



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI MILANO



[www.regione.lombardia.it](http://www.regione.lombardia.it)



## Igiene e sicurezza del latte bovino alla stalla: sistema integrato di diagnosi



Quaderni della Ricerca  
n. 119 - ottobre 2010

LOMBARDIA. COSTRUIAMOLA INSIEME.



Regione Lombardia  
Agricoltura

**Sperimentazione condotta nell'ambito del Piano per la Ricerca e lo Sviluppo 2007-2009 della Regione Lombardia. Progetto n. 1242 "Igiene e sicurezza del latte bovino alla stalla: sistema integrato di diagnosi (LATTESAN)".**

**Responsabile scientifico:** Prof.ssa Anna Sandrucci

Università degli Studi di Milano  
Dipartimento di Scienze Animali, Sezione di Zootecnica Agraria  
Via Celoria, 2 - 20133 Milano  
Telefono: +39 02 50316453 - e-mail: [anna.sandrucci@unimi.it](mailto:anna.sandrucci@unimi.it)

**Hanno partecipato al progetto:** A. Sandrucci<sup>1</sup>, L. Bava<sup>1</sup>, M. Brasca<sup>2</sup>, M. Laurenti<sup>5</sup>, R. Lodi<sup>2</sup>, R. Piccinini<sup>3</sup>, P. Roveda<sup>1</sup>, M. Sanna<sup>6</sup>, A. Tamburini<sup>1</sup>, L. Vanoni<sup>2</sup>, L. Zanini<sup>4</sup>, A. Zecconi<sup>3</sup>, M. Zucali<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Università degli Studi di Milano  
Dipartimento di Scienze Animali, Sezione di Zootecnica Agraria

<sup>2</sup> Consiglio Nazionale delle Ricerche,  
Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari  
Via Celoria, 2 - 20133 Milano

<sup>3</sup> Università degli Studi di Milano  
Dipartimento Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria  
Via Celoria, 10 - 20133 Milano

<sup>4</sup> Associazione Regionale Allevatori della Lombardia  
Via Kennedy, 30 - 26013 Crema

<sup>5</sup> Associazione Provinciale Allevatori di Milano  
Viale Isonzo, 27 - 20135 Milano

<sup>6</sup> Santangiolina Latte Fattorie Lombarde Società Agricola Cooperativa  
Via del Marzano, 2 - 20078 San Colombano al Lambro (MI)

Per informazioni:

**Regione Lombardia - Direzione Generale Agricoltura**  
U.O. Innovazione, cooperazione e valorizzazione delle produzioni  
Struttura Ricerca, innovazione tecnologica e servizi alle imprese  
Via Pola, 12/14 - 20124 Milano  
Tel: +39 02 67653790 - Fax +39 02 67658056

**Referenti:**

Gianpaolo Bertoncini - e-mail: [Gianpaolo\\_Bertoncini@regione.lombardia.it](mailto:Gianpaolo_Bertoncini@regione.lombardia.it)  
Giovanna Praderio - e-mail: [agri\\_ricerca@regione.lombardia.it](mailto:agri_ricerca@regione.lombardia.it)



Regione Lombardia  
Agricoltura



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI MILANO



ISTITUTO DI SCIENZE  
DELLE PRODUZIONI  
ALIMENTARI



Associazione Regionale  
Allevatori della Lombardia



# Igiene e sicurezza del latte bovino alla stalla: sistema integrato di diagnosi

Quaderni della ricerca

n. 119 – ottobre 2010



## 1. Sommario

2. Presentazione .....	5
3. Riassunto.....	7
4. Abstract.....	8
5. Introduzione.....	9
5.1. Fattori che influiscono sulla contaminazione batterica del latte alla stalla .....	10
5.2. I patogeni emergenti.....	14
6. Scopi.....	17
7. Approccio metodologico.....	17
8. Risultati e discussione .....	21
8.1. Caratteristiche del campione di aziende.....	21
8.2. Dati microbiologici .....	21
8.3. Relazioni tra dati microbiologici.....	25
8.4. Effetto stagionale .....	26
8.5. Dimensione aziendale .....	29
8.6. Pulizia degli animali e pulizia della stalla .....	31
8.7. Igiene in mungitura .....	35
8.8. Lavaggio dell'impianto di mungitura .....	40
8.9. Refrigerazione del latte.....	47
8.10. Bioluminescenza .....	52
8.11. Patogeni zoonosici .....	54
8.12. Caratteristiche delle stalle con diversa carica batterica del latte .....	58
8.13. Analisi delle corrispondenze multiple .....	60
8.14. Sistema diagnostico integrato.....	62
9. Conclusioni.....	67
10. Ringraziamenti .....	69
11. Bibliografia .....	70
12. Appendice .....	73



## 2. Presentazione



Il crescente interesse dei consumatori per la sicurezza alimentare pone i produttori di fronte alla necessità di coniugare una gestione aziendale efficiente, economicamente sostenibile e moderna, con una speciale attenzione per l'igiene e la sanità degli alimenti in tutte le fasi della filiera di produzione.

Per quanto riguarda la filiera del latte, una delle fasi più importanti e delicate per garantire un elevato standard qualitativo e igienico-sanitario dei prodotti è la gestione della stalla; molti sono infatti i punti chiave ad essa collegati. Tra essi la modalità di mungitura, il lavaggio dell'impianto e la refrigerazione del latte.

La ricerca condotta nell'ambito del progetto 'Igiene e sicurezza del latte bovino alla stalla: sistema integrato di diagnosi' si focalizza sui principali fattori che possono influenzare l'igiene e la sicurezza del latte nelle aziende ad alta produzione, molto diffuse nel territorio lombardo.

Va sottolineato come questa ricerca sia il frutto della collaborazione tra diverse competenze: il mondo della ricerca (Università e CNR), una cooperativa di produttori e l'Associazione Regionale Allevatori della Lombardia, tramite il Servizio di Assistenza Tecnica agli Allevatori (SATA); tale sinergia ha permesso un approccio più completo alla problematica e vicino ai reali bisogni degli allevatori.

Il Quaderno fornisce linee guida e indicazioni per la gestione aziendale, utili per tutti gli operatori del settore.

Giulio De Capitani  
Assessore all'Agricoltura  
Regione Lombardia





### 3. Riassunto

Il livello di contaminazione batterica del latte alla stalla ha mostrato negli ultimi anni valori medi sempre più contenuti e rassicuranti nel nostro Paese, e in Lombardia in particolare; restano però da indagare alcune criticità che si evidenziano soprattutto durante il periodo caldo. Il progetto ha avuto lo scopo di studiare le fonti di contaminazione batterica del latte durante la prima fase del processo produttivo, quella che si svolge in stalla, analizzandone tutti i passaggi, dall'animale fino al tank di mungitura, per l'identificazione dei principali punti critici. Il lavoro ha coinvolto 22 aziende lombarde di bovine da latte che sono state visitate 3 volte in stagioni differenti. In occasione di ciascuna visita si sono effettuati campioni di latte di massa e acqua di risciacquo del lavaggio dell'impianto di mungitura per le analisi microbiologiche, oltre a tamponi su guaine e vaso terminale dell'impianto e sui capezzoli delle bovine. Inoltre sono stati raccolti campioni di latte e feci delle bovine e il filtro di mungitura per la ricerca di patogeni zoonosici. Nel corso delle visite si sono raccolte informazioni sulle strutture e la gestione della stalla e della mungitura e si è monitorato il lavaggio dell'impianto di mungitura e la temperatura del tank di stoccaggio del latte. La qualità microbiologica del latte analizzato è risultata mediamente buona e la presenza di patogeni è stata solo occasionale. Nonostante i valori medi di carica batterica assolutamente tranquillizzanti alcune aziende hanno evidenziato difficoltà di controllo della contaminazione batterica del latte in corrispondenza dei mesi estivi. Tra i principali punti critici emersi dallo studio si è evidenziata la tendenza diffusa ad impiegare acqua a temperatura troppo bassa per il lavaggio dell'impianto di mungitura con compromissione dell'efficacia detergente e sanificante. Altri fattori che si sono rivelati importanti nei confronti della contaminazione batterica del latte sono stati le operazioni alla mungitura (pre-dipping, eliminazione dei primi getti e post-dipping) e il livello di pulizia delle mammelle delle bovine. A partire dai risultati dello studio è stato sviluppato un sistema per la diagnosi e la soluzione dei problemi di controllo della carica batterica del latte alla stalla.

