

# SCIENZA E TECNICA LATTIERO - CASEARIA

ITALIAN JOURNAL OF DAIRY SCIENCE AND TECHNOLOGY



**Il latte sorpassa  
la pandemia**

**IDF: nuovi standard  
sulla sicurezza**

**La filiera sfida  
la sostenibilità**

**Prodotti protagonisti  
sui mercati esteri**

Renata Piccinini<sup>1</sup>, Maria Cecilia Bianchi<sup>2\*</sup>, Alice Comparelli<sup>2</sup>, Serena Bonizzi<sup>2</sup>, Alessandra Gazzola<sup>1</sup>, Luciana Bava<sup>2</sup>, Maddalena Zucali<sup>2</sup>, Stefano Morandi<sup>3</sup>, Milena Brasca<sup>3</sup>

## Preliminary results of the use of bacteriocins in pre- and post-dipping products for dairy cows

*Risultati preliminari dell'uso di batteriocine in prodotti pre- e post-dipping per bovine da latte*

<sup>1</sup> Dipartimento di Medicina Veterinaria (DIMEVET) – Università degli Studi di Milano

<sup>2</sup> Dipartimento di Scienze Agrarie e Alimentari (DISAA) – Università degli Studi di Milano

<sup>3</sup> Consiglio Nazionale delle Ricerche, Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari, (CNR-ISPA), Milano

\*Corresponding author:

**Maria Cecilia Bianchi**

Dipartimento di Scienze Agrarie e Alimentari (DISAA), Università degli Studi di Milano

Via Celoria 2, 20133 Milano, Italia

E-mail: mariacecilia.bianchi@unimi.it

**Received:** Jun 17, 2021

**Accepted:** Sep 27, 2021

**DOI:** 10.36138/STLC.01.2022.02

### Abstract

The aim of this study was testing a bacteriocin product for udder disinfection during milking. The herd was divided in two groups: treatment (T) and control (C). Sterile milk was collected from every single quarter during 3 months. At each sampling, an operator evaluated animal hygiene and teat apex conditions. The results of cyto-bacteriological analyses showed similar bacterial frequencies as well as somatic cells counts in the two groups, despite of the poor

hygiene conditions of the herd. Therefore, given the results, the tested product resulted comparable to the conventional one to ensure udder health. Further studies are needed to confirm these results.

### Keywords:

- Dairy cows
- Antibiotic resistance
- Milking procedures
- Dipping
- Bacteriocins

### Riassunto

Il presente studio ha avuto lo scopo di testare l'utilizzo di due prodotti naturali per il pre- e post-dipping a base di batteriocine, nella prevenzione dell'insorgenza di infezioni mammarie. La prova è stata effettuata suddividendo le bovine di un'azienda lombarda in due gruppi di pari numero: trattamento (T) e controllo (C). Nel corso della prova è stato prelevato, mediante prelievo sterile, il latte per singolo quarto, si sono valutate le condizioni igieniche degli animali e le condizioni degli apici capezzolari. Dalle analisi citobatterologiche del latte non sono emerse peggiori condizioni delle bovine del gruppo T rispetto al gruppo C, né relativa-

mente alle frequenze di infezioni, né alla conta delle cellule somatiche, aspetto ancor più incoraggiante viste le scarse condizioni igieniche degli animali coinvolti nella prova. Pertanto, si può ipotizzare una reale possibilità di utilizzo dei due formulati sperimentali, poiché la mammella ha mantenuto condizioni analoghe agli animali trattati con il prodotto tradizionale. In ogni caso, si ritengono necessari ulteriori studi a riguardo.

