter, carbon:nitrogen ratio) and microbiological (e.g., total bacterial, coliforms, streptococci and staphylococci count)

analysis. For this purpose, representative samples of the surface layer (± 10 cm) and the deep layer (± 20 cm) of the bedding material of the installation were collected. Temperature of both layers was measured using a digital thermometer. Linear mixed models were built to determine the association between the physicochemical and microbiological characteristics of CB and the risk of CM and SCM. Variable selection procedure was used to build and obtain the final models. Statistical significance was declared when $P < 0.05$ and trend when $P \geq 0.05$ and < 0.10 .

Results

A total of 933 (± 24.4) cows were included in this study, in which 55.16% of these cows were Holstein, 42.91% Girolando (crossbred *Bos taurus taurus* x *Bos taurus indicus*), 1.16% Gir and 0.77% mixed breed. The average number lactating cows of herds was 116 (range 45 to 208) with an average of milk daily production of 29 (± 3.7) L/cow. The most common bedding material among the herds was sawdust ($n = 6$), followed by peanut shell ($n = 1$) and rice straw ($n = 1$).

A total of 1853 milk samples from cows with SCM were analyzed, and of this, 39.8% ($n = 738$) of samples were negative culture (i.e. no microbial growth). The most frequently isolated pathogens were *Staphylococcus chromogenes*

($n = 478$; 25.8%), *Streptococcus agalactiae* ($n = 84$; 4.5%) and *Streptococcus uberis* ($n = 74$; 3.9%).

A total of 496 CM cases was registered during the study period. Of this total, approximately 50% ($n = 245$) of samples were negative culture. *Escherichia coli* ($n = 49$; 9.8%) had the highest frequency of isolation, followed by *Streptococcus dysgalactiae* ($n = 35$; 7.0%) and *Streptococcus uberis* ($n = 30$; 6.0%). The general risk of incidence of SCM was 38.4%, whereas for CM it was 9.7%.

Regarding the physicochemical characteristics, the general average of bedding moisture was 43.3% (± 8.7), pH was 8.3 (± 0.4), organic matter was 54.2% (± 11.6), and the mean carbon-nitrogen ratio was 17.2 (± 7.4). The general mean temperature on the bedding surface was 36.5°C (± 5) and on the deep layer it was 42.4°C (± 7).

Regarding the microbiological characteristics of the bedding material, the mean total bacterial counts in the superficial and deep layers were 8.0 (± 0.5) and 7.7 (± 0.5 log₁₀ cfu/g), respectively and of coliform counts were 5.8 (± 0.9) and 5.3 (± 1.0 log₁₀ cfu/g), respectively. On the other hand, the mean streptococci count in the surface and deep layer of bedding were 6.4 (± 0.5) and 6.0 (± 0.6), respectively, and the overall mean staphylococci count was 6.8 (± 0.5) and 6.6 (± 0.5 log₁₀ cfu/g).

The type of material used as bedding was associated with the risk of CM incidence ($P = 0.02$; Table 1). Peanut shell bedding had a higher risk of CM incidence than rice straw bedding ($P = 0.025$) and a trend of higher risk than sawdust bedding ($P = 0.056$). Comparison between the means of rice straw and sawdust beddings were not statistically different ($P = 0.13$). Bedding moisture tended to be associated with the risk of CM incidence ($P = 0.06$). On the other hand, bulk tank milk somatic cell counts (BTSSC) was the only variable associated to the risk of SCM incidence ($P = 0.0006$).

Table 1. Association between explanatory variables (bedding microbiological and physico-chemical characteristics) and study outcomes (incidence risk of CM and SCM) derived from multivariate models.

Variable	Estimate	SD ¹	P-value
Risk of incidence of clinical mastitis ²			
β^3	-12,89	10,21	
Type of bedding			0,02
Peanut shell	8,98	3,33	
Rice straw	-12,30	5,75	
Sawdust	Ref.		
Moisture	0,43	0,23	0,06
BTSSC ⁴	0,01	0,01	0,24
Risk of incidence of subclinical mastitis ⁵			
β	30,01	2,74	
BTSSC	0,02	0,01	0,0006

¹ Standard deviation

² Risk of CM incidence was estimated by dividing the number of cows with CM by the number of cows at risk in the month of assessment multiplied by 100

³ Intercept

⁴ Bulk tank milk somatic cell counts

⁵ Risk of SCM incidence was defined as the number of SCM cases divided by the number of cows at risk in the month of assessment multiplied by 100

Conclusions

E. coli and *Strep. dysgalactiae* were the main causes of CM, while *Staph. chromogenes* was the main cause of SCM in the evaluated dairy herds. Additionally, bedding moisture and bedding material type were associated with the incidence of CM, while BTSSC was associated with the risk of SCM incidence.