## 4. Abstract

Milk bacterial quality at farm gate has gradually improved in the last decades in Italy and in Lombardy; nevertheless there are still high peaks of bacterial counts during the hot season. This research project had the aim to study milk contamination sources at the farm by monitoring every phase from the cow to the milk tank in order to identify the main critical points. A total of 22 dairy farms in Lombardy were visited three times in different seasons. During each visit, samples of bulk tank milk and post-rinse water from cleaning cycle of milking equipment were taken for bacterial analyses; swabs were taken on liner mouths, milking receivers and teat ends of cows before milking. Moreover bulk milk and environmental samples were analyzed for foodborne pathogens. During the first visit a questionnaire was filled out to collect information on housing, barn design, milking parlour, milking equipment, milking routine, washing and cooling system. Milk tank temperature and cleaning procedure of milking machine were monitored.

Bacterial quality of sampled milk was on average good and foodborne pathogens were extremely rare. Nevertheless some farms showed scarce control of bacterial contamination of milk during summer. One of the most important critical points was the low temperature of water in cleaning cycle of milking equipment, that compromises sanitification of milking machine. Other important factors influencing milk bacterial count were milking operations as pre-dipping, forestripping and post-dipping and the hygienic conditions of the udders. A diagnostic system to identify and solve problems of milk bacterial contamination at the farm was developed.

## 5. Introduzione

La qualità microbiologica costituisce un requisito di base del latte, sia di quello destinato a latte alimentare che di quello avviato alla trasformazione. La carica batterica del latte è soggetta a precisi limiti di legge per il latte commercializzato, oltre ad essere uno dei parametri su cui si basa il pagamento differenziato del latte in funzione della qualità. In Europa il limite legale per il contenuto in germi del latte è di 100.000 UFC/mL (REG. CE n. 853/2004). Più recentemente la Regione Lombardia ha fissato un limite di 25.000 UFC/mL per il latte crudo destinato alla vendita diretta al consumatore (Circolare 19/SAN 07).

L'eccessiva contaminazione batterica costituisce un fattore indesiderato nel caso di latte destinato al consumo per la riduzione della conservabilità, per il possibile sviluppo di sapori sgradevoli e per la necessità di ricorrere a trattamenti termici intensi. La carica batterica del latte può costituire inoltre un segnale indiretto di eventuali contaminazioni da microrganismi patogeni. Nel caso del latte crudo destinato alla vendita diretta, il grado e il tipo di contaminazione batterica diventano parametri di grandissima importanza. Anche nel processo di caseificazione la contaminazione batterica può costituire un problema sia per la competizione operata nei confronti dei microrganismi filocaseari che per eventuali alterazioni, anche gravi, delle caratteristiche dei prodotti indotte dallo sviluppo di batteri anomali o dalla presenza di loro enzimi.

Dai dati pubblicati sul sito dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna (IZSLER, 2010) emerge come la qualità del latte lombardo, nel corso dell'ultimo trentennio, abbia fatto registrare importanti miglioramenti sotto il profilo igienico-sanitario. In particolare la carica batterica totale negli ultimi 10 anni si è abbassata sensibilmente, con un progresso inizialmente più rapido e successivamente più lento; l'ulteriore miglioramento infatti appare sempre più piccolo e difficile da conseguire man mano che il valore medio si riduce. Sempre dai dati messi a disposizione dall'Istituto Zooprofilattico (IZSLER, 2010) emerge tuttavia che, a fronte di valori medi annuali assolutamente rassicuranti, l'andamento mensile della carica batterica nel corso degli ultimi quattro anni ha continuato a mostrare incrementi sensibili in corrispondenza del periodo caldo. Inoltre è esperienza comune come molti allevamenti sperimentino periodicamente innalzamenti improvvisi e anormali della carica batterica del latte le cui cause non sono sempre facilmente individuabili.

La carica batterica del latte dipende in massima parte dalle condizioni igieniche in cui si svolgono i diversi processi che costituiscono la filiera del latte. Per quanto riguarda specificatamente la fase

produttiva che si svolge presso la stalla, la contaminazione batterica è influenzata da una molteplicità di fattori tra cui le condizioni igieniche in allevamento, il grado di pulizia degli animali e delle mammelle in particolare, la sanità degli animali, la preparazione della mammella in pre-mungitura, le modalità di mungitura, le modalità di lavaggio dell'impianto di mungitura e le condizioni di conservazione del latte fino al momento del ritiro (Kelly *et al.*, 2009). Inoltre le condizioni ambientali di temperatura e umidità possono influire notevolmente sulla contaminazione batterica del latte sia in termini quantitativi che in termini qualitativi.

### **5.1. Fattori che influiscono sulla contaminazione batterica del latte alla stalla**

Il latte, al momento della sua sintesi all'interno delle cellule secernenti mammarie e della sua secrezione negli alveoli, è da considerarsi virtualmente sterile in una bovina sana (Tolle, 1980). Secondo Bramley e McKinnon (1990), le tre principali fonti di contaminazione microbica del latte sono rappresentate dalla mammella stessa, successivamente alla sintesi, in particolare quando siano in atto infezioni mastitiche, dalla cute dei capezzoli e dalle superfici dell'impianto di mungitura e del tank di stoccaggio.

In una bovina sana la contaminazione derivante dalla mammella è molto contenuta; al momento dell'estrazione dalla mammella, il numero di microrganismi presenti nel latte risulterebbe infatti molto basso e la carica batterica difficilmente supererebbe il valore di 1000 UFC/mL (Kurweil e Busse, 1973). Una bovina affetta da mastite clinica o subclinica può invece rilasciare un gran numero di microrganismi nel latte. Tuttavia, in considerazione del fatto che il latte di bovine affette da mastiti cliniche (ossia caratterizzate da sintomatologia evidente o da alterazioni del latte stesso) viene di norma scartato, come previsto dalle leggi vigenti, la conta batterica del latte di massa di un'azienda tende a non essere influenzata sensibilmente dalla presenza di mastiti. Da un'esperienza danese (Holm *et al.*, 2004), condotta su campioni di latte di massa provenienti da 75 aziende caratterizzate da alte conte batteriche nel latte, è emerso che, nella maggior parte dei casi (64%), l'elevata carica batterica del latte era dovuta a batteri caratteristici delle situazioni di scarsa igiene (della stalla, dell'impianto di mungitura, ecc.), nel 28% dei casi l'elevata carica batterica è risultata ascrivibile alla proliferazione di batteri psicrotrofi, caratteristici delle situazioni di inadeguata conservazione del latte in stalla, e solo nell'8% dei casi vi era la prevalenza di batteri tipici della mastite.

La mammella e i capezzoli delle bovine risultano inevitabilmente sporchi di deiezioni e di materiale di lettiera. La carica batterica della lettiera è compresa tra  $10^8$  e  $10^{10}$  UFC/g e il latte di bovine con

mammelle sporche e non sottoposte a pulizia dei capezzoli prima della mungitura può contenere più di  $10^5$  UFC/mL (Bramley e McKinnon, 1990). Elmoslemany *et al.* (2009) hanno osservato una relazione stretta tra igiene della mammella e conta batterica del latte. I batteri prevalenti sulla superficie dei capezzoli e della mammella includono: *Micrococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Bacillus* spp., coryneformi, coliformi e altri batteri gram-negativi (Bramley e McKinnon, 1990). Inoltre sono comunemente presenti batteri termodurici e psicrotrofi. In particolare la presenza di coliformi nel latte è considerata indice di contaminazione ambientale e fecale e quindi di scarsa igiene in stalla e in mungitura (Reinemann *et al.*, 1997). L'influenza dei batteri presenti sulla superficie dei capezzoli sulla conta batterica del latte di massa dipende dal grado di imbrattamento delle mammelle, dalla percentuale di bovine con mammelle sporche e dalle procedure di pulizia dei capezzoli prima della mungitura. L'imbrattamento della mammella e dei capezzoli è influenzato da molti fattori connessi con la gestione della stalla: il tipo di stabulazione (fissa, libera con cuccette, libera con lettiera permanente), la frequenza di rinnovo della lettiera, il tipo di lettiera (paglia, segatura, sabbia, materassini in gomma, ecc.), la frequenza di pulizia delle aree di esercizio e di alimentazione. Anche il dimensionamento delle cuccette e il loro numero rispetto agli animali accolti possono influenzare la frequenza di decubito lungo le corsie con effetti importanti sulla pulizia delle bovine e delle mammelle. Alcuni di questi fattori hanno mostrato di avere effettivamente un'influenza significativa sulla carica batterica del latte di massa (Kelly *et al.*, 2009; Sandrucci *et al.*, 1990). Per quanto riguarda il materiale di lettiera, i materiali organici (paglia, segatura, ecc.) tendono ad avere cariche batteriche più elevate, soprattutto in termini di batteri gram-negativi, coliformi, *Klebsiella* spp. e streptococchi, rispetto ai materiali inorganici (Hogan *et al.*, 1989). Zdanowicz *et al.* (2004) hanno messo in evidenza le strette correlazioni esistenti tra le cariche di coliformi e *Klebsiella* spp. della lettiera e quelle riscontrabili sull'estremità dei capezzoli delle bovine.