### Parole chiave:

- Vacche da latte
- Antibiotico-resistenza
- Mungitura
- Disinfettanti
- Batteriocine

INTRODUZIONE

Le gravi ripercussioni sanitarie, economiche e ambientali dovute al fenomeno dell'antibiotico-resistenza, cioè la resistenza dei batteri patogeni ai trattamenti con antibiotici, sono ormai note da anni. Si è stimato che, senza un intervento mirato e tempestivo, entro il 2050, le infezioni batteriche potrebbero causare più decessi del cancro [1]. A causa del fenomeno dell'antibiotico-resistenza, inoltre, si è calcolato che si impiegheranno circa 11 miliardi di euro, solo in Italia, da qui al 2050 [2]. Il problema delle resistenze, però, non riguarda solo gli antibiotici: negli ultimi anni, si sono rilevati fenomeni di resistenza multipla riguardanti anche alcuni biocidi e disinfettanti, come il rame e lo zinco; oltre a ciò, l'esposizione a concentrazioni sub letali di alcuni biocidi sembrerebbe agevolare fenomeni di co-resistenza nei confronti di determinati antibiotici, come i fluorochinoloni, spesso impiegati nel settore zootecnico [3,4], uno dei settori maggiormente coinvolti nel fenomeno delle resistenze. Se si considera poi l'allevamento di bovine da latte, emerge un ulteriore problema relativo all'uso di antibiotici: si è rilevato, infatti, che i residui di antibiotici nel latte, anche a concentrazioni inferiori rispetto ai limiti di legge [5], possono inibire i batteri lattici responsabili della caseificazione, con conseguenti ripercussioni sul processo di trasformazione del latte e sulle caratteristiche sensoriali del formaggio [6]; la presenza di residui nel latte

può, inoltre, causare reazioni allergiche e incrementare il problema dell'antibiotico resistenza [7]. Per queste ragioni, nella produzione di formaggio, il latte delle vacche curate con antibiotici non può essere mescolato con il resto del latte destinato alla caseificazione, ma deve essere munto separatamente e destinato allo smaltimento. Per arginare questa problematica, a livello nazionale viene emanato annualmente, dal Ministero della Salute, il Piano Nazionale per la Ricerca dei Residui [8], il quale ha lo scopo di controllare l'utilizzo dei farmaci in allevamento e il rispetto dei limiti stabiliti delle quantità di residui negli alimenti. Considerato che la cura della mastite comporta il consumo di circa il 70% delle sostanze antibiotiche complessive somministrate negli allevamenti da latte [9], i ricercatori dell'Università degli Studi di Milano e del Consiglio Nazionale delle Ricerche hanno condotto uno studio per sperimentare l'utilizzo di un prodotto, pre- e post-dipping, alternativo agli antibiotici in prevenzione all'insorgenza di infezioni mammarie. Per la sperimentazione sono stati formulati in laboratorio due prodotti per la pulizia e sanificazione dei capezzoli (pre- e post-dipping) contenenti una coltura di cvo= *Lactococcus lactis* subsp. cvo= *cremoris* ITEM 18332, produttore di batteriocine. Questo ceppo, isolato da un formaggio caprino, è stato in precedenza selezionato in seguito a prove in vitro in quanto produttore di molecole proteiche con

**Tabella I. Valori medi, deviazione standard e valori minimi e massimi delle variabili produttive medie della mandria. Dati ottenuti dai controlli funzionali**

Table I Mean values, standard deviation, minimum and maximum values of herd mean productive variables. Functional controls data.

Variabile	Unità di misura	Media	Dev.st	Min	Max
Numero di lattazioni	n.	2,25	1,50	1,00	9,00
Giorni di lattazione	gg	172	104	11,0	466
Produzione di latte individuale	kg/giorno	31,4	8,44	10,0	60,0
Grasso	%	3,95	0,78	2,00	6
Proteine	%	3,43	0,40	2,60	4,80
Produzione di latte individuale corretta al 4% di grasso	kg/giorno	32,1	9,08	0,00	66,0
Conta Cellule Somatiche	cellule/ml x1000	204	555	4	8.300
Conta Cellule Somatiche	log10 cellule/mL	4,82	0,58	3,60	6,92

attività inibente nei confronti di microorganismi patogeni [10].  
Lo scopo del presente lavoro è stato quello di testare l'efficacia di tali prodotti nel prevenire l'insorgenza delle infezioni mammarie, in confronto con i prodotti usati tradizionalmente.