Molti lavori scientifici hanno studiato le tecniche di pulizia della mammella e dei capezzoli prima della mungitura in relazione alla carica batterica del latte (Galton *et al.*, 1982; Galton *et al.*, 1986; Gibson *et al.*, 2008; McKinnon *et al.*, 1990; Pankey, 1989). La pulizia dei capezzoli con una soluzione disinfettante (pre-dipping), seguita da accurata asciugatura, sembra rappresentare una delle migliori soluzioni per ridurre la contaminazione del latte derivante dai batteri presenti sui capezzoli (Galton *et al.*, 1986). Tale operazione consentirebbe di ridurre la carica batterica presente sulla superficie dei capezzoli del 75% (Bade *et al.*, 2008). I prodotti impiegati per il pre-dipping possono contenere principi attivi con attività battericida differente. In Italia tali prodotti non contengono iodio ma generalmente emollienti e tensioattivi con eventuale aggiunta di clorexidina,

acido lattico o alcoli; la loro azione tende ad essere più detergente che disinfettante. D'altra parte Galton *et al.* (1982) hanno dimostrato come la pulizia dei capezzoli anche solo con acqua o semplici prodotti detergenti, purché sempre seguita da asciugatura, sia sufficiente a dimezzare la carica batterica del latte rispetto alla situazione in cui non venga effettuata alcuna operazione. Analogamente Gibson *et al.* (2008) hanno recentemente messo in evidenza come la pulizia e asciugatura dei capezzoli prima della mungitura comporti sempre una riduzione della contaminazione sul capezzolo indipendentemente dal prodotto impiegato.

Anche l'eliminazione dei primi getti di latte prima dell'attacco del gruppo di mungitura, oltre ad essere un'operazione necessaria per l'individuazione precoce di eventuali anomalie del latte, consente di ridurre la contaminazione batterica del latte nel tank in quanto allontana la porzione di latte più contaminata perché più vicina all'orifizio capezzolare. In uno studio di Hassan *et al.* (2001), l'eliminazione dei primi getti si è dimostrata efficace nel ridurre significativamente il rischio di contaminazione del latte con *Listeria monocytogenes*.

L'igiene dell'impianto di mungitura contribuisce probabilmente in maniera importante alla contaminazione batterica del latte di massa. Se il lavaggio dell'impianto non è effettuato correttamente, i depositi di latte e i residui di acqua di risciacquo che rimangono nelle tubazioni possono rappresentare ottimi terreni di crescita per molti batteri, tra cui in particolare i batteri termodurici, in grado di resistere all'azione dell'acqua calda impiegata per il lavaggio (Bramley e McKinnon, 1990; Holm *et al.*, 2004). Per contro, se il lavaggio è effettuato a basse temperature, si può avere moltiplicazione di batteri a rapida crescita quali *Lactococcus* spp., *Pseudomonas* spp. e coliformi (Murphy e Boor, 2000). I punti critici del processo di lavaggio sono molti, tra cui temperatura, quantità, qualità e turbolenza dell'acqua di lavaggio, concentrazione e tipologia di detergente e durata delle fasi. L'efficienza del lavaggio è il risultato della combinazione di processi termici (temperatura dell'acqua), fisici (turbolenza e pressione dell'acqua) e chimici (tipo e concentrazione dei prodotti detergenti) in un determinato intervallo di tempo (Reinemann *et al.*, 2000). Inoltre è influenzata dalle caratteristiche dell'impianto; infatti le diverse parti dell'impianto di mungitura sono costruite in materiali differenti (gomma, metallo, vetro o plastica) e hanno una diversa conformazione, caratteristiche che influenzano la facilità di pulizia e di rimozione di residui di latte o di sali. In particolare le parti in gomma (guaine e tubi), se fessurate o screpolate, possono essere zone di difficile pulizia, favorevoli alla crescita microbica (Murphy e Boor, 2000). Secondo un'esperienza inglese (McKinnon *et al.*, 1990), il passaggio del latte attraverso l'impianto di

mungitura determinerebbe un aumento della carica batterica del latte valutato in 2000-3000 UFC/mL, e il passaggio nel tank causerebbe un ulteriore aumento di 1500-2000 UFC/mL.

Una volta entrato nel tank di refrigerazione il latte viene portato ad una temperatura uguale o inferiore a 6-8°C. La refrigerazione del latte alla stalla è un obbligo di legge; secondo il Regolamento CE n. 853/2004 infatti il latte “deve essere posto, immediatamente dopo la mungitura, in un luogo pulito, progettato e attrezzato in modo da evitare la contaminazione. Deve essere immediatamente raffreddato a una temperatura non superiore a 8°C in caso di raccolta giornaliera e non superiore a 6°C qualora la raccolta non sia effettuata giornalmente”. La refrigerazione favorisce la conservabilità del latte in quanto riduce la proliferazione microbica, e conseguentemente rallenta la caduta del pH (legata alla fermentazione del lattosio) e la comparsa di sapori anomali legati al deterioramento delle componenti grasse e proteiche. La conservazione nel tank porta tuttavia inevitabilmente ad una modificazione della microflora presente nel latte: i microrganismi che riescono a moltiplicarsi anche a basse temperature, gli psicrotrofi, tendono a prendere il sopravvento. Il latte prodotto in buone condizioni igieniche possiede una carica di batteri psicrotrofi inferiore al 10% della conta batterica totale ma dopo 2 giorni a 4°C la popolazione psicrotrofa diviene dominante (Gehring, 1980). Tra gli psicrotrofi che possono svilupparsi nel latte durante la conservazione in azienda viene segnalato in particolare *Pseudomonas fluorescens*, un batterio a rapida crescita caratterizzato dalla capacità di formare biofilm resistenti all’azione di agenti chimici e sanitizzanti (Jayarao e Wang, 1999). Gli psicrotrofi sono facilmente distrutti dai trattamenti termici ma producono enzimi extracellulari resistenti anche alle temperature di sterilizzazione aventi azione lipolitica e proteolitica che possono alterare fortemente l’aroma e le caratteristiche dei prodotti (sapore amaro, irrancidimento, ecc) (Mucchetti e Neviani, 2006). Un ulteriore aspetto di cui tenere conto è che la refrigerazione limita la proliferazione dei batteri lattici, batteri fondamentali per l’avvio alla trasformazione casearia. Per questo motivo i disciplinari di produzione di molti formaggi del nostro Paese prevedono l’utilizzo di latte refrigerato a temperature superiori ai 6°C. Il regolamento CE 853/2004 consente infatti delle deroghe nel caso in cui “la trasformazione del latte avvenga entro le due ore successive alla fine della mungitura, o sia necessaria una temperatura più elevata per motivi tecnologici connessi alla fabbricazione di taluni prodotti lattiero-caseari e l’autorità competente lo consente”.

Anche le condizioni climatiche e la stagione svolgono un ruolo significativo nei confronti della contaminazione del latte in quanto temperature e umidità ambientali influiscono sulla proliferazione microbica a livello di lettiera, animali, superfici degli impianti. Ciò è evidente dagli andamenti

stagionali della carica batterica riportati sul sito dell'Istituto Zooprofilattico della Lombardia e dell'Emilia-Romagna e riferiti al latte delle stalle lombarde (IZSLER, 2010).