MATERIALI E METODI

L'attività antimicrobica della coltura batterica è stata preliminarmente testata *in vitro*, prima della sperimentazione, per valutare il suo effetto, sia sulle principali specie di batteri lattici, sia sulla popolazione patogena del latte [10].  
La base dei due prodotti era la stessa utilizzata dall'azienda nelle formulazioni commerciali e conteneva acido lattico al 5%, nel prodotto di pre-dipping, e sostanze emollienti e filmanti, nel prodotto di post-dipping. A queste due formulazioni è stato aggiunto il prodotto a base di batteriocine; il fattore di diluizione, calcolato in base all'attività antimicrobica nei confronti dei principali batteri mastodogeni della vacca da latte (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Str. uberis*, *Str. dysgalactiae*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*), era di 1:4.  
La sperimentazione ha avuto luogo in un'azienda di bovini da latte di razza Frisona, situata nella Pianura Padana. Al momento delle analisi, l'azienda contava circa 120 bovine in lattazione. Durante la prova,

in totale, sono state effettuate 5 rilevazioni, nel periodo compreso tra gennaio e maggio 2020.  
Il primo campionamento ha avuto lo scopo di valutare lo stato di salute complessivo della mandria per poi suddividere gli animali in due gruppi omogenei: trattato (T) e controllo (C), dove è stato impiegato un prodotto post-dipping a base di acido lattico (5%) e un'elevata concentrazione di iodio (2500 ppm). Il gruppo T contava circa 67 animali per rilevazione, il gruppo C circa 73.  
Nel corso della prova è stato prelevato il latte di ogni singolo quarto mediante prelievo sterile di ogni vacca dei due gruppi; inoltre, sugli stessi animali, sono state effettuate la valutazione dello stato di integrità dei capezzoli, con il modello di valutazione del Teat Apex Score [11], e la valutazione dello stato di imbrattamento di fianchi, arti posteriori e mammella, utilizzando lo schema dell'Hygiene Score [12]. Le condizioni dei capezzoli e lo stato di pulizia degli animali sono, infatti, fattori coinvolti nell'insorgenza di infezioni batteriche della mammella; purtroppo, queste valutazioni sono state eseguite fino al mese di marzo, per impossibilità di proseguire le rilevazioni anche nelle uscite successive.  
I campioni di latte sono stati sottoposti ad analisi batteriologica e alla Conta delle Cellule Somatiche (CCS), eseguita con lo strumento Bentley Somacount. Le colonie di crescita sono state identificate secondo le indicazioni del N.M.C. [13], il valore di CCS è stato tra-

**Tabella II. Hygiene Score (HS) e Teat Apex Score (TAS) medi. Numero campione HS fianchi: 418, HS zampe: 418, HS mammella: 416. Numero campione TAS anteriore destro: 393, anteriore sinistro: 394, posteriore destro: 393, posteriore sinistro: 393**

Table II. Means of Hygiene Score (HS) and Teat Apex Score (TAS). Number of hips HS observations: 418, legs HS: 418, udder HS: 416. Number of front right TAS observations: 393, front left TAS: 394, back right TAS: 393, back left TAS: 393

Variabile	Parametro	Media	Dev. St.	Osservazioni 3-4 (%)
Hygiene Score	Fianchi	1,88	0,97	25
	Zampe	2,35	0,69	33
	Mammella	1,97	0,74	21
Teat Apex Score	Quarto anteriore Destro	1,93	0,72	18
	Quarto anteriore Sinistro	1,98	0,77	22
	Quarto posteriore Destro	1,81	0,61	10
	Quarto posteriore Sinistro	1,81	0,60	8

sformato in  $\log_{10}$  cellule/mL. La validità dei prodotti sperimentali è stata determinata calcolando il numero di nuove infezioni, diagnosticate tramite le analisi microbiologiche dei campioni di latte e la CCS. I dati raccolti sono stati analizzati utilizzando i programmi Microsoft Excel e Statistical Analysis System (SAS). I risultati ottenuti sono stati sottoposti ad analisi della varianza; nel modello sono stati inclusi l'effetto gruppo (T e C) e l'interazione tra il gruppo ed il mese e sono state considerate come covariate i valori di cellule somatiche del mese di gennaio (ottenuto dai controlli funzionali effettuati mensilmente in azienda) e i giorni di lattazione. Nel modello l'effetto animale è stato incluso come *repeated*.