Secondo molti autori la determinazione della carica batterica del latte avrebbe un valore diagnostico limitato ai fini dell'identificazione dell'origine della contaminazione (Reinemann *et al.*, 1997); la determinazione delle cariche di batteri coliformi, termodurici e psicotrofi può infatti consentire una migliore identificazione della causa. I batteri termodurici, ad esempio, possono moltiplicarsi nel biofilm che si può creare all'interno dell'impianto di mungitura, ma la loro velocità di crescita nel tank di refrigerazione è molto lenta. Di conseguenza alte conte di batteri termodurici nel latte suggeriscono una intensa proliferazione degli stessi sulle superfici interne dell'impianto di mungitura (Bramley e McKinnon, 1990; Villar *et al.*, 1996) per effetto di una scarsa efficienza del lavaggio dell'impianto. I batteri psicotrofi possono crescere a temperature prossime a 0°C (Sørhaug e Stepaniak, 1997). Il ritrovamento di elevate cariche di batteri psicotrofi nel latte può essere un segno di temperature di raffreddamento inadeguate e/o di tempi di conservazione troppo lunghi. La presenza di coliformi è in genere un indicatore di contaminazione ambientale e fecale del latte per scarsa pulizia degli animali e scarsa igiene durante le operazioni di mungitura (Reinemann *et al.*, 1997). Tuttavia elevate cariche di coliformi possono anche essere dovute a inadeguata sanificazione dell'impianto di mungitura per insufficiente temperatura dell'acqua: ciò consente una moltiplicazione di tali batteri all'interno dell'impianto tra una mungitura e la successiva (Villar *et al.*, 1996). Di conseguenza sia i batteri termodurici che i coliformi possono evidenziare problemi di pulizia dell'impianto di mungitura.

## **5.2. I patogeni emergenti**

Oltre ad avere una carica batterica contenuta il latte deve risultare sicuro da un punto di vista sanitario. Tuttavia, se le principali malattie trasmissibili con il latte, come la brucellosi e la tubercolosi, sono state da tempo debellate, almeno in Lombardia, col progredire delle conoscenze è emerso che altri patogeni possono trasmettersi con il latte all'uomo (Cliver e Riehman, 2002; Krauss *et al.*, 2003). In base al principio di precauzione, sottovalutare il potenziale pericolo rappresentato dai patogeni emergenti sarebbe sbagliato per le possibili conseguenze negative sia per quanto riguarda la tutela del consumatore, che per quanto concerne il reddito degli allevatori.

Tra i patogeni che possono essere considerati di interesse nell'ambito della filiera latte vi sono batteri per i quali è stato confermato il ruolo del latte come potenziale veicolo d'infezione, e altri



invece, come ad esempio il MAP (*Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*), per i quali tale ruolo è ancora da dimostrare. I principali patogeni che possono riguardare il latte sono:

*Campylobacter* - I campilobatteri sono batteri in grado di causare malattie acute o croniche nell'uomo e negli animali, con sintomatologia tipica rappresentata da diarrea. Le due specie principalmente coinvolte nei focolai con origine animale sono *C. jejuni* e *C. fetus*. Le fonti per l'uomo sono numerosissime, dal contatto diretto con gli animali (compresi quelli selvatici e d'affezione), al consumo di alimenti (carne, latte) contaminati, ma anche di acqua contaminata. Il bovino non è né l'ospite né la fonte primaria di contaminazione, essendo questa rappresentata soprattutto da volatili e da suini, tuttavia la presenza di *Campylobacter* negli allevamenti bovini non è infrequente e quindi il potenziale rischio di contaminazione del latte è presente;

*E.coli* verocitotossici - I ceppi di *E. coli* verocitotossici, di cui *E. coli* O157:H7 è il principale rappresentante, sono un gruppo di coliformi che ha causato focolai di malattia, purtroppo con alcune vittime, negli USA in seguito al consumo di carne contaminata e poco cotta. Sebbene questi ceppi siano stati identificati in diversi ruminanti domestici, il bovino sembra essere il *reservoir* principale, mentre non si conosce il ruolo di altri animali come maiali e animali d'affezione. Questi batteri non causano forme enteriche nei bovini e per questo motivo gli animali portatori-eliminatori non vengono facilmente identificati. Come prima accennato, la carne contaminata in sede di macellazione e poco cotta rappresenta la fonte primaria d'infezione per l'uomo, tuttavia sono stati segnalati anche casi derivanti dal consumo di latte contaminato;

*Listeria monocytogenes* - La listeriosi è una malattia che colpisce animali e uomo e può determinare diverse forme cliniche anche gravi. Vi è una crescente evidenza che nell'uomo la maggior parte delle forme abbia origine alimentare. Negli animali la fonte principale di contaminazione è rappresentata da insilati e foraggi contaminati da terra o polvere, ma spesso la sintomatologia clinica è assente; è infatti possibile isolare il microrganismo dalle feci di diversi animali domestici e selvatici apparentemente sani. La listeria può essere eliminata attraverso il latte con maggiore frequenza rispetto ai batteri citati in precedenza;

*Yersinia enterocolitica* - Sebbene *Y. enterocolitica* sia molto diffusa nel mondo animale, il suo reale ruolo come agente di zoonosi o di tossinfezione alimentare è ancora discusso. Da sottolineare che sono stati segnalati solo alcuni sierotipi (O:3 e O:9) come causa di patologia nell'uomo, patologia caratterizzata soprattutto da forme enteriche. Gli alimenti contaminati sono considerati il principale veicolo di trasmissione di malattia all'uomo e tra questi sono compresi il latte e i prodotti a base di latte;

*Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* (MAP) - Questo microrganismo causa la paratubercolosi nel bovino ed è stato recentemente oggetto di particolare attenzione, poiché vi sono crescenti evidenze che possa anche essere implicato nel morbo di Crohn nell'uomo. Da sottolineare tuttavia che il ruolo zoonosico di *M. avium* non è stato ancora dimostrato. La paratubercolosi è presente da tempo negli allevamenti lombardi ed il microrganismo può essere eliminato con il latte oltre che con le feci, anche in assenza di segni clinici. I trattamenti termici ed in particolare la pastorizzazione non sono in grado di inattivarlo completamente, quindi vi è la dimostrata possibilità per l'uomo di assumere latte contaminato;

*Staphylococcus aureus* - È un microrganismo piuttosto diffuso in natura, essendo parte della flora commensale dell'uomo e degli animali, dove si localizza sulla cute, sulle mucose e nel tratto intestinale. Nella vacca da latte determina infezioni mammarie persistenti, responsabili di gravi danni economici per l'allevatore, a causa delle elevate perdite quali-quantitative nella produzione del latte. Nell'uomo provoca intossicazioni, conseguenti all'ingestione delle tossine prodotte dal batterio nell'alimento. La pastorizzazione è in grado di inattivare la maggior parte dei ceppi, per cui i cibi maggiormente implicati nelle tossinfezioni sono il latte e i prodotti a base di latte crudo.

## 6. Scopi

Il progetto LATTESAN ha avuto lo scopo di studiare in dettaglio le fonti di contaminazione batterica del latte durante la prima fase del processo produttivo, quella che si svolge in stalla, analizzando tutti i passaggi, dall'animale fino al tank di mungitura.

In particolare gli obiettivi principali del lavoro sono stati:

- l'identificazione dei punti critici nella prima fase della filiera di produzione del latte bovino, dall'animale al tank di refrigerazione, nei riguardi della qualità microbiologica del latte;
- la quantificazione dell'importanza relativa delle differenti fonti di contaminazione;
- lo studio delle relazioni tra caratteristiche microbiologiche del latte ed eventuale presenza di patogeni zoonosici nelle feci delle bovine e nel latte;
- la messa a punto di un sistema di diagnosi basato sull'impiego combinato di analisi microbiologiche e di strumenti, per l'individuazione rapida e semplice in azienda delle fonti di inquinamento batterico del latte.

## 7. Approccio metodologico

### Scelta del campione

Il progetto ha coinvolto 22 aziende bovine da latte, conferenti della Santangiolina Latte Fattorie Lombarde Società Agricola Cooperativa, e distribuite in diverse province del territorio lombardo (Cremona, Lecco, Lodi, Milano, Monza e Brianza e Pavia). Le aziende sono state scelte tra i 250 soci, che costituivano la cooperativa, in base ad alcuni criteri mirati a creare un campione sufficientemente omogeneo e rappresentativo delle tipologie aziendali più diffuse sul territorio lombardo: tutte le aziende adottavano la stabulazione libera, erano dotate di sala di mungitura, mungevano 2 volte al giorno e avevano un numero di bovine adulte inferiore a 200.

Nell'ambito degli allevamenti con tali requisiti, sono stati selezionati due gruppi di aziende, il primo costituito da aziende caratterizzate, tra il 2006 e il 2008, da buoni e costanti risultati in termini di qualità microbiologica del latte, il secondo da aziende caratterizzate da situazioni problematiche con elevati valori di carica batterica del latte o frequenti e intensi innalzamenti. La selezione è stata condotta sulla base delle analisi quindicinali della carica batterica effettuate sul latte di massa di ciascuna azienda negli anni 2006-2008, estratte dal database della cooperativa Santangiolina. Dalle

medie mensili di tali valori si sono scelte le aziende con la percentuale più elevata di valori mensili di carica batterica superiori a  $(4,18 + 0,4) \log_{10}$  UFC/mL, soglia calcolata dalla media della carica batterica dei 3 anni di tutto il campione più la rispettiva deviazione standard; con questo procedimento si è individuato un gruppo di 14 aziende caratterizzate da problemi di controllo dei livelli di contaminazione batterica del latte (più del 24% di controlli mensili superiori alla soglia, nei 3 anni). Analogamente, a partire dallo stesso valore soglia, si è scelto un gruppo di aziende caratterizzate dalla più bassa percentuale di valori mensili superiori alla soglia: in questo modo si è individuato un secondo gruppo di 8 aziende caratterizzate da valori bassi e soprattutto costanti della carica batterica del latte (meno del 6% di controlli mensili superiori al limite, nei 3 anni).

### **Raccolta dei dati e monitoraggi**

Ciascuna delle aziende del campione è stata visitata 3 volte, in corrispondenza della mungitura serale, in 3 diverse stagioni: estate, inverno e stagione intermedia (primavera o autunno). Durante la prima visita è stato compilato un questionario con l'aiuto dell'allevatore, per raccogliere informazioni sulla gestione della stalla e della mungitura.

In occasione delle 3 visite aziendali tutte le bovine in mungitura sono state punteggiate utilizzando il sistema dell'*hygiene score*, un metodo di valutazione della pulizia degli animali messo a punto da ricercatori statunitensi (Schreiner e Ruegg, 2002; 2003) che prevede l'assegnazione di un punteggio in funzione del grado di imbrattamento di tre parti anatomiche della bovina (mammella, arti e fianchi); la metodologia è descritta in dettaglio in Appendice. Il grado di pulizia della stalla invece è stato valutato, per le aziende dotate di cuccette, assegnando un punteggio da 1 a 3 in funzione della totale assenza, scarsa presenza o abbondante presenza di deiezioni sul fondo della cuccetta. Nelle aziende che adottavano la lettiera permanente è stato assegnato un giudizio complessivo sulla pulizia della lettiera da 1 a 3 (pulita, mediocre, sporca).

Nel corso delle 3 visite aziendali è stato valutato, prima dell'inizio della mungitura, il grado di contaminazione batterica di alcune superfici dell'impianto di mungitura (guaine e vaso terminale) e della sala di mungitura (pavimento delle poste e pareti) utilizzando un bioluminometro (SYSTEM Sure II, Labo-scientifica, Parma, Italia), uno strumento che viene impiegato per i controlli igienici rapidi di superfici e impianti, basato sulla rilevazione della presenza di ATP (vedi Appendice).

Al termine della mungitura, in occasione di ciascuna delle 3 visite aziendali, è stato monitorato il lavaggio dell'impianto di mungitura mediante l'utilizzo di flussometri elettronici (Lactocorder®, WMB, Balgach, Switzerland), per la registrazione della temperatura, del grado di turbolenza e della

conducibilità della soluzione detergente e del grado di riempimento dell'impianto; la metodologia è descritta in dettaglio in Appendice.

Infine in tutte le aziende è stato monitorato, per un periodo di 6 giorni successivi a ciascuna visita aziendale, l'andamento della temperatura del tank di refrigerazione del latte mediante il posizionamento nel tank di un termometro dotato di datalogger.

Utilizzando i dati delle centraline meteorologiche più vicine a ciascuna azienda del campione sono stati ottenuti i dati di temperatura e umidità dell'aria dei mesi in cui sono state effettuate le visite (ARPA, 2009).

### **Campionamenti e analisi microbiologiche**

In corrispondenza delle visite aziendali si sono effettuati i seguenti campionamenti e tamponi:

- campioni di latte di massa prelevati dal tank prima (se il tank conteneva già latte) e dopo la mungitura;
- campioni di latte di massa della mungitura in corso raccolti in continuo attraverso un apposito deviatore posto a monte del tank di mungitura;
- tamponi effettuati all'interno della testa delle guaine di mungitura (2 guaine per ciascun gruppo) del primo e dell'ultimo gruppo, prima della mungitura, ad impianto vuoto e pulito;
- tamponi effettuati in corrispondenza dello scarico del vaso terminale, prima della mungitura ad impianto vuoto e pulito;
- campioni di acqua dell'ultimo risciacquo al termine del lavaggio dell'impianto di mungitura.

Sui campioni di latte e acqua e sui tamponi sono state effettuate le seguenti analisi: Carica Batterica Standard (CBS), coliformi, psicotrofi, termodurici, *Escherichia coli* e, per il latte, anche cellule somatiche. Sulle guaine di mungitura si è valutata anche la contaminazione da *Staphylococcus aureus* mediante la determinazione degli Stafilococchi coagulasi positivi. Le metodiche analitiche utilizzate sono descritte in dettaglio in Appendice.

Al termine delle operazioni di preparazione dei capezzoli alla mungitura, prima dell'attacco del gruppo, è stato effettuato, su un campione di bovine di ciascuna stalla, un tampone sulla cute di un capezzolo con un fazzoletto umidificato. Su tali tamponi si sono determinate CBS e *Staphylococcus aureus*, quest'ultimo valutato attraverso il numero di Stafilococchi coagulasi positivi.

I valori delle conte batteriche in UFC per mL o, nel caso dei tamponi, in UFC per superficie campionata, sono stati successivamente convertiti in logaritmi in base 10 mentre il valore di cellule somatiche per mL è stato convertito in Linear Score (LS) tramite la seguente equazione:  $LS = \log_2 (SCC/12500)$  (Wiggans e Shook, 1987).

### **Ricerca di patogeni zoonosici**

Per la ricerca di patogeni zoonosici durante ciascuna visita aziendale si sono raccolti i seguenti campioni:

- campioni di latte di massa della mungitura in corso rappresentativi di tutta la mandria;
- campioni di feci delle bovine in lattazione prelevati in corsia di alimentazione mediante calpestamento di un'area di 1 metro quadrato, tramite appositi calzari monouso;
- filtro di mungitura, prelevato al termine della mungitura.

I patogeni ricercati sono stati i seguenti: *Campylobacter*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* (MAP), *Staphylococcus aureus*. Le metodiche analitiche utilizzate sono descritte in Appendice.

### **Analisi statistica**

I dati raccolti e i risultati delle analisi microbiologiche sono stati analizzati mediante metodologie epidemiologiche e statistiche utilizzando il pacchetto statistico SAS (2001). La descrizione dei metodi statistici applicati è riportata in Appendice.

## **8. Risultati e discussione**

### **8.1. Caratteristiche del campione di aziende**

Le 22 aziende monitorate erano localizzate in diverse province lombarde, in aree di pianura e avevano in media 72 bovine in lattazione ( $\pm 40,2$ ), da un minimo di 13 a un massimo di 174. La produzione di latte, calcolata solo su 17 aziende iscritte ai controlli funzionali delle Associazioni Provinciali Allevatori, è risultata in media, nei mesi in cui si sono effettuate le visite, pari a 28,3 kg al giorno per vacca in mungitura, con il 3,8% di grasso e il 3,4% di proteine. Dal punto di vista strutturale le aziende del campione erano tutte caratterizzate dall'adozione della stabulazione libera per le bovine in lattazione. In 17 casi su 22 erano presenti cuccette nella zona di riposo mentre 5 aziende adottavano la lettiera permanente. In tutte le 22 aziende coinvolte nel progetto era presente la sala di mungitura: 19 sale a spina di pesce, 2 parallele e una sola sala di mungitura a tandem. Tutte le aziende effettuavano la mungitura 2 volte al giorno.