RISULTATI E DISCUSSIONE

In Tabella I sono riportati alcuni parametri che permettono di definire le caratteristiche dell'azienda dove si è svolta la sperimentazione. All'inizio della prova, per il gruppo C risultava una media pari a  $236 \pm 90$  giorni di lattazione, mentre nel gruppo T il dato medio era pari a  $96 \pm 47$  giorni. In Tabella II, si riportano, invece, i valori relativi alle valutazioni di igiene degli animali e dello stato di ipercheratosi dei capezzoli. Oltre ai valori medi, si riportano le percentuali dei punteggi che hanno rilevato situazioni critiche, quindi pari a 3 e 4, sul totale delle valutazioni.

Nella valutazione dei dati occorre sottolineare che, generalmente, nell'analisi dell'Hygiene Score sono considerate accettabili percentuali di osservazioni pari a 3 e 4 comprese tra il 6 e il 17% per i fianchi, tra il 24 e il 54% per le zampe e tra il 5 e il 10% per l'area mammella. Dai valori sopra riportati, si evince pertanto una condizione igienica aziendale non ottimale e con un certo margine di miglioramento per quanto riguarda la pulizia di fianchi e mammelle. Per quanto riguarda i capezzoli, invece, si considera come valore soglia il 20% di valutazioni negative nel Teat Apex Score [11]. In questo caso, le percentuali di 3 e 4 sono ancora accettabili, ad eccezione del punteggio relativo al capezzolo anteriore sinistro, il quale supera di poco il 20%. Si può ipotizzare che una maggior percentuale di valutazioni negative per i capezzoli anteriori, rispetto ai posteriori, sia dovuta al fatto che solitamente i quarti anteriori producono meno latte (40% anteriori, 60% posteriori) e che quindi, terminando prima la secrezione di latte, vengano sovra-munti con più frequenza. I gruppi di mungitura dell'azienda, sono provvisti di stacco automatico che va a ridurre la possibilità di generare ipercheratosi all'apice capezzolare [14], ma il livello di flusso a cui è tarato lo stacco automatico si riferisce al flusso mammario e non al flusso del singolo quarto. In Figura 1, si riportano gli andamenti delle frequenze di *Staph. aureus* (grafico 1), altre specie di Stafilococchi (grafico 2) e altri patogeni (gra-

Tabella III. Analisi della varianza della Conta delle Cellule Somatiche e del Teat Apex Score totale in relazione al gruppo di appartenenza

Table III. Somatic Cells Count and total Teat Apex Score Analysis of Variance in relation with groups

Variabile	Unità di misura	Quarto	Gruppo controllo	Gruppo trattato	p value
Conta Cellule Somatiche	Log10	Anteriore Sinistro	3,96	3,53	<0,001
		Anteriore Destro	3,87	3,69	0,06
		Posteriore Sinistro	3,89	3,70	0,03
		Posteriore Destro	4,09	3,66	<0,001
Teat Apex Score	N	Anteriore Sinistro	2,09	1,84	0,04
		Anteriore Destro	2,05	1,79	0,02
		Posteriore Sinistro	1,89	1,74	0,12
		Posteriore Destro	1,86	1,76	0,33

fico 3), riscontrate nel latte degli animali dei due gruppi ottenuti nei 3 mesi di prova. Le frequenze dei patogeni nel gruppo T e nel gruppo di C sono piuttosto simili. In particolare, l'andamento delle frequenze riportate nei grafici 1 e 3 sembra indicare un'efficacia del prodotto sperimentale utilizzato nel gruppo di controllo, analoga a quella del prodotto commerciale. Soprattutto nei mesi finali della sperimentazione, infatti, la frequenza batterica di *Staph. aureus* e di patogeni ambientali negli animali del gruppo C è pressoché sovrapponibile a quella degli animali del gruppo T. Per quanto riguarda il grafico 2, si evidenzia un lieve innalzamento delle infezioni nel gruppo T.

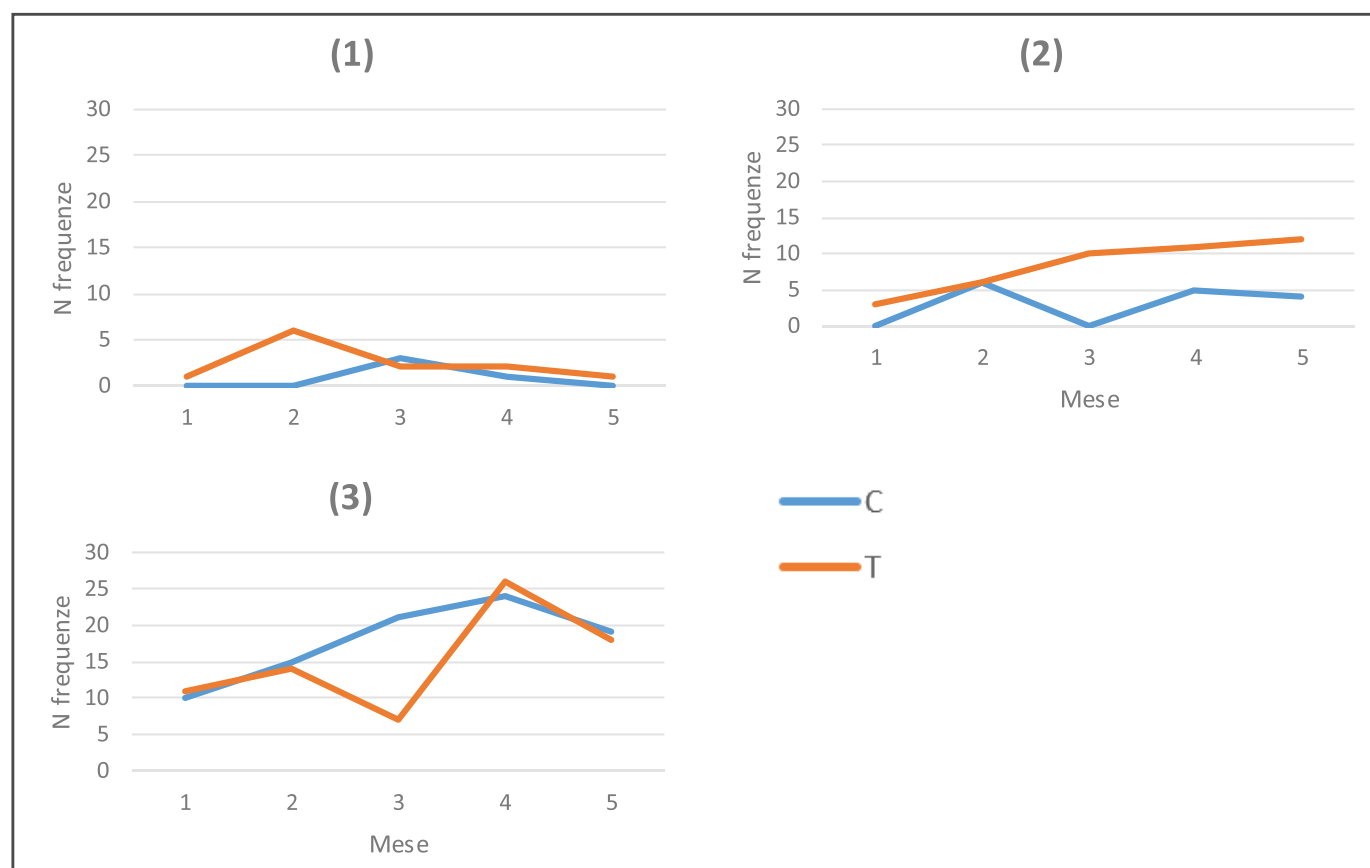
Nella Tabella III si può notare che i valori di CCS di tutti e quattro i quarti sono stati influenzati dai trattamenti ai quali sono stati sottoposti gli animali in prova. In modo particolare, tali valori sono risultati più alti nel gruppo controllo rispetto al trattato. Dunque, il trattamento potrebbe aver favorito una diminuzione delle CCS. I risultati ottenuti potrebbero essere stati influenzati anche da altri fattori quali, ad esempio, i giorni di lattazione, inseriti quindi nel modello di analisi della varianza.