### **8.2. Dati microbiologici**

Nelle tabelle 1 e 2 sono riportati i risultati medi delle analisi microbiologiche effettuate nelle 22 aziende del campione in occasione delle 3 visite, per un totale di circa 66 campioni per ogni tipologia. Si sono prelevati 3 campioni di latte (tabella 1) per ogni visita in ogni azienda: latte pre mungitura, già presente nel tank prima della mungitura monitorata e sottoposto mediamente ad almeno 12 ore di refrigerazione (talvolta il tank era vuoto per cui la numerosità per questo campione è inferiore a 66); latte della mungitura corrente, cioè quella monitorata, prelevato tramite un sistema di deviazione e rappresentativo di tutte le vacche munte (tranne quelle il cui latte veniva separato) e, infine, latte post mungitura, prelevato dal tank dopo la mungitura e quindi rappresentativo del latte già presente nel tank e del latte appena munto. E' possibile notare che i risultati microbiologici delle tre diverse tipologie di campioni di latte non si differenziano sostanzialmente. Il latte prelevato nel corso della mungitura monitorata è risultato leggermente più contaminato rispetto agli altri due campioni; questo comportamento è attribuibile al sistema sperimentale di deviazione adottato che può aver costituito una involontaria fonte di contaminazione. In considerazione della minore numerosità dei campioni di latte ottenuti dal tank prima della mungitura e della maggior contaminazione del latte della mungitura corrente, si è scelto di presentare i risultati microbiologici del campione di latte raccolto dal tank dopo la mungitura.

La Carica Batterica Standard (CBS) media dei campioni di latte raccolti dal tank dopo la mungitura (post mungitura) è risultata di 4,00 log<sub>10</sub> UFC/mL ( $\pm 0,50$ ), pari a 10.000 UFC/mL, valore ben inferiore al limite legale che è di 100.000 UFC/mL (REG. CE n. 853/2004). Il campione di aziende studiato perciò, pur comprendendo alcuni casi caratterizzati da problematiche di variabilità del valore di carica batterica, ha presentato nella media un'ottima qualità microbiologica del latte. La figura 1 mostra la distribuzione dei valori medi della CBS del latte nelle aziende del campione.

Tabella 1 - Analisi microbiologiche dei campioni di latte (log<sub>10</sub> UFC/mL) e contenuto di cellule somatiche (LS)

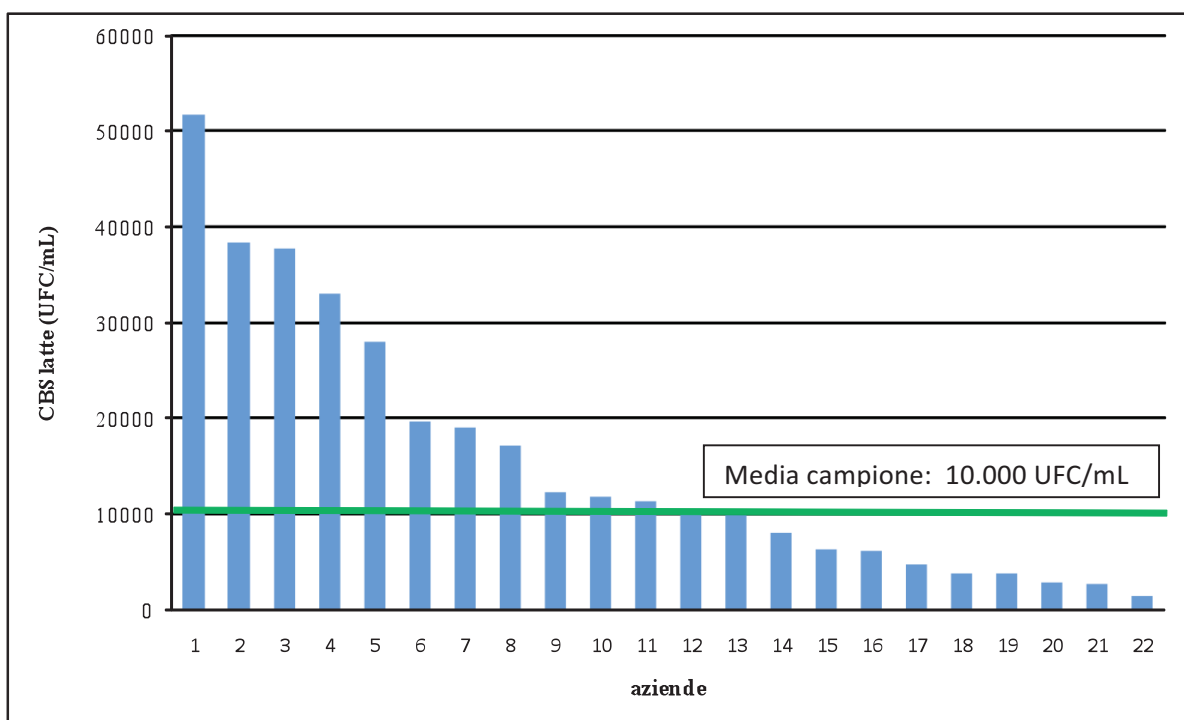
Campione latte	Parametro	n	Media	DS	Minimo	Massimo
Pre mungitura	CBS	59	<b>4,03</b>	0,55	2,95	5,43
Mungitura corrente	CBS	65	<b>4,17</b>	0,60	3,00	5,70
Post mungitura	CBS	65	<b>4,00</b>	0,50	2,95	4,99
Pre mungitura	Coliformi	59	<b>1,89</b>	0,86	0,95	4,00
Mungitura corrente	Coliformi	65	<b>1,92</b>	0,87	0,95	3,60
Post mungitura	Coliformi	65	<b>1,99</b>	0,83	0,95	3,90
Pre mungitura	<i>E. coli</i>	59	<b>1,07</b>	0,32	0,95	2,45
Mungitura corrente	<i>E. coli</i>	64	<b>1,02</b>	0,21	0,95	2,15
Post mungitura	<i>E. coli</i>	64	<b>1,05</b>	0,26	0,95	2,20
Pre mungitura	Termoturifici	59	<b>2,44</b>	0,55	1,95	4,04
Mungitura corrente	Termoturifici	65	<b>2,50</b>	0,58	1,95	3,92
Post mungitura	Termoturifici	65	<b>2,42</b>	0,53	1,95	3,99
Pre mungitura	Psicrotrofi	59	<b>3,62</b>	0,77	1,95	5,27
Mungitura corrente	Psicrotrofi	65	<b>3,70</b>	0,76	1,95	5,60
Post mungitura	Psicrotrofi	65	<b>3,65</b>	0,69	1,95	5,33
Pre mungitura	Cellule som.	61	<b>4,26</b>	1,08	2,49	7,53
Mungitura corrente	Cellule som.	64	<b>4,35</b>	1,14	2,08	7,21
Post mungitura	Cellule som.	63	<b>4,22</b>	1,03	2,42	7,20

Il valore medio di coliformi nel latte è risultato piuttosto contenuto ( $1,99 \pm 0,83$  log<sub>10</sub> UFC/mL, corrispondente a 98 UFC/mL), ma occorre sottolineare l'elevata variabilità del dato: il massimo arriva a 3,90 log<sub>10</sub> UFC/mL, valore corrispondente a 8000 UFC/mL. In un recente studio americano condotto da Pantoja *et al.* (2009) il valore dei coliformi nel latte di massa determinato su oltre 7000 campioni in 15 aziende è risultato pari a 1,7 log<sub>10</sub> UFC/mL, con un range compreso tra 0 e 1520 UFC/mL. I batteri coliformi sono di derivazione ambientale (terra, lettiera) e fecale, quindi possono essere indice di un ambiente (stalla, lettiera, sala di mungitura) non adeguatamente pulito e di una



insufficiente pulizia degli animali (capezzoli) prima dell'attacco del gruppo di mungitura. Poiché i batteri coliformi si moltiplicano agevolmente sui residui di latte all'interno dell'impianto di mungitura, elevati contenuti di coliformi possono anche essere un segnale di scarsa efficienza del sistema di lavaggio dell'impianto (Reinemann *et al.*, 1997). Secondo Villar *et al.* (1996) questo fenomeno si verificherebbe soprattutto in presenza di basse temperature di lavaggio. *Escherichia coli*, potenziale microrganismo patogeno, appartenente al gruppo dei coliformi, è risultato presente nel latte con un valore medio di  $1,05 \pm 0,26 \log_{10}$  UFC/mL (pari a 11 UFC/mL).