Analogamente, si possono osservare, per il parametro Teat Apex

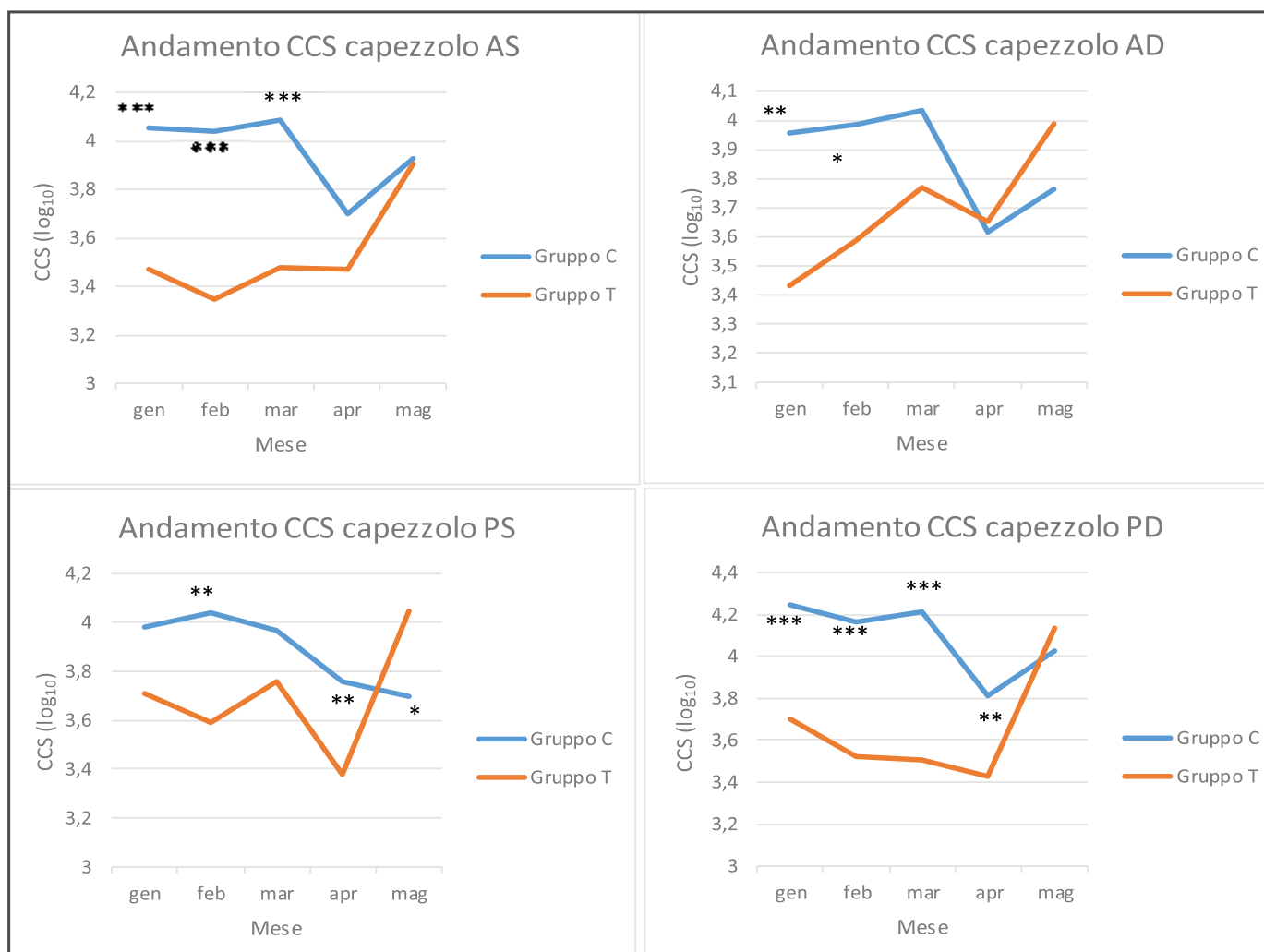
Score, valori inferiori, e, dunque, migliori, nel gruppo trattato. La relazione tra tale parametro e il tipo di trattamento effettuato è risultata però significativa solo per quanto riguarda i quarti anteriori. Si tenga inoltre in considerazione che il Teat Apex Score è stato misurato solo nelle prime tre rilevazioni, e sarebbero quindi necessarie ulteriori rilevazioni per avere un dato più attendibile.

Come atteso, il parametro Hygiene Score non ha influito sul trattamento in quanto gli animali osservati appartenevano alla stessa mandria e quindi vivevano nello stesso ambiente.

La Figura 2 mette in evidenza l'andamento delle cellule somatiche dei gruppi C e T, misurate per singolo quarto, suddividendo i dati per mese di rilevazione. Dalla figura emerge come nelle prime tre rilevazioni, per i capezzoli anteriore sinistro e posteriore destro, il valore di CCS sia significativamente inferiore per il gruppo T rispetto al gruppo C, facendo quindi ben sperare sulla reale efficacia del prodotto; successivamente, complice forse anche un cambiamento climatico, anche per il gruppo T sono stati riscontrati valori di CCS più elevati, annullando le differenze riscontrate precedentemente.



**Figura 1.** Andamento delle frequenze di patogeni mastidogeni distinte per gruppo di Trattamento (T) e di Controllo (C) nei mesi  
 Figure 1. Trend of the frequencies of mastidogenic pathogens subdivided by Treatment (T) and Control (C) group over the months



**Figura 2.** Andamento della Conta delle Cellule Somatiche, suddivisa per singolo quarto, nel corso della prova

*Figure 2. Somatic Cells Count trend, subdivided by each quarter during the trial*

\*: p. value <0,05 \*\*; p. value <0,01 \*\*\*: p value <0,001

## CONCLUSIONS

La sperimentazione, seppure relativa a una sola realtà aziendale, ha evidenziato che l'impiego dei due prodotti contenenti composti proteici ad attività antimicrobica è in grado di assicurare una protezione contro gli agenti mastidogeni paragonabile a quella di un prodotto di comprovata efficacia a base di iodio. Considerando, infatti, le caratteristiche aziendali e le condizioni igieniche della stalla evinte dalle valutazioni dello stato di imbrattamento degli animali, si ritiene positivo il fatto di non aver ottenuto peggioramenti nel gruppo T durante i mesi della prova, né relativamente alle frequenze di batteri patogeni nei campioni di latte dei singoli quarti analizzati, né nella conta delle cellule somatiche.

È possibile osservare, infatti, come la frequenza di patogeni nel latte abbia mostrato nel corso dei mesi, un andamento molto simile nei due gruppi, T e C. Le cellule somatiche del latte dei quattro quarti sono risultate significativamente inferiori per il gruppo T rispetto al gruppo C nei mesi di gennaio, febbraio e marzo, mentre nei mesi successivi non si sono riscontrate differenze significative tra i due gruppi, ad eccezione dei capezzoli posteriori. I risultati ottenuti, che andranno necessariamente approfonditi con ulteriori studi, lasciano ipotizzare una reale possibilità di utilizzo dei due formulati sperimentali, poiché, pur contenendo sostanze biocide naturali, hanno garantito la sanità della mammella nel corso dei mesi di trattamento.



**CONFLITTO DI INTERESSI**

Non esistono conflitti di interesse di ordine economico o di altro tipo sull'articolo presentato.