Figura 1 - Valori medi per azienda (media dei 3 controlli) di CBS nel latte campionato dal tank dopo la mungitura (UFC/mL)



I batteri termodurici sono risultati nel latte pari a  $2,42 \pm 0,53 \log_{10}$  UFC/mL, equivalenti a 264 UFC/mL. Questi batteri possono resistere alle temperature di lavaggio e moltiplicarsi grazie alla presenza di residui di latte nell'impianto di mungitura, sulle superfici di guaine e tubi, quando queste non sono pulite in modo corretto; la loro presenza può quindi essere segno di inefficienza del sistema di lavaggio dell'impianto di mungitura.

Il valore medio dei batteri psicrotrofi è risultato di  $3,65 \pm 0,69 \log_{10}$  UFC/mL, pari a 4452 UFC/mL. Questi sono microrganismi che si moltiplicano bene a temperature basse (vicino a 0°C); essi possono quindi essere indice di una scarsa igiene e/o di una durata eccessiva della conservazione del latte nel tank.

Le cellule somatiche del latte, espresse come Linear Score (LS), sono risultate mediamente pari a  $4,22 \pm 1,03$ , equivalenti a circa 233.000 cellule/mL, valore che in assoluto non si può considerare basso, ma che risulta comunque ben inferiore al limite di legge che è di 400.000 cellule/mL (REG. CE n. 853/2004).

Per quanto riguarda le analisi microbiologiche dei tamponi effettuati su guaine e vaso terminale dell'impianto di mungitura (tabella 2), i livelli di contaminazione sono risultati mediamente piuttosto elevati se si considera che i tamponi sono stati eseguiti appena prima della mungitura sull'impianto pulito, approssimativamente dopo circa 12 ore dall'ultimo lavaggio. Questi risultati suggeriscono un contributo importante delle superfici interne dell'impianto di mungitura alla contaminazione batterica del latte. In una precedente esperienza condotta su 10 aziende lombarde si sono ottenuti valori di CBS dei tamponi effettuati sulle guaine (con analoga superficie tamponata) leggermente più bassi, pari a 3,46 e 2,90 log<sub>10</sub> UFC/sup. campionata, nelle aziende che adottavano temperature di lavaggio dell'impianto rispettivamente inferiori o superiori a 40°C (Bava *et al.*, 2009).

Tabella 2 - Dati microbiologici medi dei campioni di acqua di risciacquo (log<sub>10</sub> UFC/mL) e dei tamponi eseguiti su guaine, vaso terminale e capezzoli (log<sub>10</sub> UFC/sup. campionata)

Campione	Parametro	n	Media	DS	Minimo	Massimo
Guaine	CBS	66	<b>3,69</b>	0,89	1,71	5,35
Guaine	Coliformi	66	<b>0,60</b>	0,49	0,28	2,44
Guaine	<i>E. coli</i>	66	<b>0,43</b>	0,25	0,28	1,65
Guaine	Termodurici	66	<b>2,00</b>	0,65	0,39	3,40
Guaine	Psicrotrofi	66	<b>3,05</b>	1,04	0,91	4,91
Guaine	<i>Staph.aureus</i>	66	<b>0,13</b>	0,35	0,00	1,53
Vaso terminale	CBS	51	<b>3,21</b>	1,11	1,30	5,00
Vaso terminale	Coliformi	51	<b>0,57</b>	0,49	0,30	2,26
Vaso terminale	<i>E. coli</i>	51	<b>0,36</b>	0,20	0,30	1,26
Vaso terminale	Termodurici	51	<b>1,70</b>	0,60	0,48	4,00
Vaso terminale	Psicrotrofi	51	<b>2,56</b>	1,17	0,30	5,18
Capezzoli	CBS	65	<b>5,33</b>	0,61	3,13	6,47
Capezzoli	<i>Staph.aureus</i>	65	<b>3,05</b>	0,23	2,95	4,02
Acqua risciacquo	CBS	64	<b>2,39</b>	0,77	1,30	4,70
Acqua risciacquo	Coliformi	64	<b>0,18</b>	0,61	0,00	2,56
Acqua risciacquo	Termodurici	64	<b>1,27</b>	0,59	0,95	2,90
Acqua risciacquo	Psicrotrofi	64	<b>1,43</b>	0,87	0,95	4,30

Da notare la presenza, pur molto contenuta, di *Staphylococcus aureus* sulle guaine a riprova del possibile ruolo di queste componenti dell'impianto nel trasferimento dei batteri contagiosi da una bovina all'altra.

Il tampone effettuato sui capezzoli, dopo le operazioni di pulizia degli stessi e appena prima dell'attacco del gruppo, ha fatto registrare un valore medio di CBS pari a  $5,33 \pm 0,61 \log_{10}$  UFC/sup. campionata. La contaminazione del capezzolo dipende dalle condizioni igieniche degli animali e dall'efficacia delle operazioni di pulizia ed eventuale disinfezione dei capezzoli prima della mungitura. Attraverso tamponi eseguiti sui capezzoli prima e dopo le operazioni di pulizia *ante* mungitura Gibson *et al.* (2008) hanno osservato in tutti i casi un effetto di riduzione della carica batterica sui capezzoli indipendentemente dal sistema di detersione o disinfezione adottato. La contaminazione dei tamponi effettuati sui capezzoli da parte di *Staphylococcus aureus* è risultata di  $3,05 \pm 0,23 \log_{10}$  UFC/sup. campionata.

### 8.3. Relazioni tra dati microbiologici

I diversi gruppi microbici ricercati nel latte sono risultati altamente correlati fra di loro e con le cellule somatiche del latte (tabella 3). In particolare la CBS è risultata positivamente e significativamente correlata con coliformi, con batteri termodurici e con psicotrofi. La correlazione tra batteri psicotrofi e coliformi, che ne fanno parte, è risultata positiva e altamente significativa. La correlazione tra batteri coliformi e termodurici è risultata invece piuttosto blanda; un risultato analogo era stato riportato da Villar *et al.* (1996). Sia i batteri termodurici che i coliformi possono derivare da inadeguata igiene dell'impianto di mungitura ma la bassa correlazione suggerisce che i due gruppi microbici possano fornire informazioni diverse relativamente alle pratiche igieniche adottate.

Tabella 3 - Coefficienti di correlazione semplice tra dati microbiologici ( $\log_{10}$  UFC/mL) e cellule somatiche (LS) del latte campionato dal tank dopo la mungitura (n=66)

	CBS	Coliformi	<i>E.coli</i>	Termodurici	Psicotrofi	Cellule som.
CBS	1	0,69 ***	0,29 *	0,49 ***	0,76 ***	0,56 ***
Coliformi		1	0,36 **	0,29 *	0,70 ***	0,29 *
<i>E.coli</i>			1	0,15	0,28 *	0,18
Termodurici				1	0,33 **	0,31 *
Psicotrofi					1	0,34 **
Cellule som.						1

\*=P<0,05; \*\*=P<0,01; \*\*\*=P<0,001

Anche le cellule somatiche sono risultate correlate positivamente e con alta significatività statistica con la CBS ( $r=0,56$ ), evidenziando una relazione piuttosto stretta tra stato sanitario degli animali e carica batterica del latte. La presenza di *Escherichia coli* nel latte è risultata correlata positivamente alla CBS e ai coliformi ma con coefficienti di correlazione bassi.

Inoltre, a conferma del fatto che diversi fattori contribuiscono a determinare la qualità microbica del latte, tra le relazioni degne di nota vi sono le correlazioni positive tra CBS del latte da un lato e CBS e batteri termodurici dei tamponi eseguiti sulle guaine dall'altro, che hanno mostrato coefficienti di correlazione di 0,43 ( $P<0,001$ ) e 0,57 ( $P<0,001$ ), rispettivamente. Anche la pulizia dei capezzoli, valutata attraverso i valori di CBS dei tamponi eseguiti prima dell'attacco del gruppo di mungitura, è risultata positivamente e significativamente correlata con la CBS del latte ( $r=0,51$ ;  $P<0,001$ ). Nessuna relazione è emersa invece tra il contenuto di cellule somatiche del latte e la presenza di *Staphylococcus aureus* sui tamponi effettuati sui capezzoli e sulle guaine.