**RINGRAZIAMENTI**

Si ringrazia il Dott. Daniele Beretta, dell'azienda Allegrini S.p.A., per il supporto tecnico alla formulazione dei prodotti sperimentali.

**FINANZIAMENTI ALLO STUDIO**

Il lavoro è stato finanziato dal progetto "Strategie sostenibili per ridurre l'impiego di antibiotici nell'allevamento delle bovine da latte (RABOLA)" finanziato dalla Regione Lombardia (Bando 2018 d.d.s. n. 4403 del 28/03/2018)

**BIBLIOGRAFIA**

1. Comunicazione della commissione al consiglio e al parlamento europeo, Piano d'azione europeo "One Health" contro la resistenza antimicrobica, Bruxelles, 29.6.2017 COM (2017) 339 final
2. Stemming the Superbug Tide: Just A few Dollars More, OECD (2018)
3. Randall L.P., Cooles S.W., Coldham N.G., Penuela E.G., Mott A.C., Woodward M.J., Piddock L.J.V., Webber M.A. (2007), Commonly used farm disinfectants can select for mutant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium with decreased susceptibility to biocides and antibiotics without compromising virulence. *J. antimicrobial Chemotherapy*, 60:1273-1280
4. Davies R., Wales A. (2019), Antimicrobial resistance on farms: a review including biosecurity and the potential role of disinfectants in resistance selection. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, Vol. 18
5. REGOLAMENTO (UE) n. 37/2010 del Parlamento europeo e del Consiglio. Gazzetta ufficiale dell'Unione europea, L 15/1
6. Gamba V., Bolzoni G., Monastero P., Losio M.N., Daminelli P. (2020), Residui di antibiotici sulle colture lattiche del siero innesto e nel formaggio, Grana Padano Insieme, 1 gennaio 2020, 58-68
7. Le Breton M.H., Savoy-Perroud M.C., Diserens J.M., Validation and comparison of the Copan Milk Test and Delvotest SP-NT for the detection of antimicrobials in milk. *ScienceDirect, Analytica Chimica Acta* 586 (2007) 280-283
8. Piano nazionale per la ricerca dei residui, 2020. Ministero della Salute, Direzione generale per l'igiene e la sicurezza degli alimenti e la nutrizione.
9. Kuipers A., Koops W.J., Wemmenhove H. (2016), Antibiotic use in dairy herds in the Netherlands from 2005 to 2012. *Journal of Dairy Science*, Vol. 99 (2): 1632-1648
10. Morandi S., Silvetti T., Vezzini V., Morozzo E., Brasca M. (2020), How we can improve the antimicrobial performances of lactic acid bacteria? A new strategy to control *Listeria monocytogenes* in Gorgonzola cheese. *Food Microbiology*, 90, 103488
11. Mein G.A., Neijenhuis F., Morgan W.F., Reinemann D.J., Hillerton J.E., Baines J.R., Ohnstand I., Rasmussen M.D., Timms L., Britt J.S., Farnsworth R., Cook N., Hemling T. (2001), Evaluation of bovine teat condition in commercial dairy herds: 1. Non-infectious factors. *Proceedings of the 2nd International Symposium on Mastitis and Milk Quality*, p 347-351
12. Schreiner D.A., Ruegg P.L. (2003), Relationship between udder and leg hygiene scores and subclinical mastitis. *Journal of Dairy Science*, Vol. 86: 3460-3465
13. Hogan, J.S., Gonzales, R.N., Harmon, R.J., Nickerson, S.C., Oliver, S.P., Pankey, J.W., Smith, K.L., 1999. *Laboratory Handbook on Bovine Mastitis*, revised ed. National Mastitis Council Inc, Madison
14. Wieland M., Nydam D.V., Heuwieser W., Morrill K.M., Ferlito L., Watters R.D., Wirkler P.D. (2020), A randomized trial to study the effect of automatic cluster remover settings on milking performance, teat condition, and udder health. *Journal of Dairy Science*, Vol. 103: 3668-3682