#### **8.4. Effetto stagionale**

I controlli sono stati ripetuti in ogni azienda in tre diverse periodi dell'anno per valutare l'effetto stagionale. Una visita è stata effettuata durante l'estate (giugno-luglio), una durante il periodo invernale (dicembre-gennaio) e un'altra in primavera o autunno (aprile-maggio; settembre-ottobre).

Le temperature medie giornaliere nei tre periodi di campionamento sono state le seguenti: 3,85°C (con un minimo di -6,4°C) nel periodo invernale; 12,1°C durante il periodo primaverile/autunnale e 23,5°C (con un massimo di 28°C) durante il periodo estivo (ARPA, 2009).

Come è evidenziato nella tabella 4, la CBS, i batteri coliformi e i batteri termodurici del latte sono risultati significativamente più elevati durante il periodo estivo rispetto all'inverno. La CBS è risultata 4,20  $\log_{10}$  UFC/mL in estate, equivalente a 15.849 UFC/mL, contro 3,88  $\log_{10}$  UFC/mL d'inverno, equivalente a 7586 UFC/mL ( $P<0,001$ ). Il campionamento effettuato nel periodo autunno/primaverile (indicato in tabella come Primavera) ha mostrato, per tutti e tre i parametri, valori intermedi. L'effetto significativo della stagione sulla contaminazione batterica del latte, specialmente alle nostre latitudini e con le condizioni climatiche tipiche della pianura lombarda, era prevedibile in considerazione della più rapida moltiplicazione batterica favorita a tutti i livelli (lettiera, mammelle, impianto di mungitura, ecc.) dalle alte temperature e dall'elevata umidità.

Tale risultato è in linea con gli andamenti riportati dall'Istituto Zooprofilattico (ISZLER, 2010) per il latte lombardo. Il fenomeno è riportato anche da altri autori che hanno lavorato in condizioni

climatiche piuttosto differenti come, ad esempio, Elmoslemany *et al.* (2009) che hanno raccolto dati in aziende della Prince Edward Island, sulla costa atlantica del Canada, registrando innalzamenti estivi della contaminazione batterica del latte, soprattutto in termini di batteri coliformi. In uno studio condotto da Pantoja *et al.* (2009), invece, l'effetto della stagione sulle caratteristiche microbiologiche del latte è risultato molto variabile tra le aziende, suggerendo come specifici fattori di rischio a livello aziendale possano mascherare le variazioni stagionali. La valutazione dell'effetto stagionale sui differenti gruppi batterici monitorati nel latte ha evidenziato, nella stagione calda, una maggiore presenza di coliformi rispetto agli altri gruppi batterici; in particolare d'estate, rispetto alle altre due stagioni, si è registrato un innalzamento significativo ( $P < 0,001$ ) del rapporto coliformi/CBS in accordo con i risultati di Elmoslemany *et al.* (2009). Il fenomeno è ben evidenziato nella figura 2.

Tabella 4 - Effetto della stagione sulle caratteristiche microbiologiche del latte ( $\log_{10}$  UFC/mL), dei tamponi effettuati su guaine, vaso terminale e capezzoli ( $\log_{10}$  UFC/sup. campionata) e sulle cellule somatiche del latte (LS)

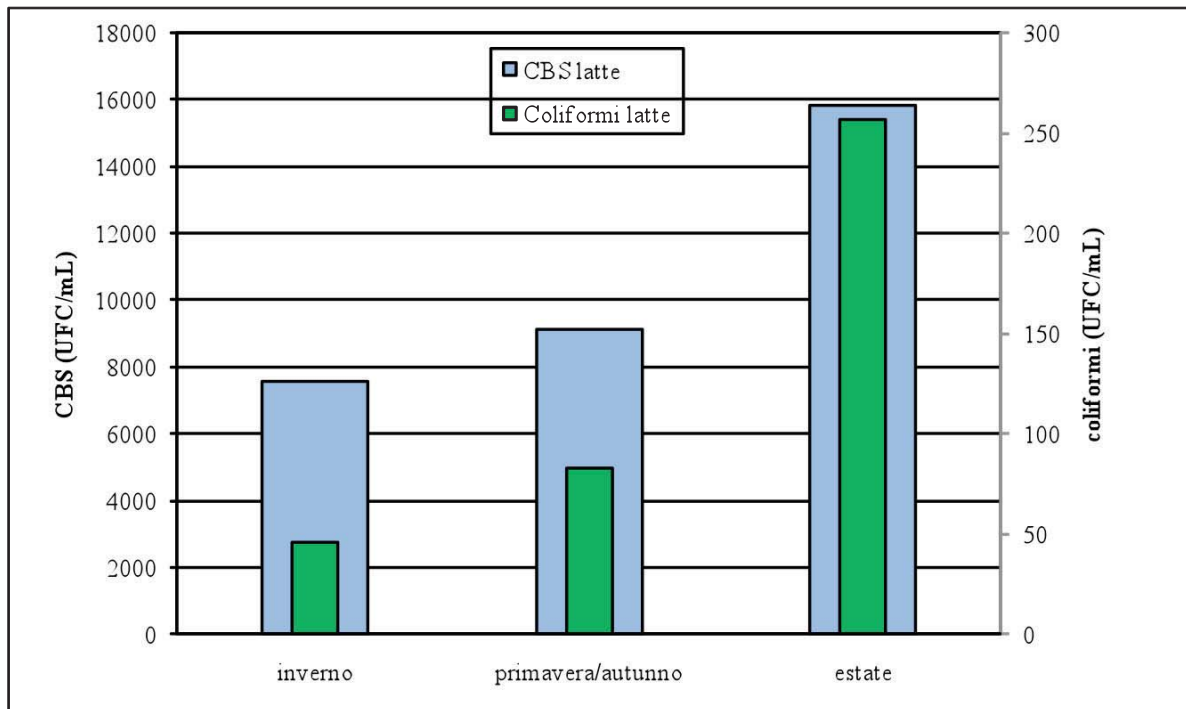
Campione	Parametro	Inverno	Primavera	Estate	ES	I vs E	P vs E	I vs P
		n=22	n=22	n=22				
Latte	CBS	<b>3,88</b>	<b>3,96</b>	<b>4,20</b>	0,07	****	*	
Latte	Coliformi	<b>1,66</b>	<b>1,92</b>	<b>2,41</b>	0,14	****	**	
Latte	<i>E. coli</i>	<b>1,05</b>	<b>1,10</b>	<b>1,01</b>	0,06			
Latte	Termodurici	<b>2,26</b>	<b>2,47</b>	<b>2,55</b>	0,09	*		
Latte	Psicrotrofi	<b>3,59</b>	<b>3,54</b>	<b>3,84</b>	0,12			
Latte	Cellule som.	<b>4,07</b>	<b>4,29</b>	<b>4,55</b>	0,12	****		
Latte	Coliformi/CBS	<b>0,42</b>	<b>0,48</b>	<b>0,57</b>	0,03	****	*	
Guaine	CBS	<b>3,61</b>	<b>3,64</b>	<b>3,82</b>	0,16			
Guaine	Coliformi	<b>0,52</b>	<b>0,66</b>	<b>0,62</b>	0,07			
Guaine	<i>S. aureus</i>	<b>0,32</b>	<b>0,06</b>	<b>0,01</b>	0,01	**		*
Vaso terminale	CBS	<b>2,92</b>	<b>3,61</b>	<b>3,07</b>	0,24			*
Vaso terminale	Coliformi	<b>0,61</b>	<b>0,57</b>	<b>0,56</b>	0,12			
Capezzoli	CBS	<b>5,28</b>	<b>5,34</b>	<b>5,37</b>	0,10			
Capezzoli	<i>S. aureus</i>	<b>3,23</b>	<b>2,95</b>	<b>2,96</b>	0,04	****		****

\*= $P < 0,05$ ; \*\*= $P < 0,01$ ; \*\*\*= $P < 0,001$

Tra estate e inverno si è osservata una differenza significativa anche in termini di cellule somatiche del latte, espresse come LS, che sono risultate più elevate d'estate che d'inverno: 4,55 contro 4,07 ( $P < 0,001$ ), equivalenti rispettivamente a circa 293.000 cellule/mL e 210.000 cellule/mL.

L'innalzamento del numero di cellule somatiche del latte durante il periodo estivo è peraltro un fenomeno noto, come è possibile anche osservare dagli andamenti stagionali delle cellule somatiche nel latte lombardo riportati dall'Istituto Zooprofilattico (ISZLER, 2010).

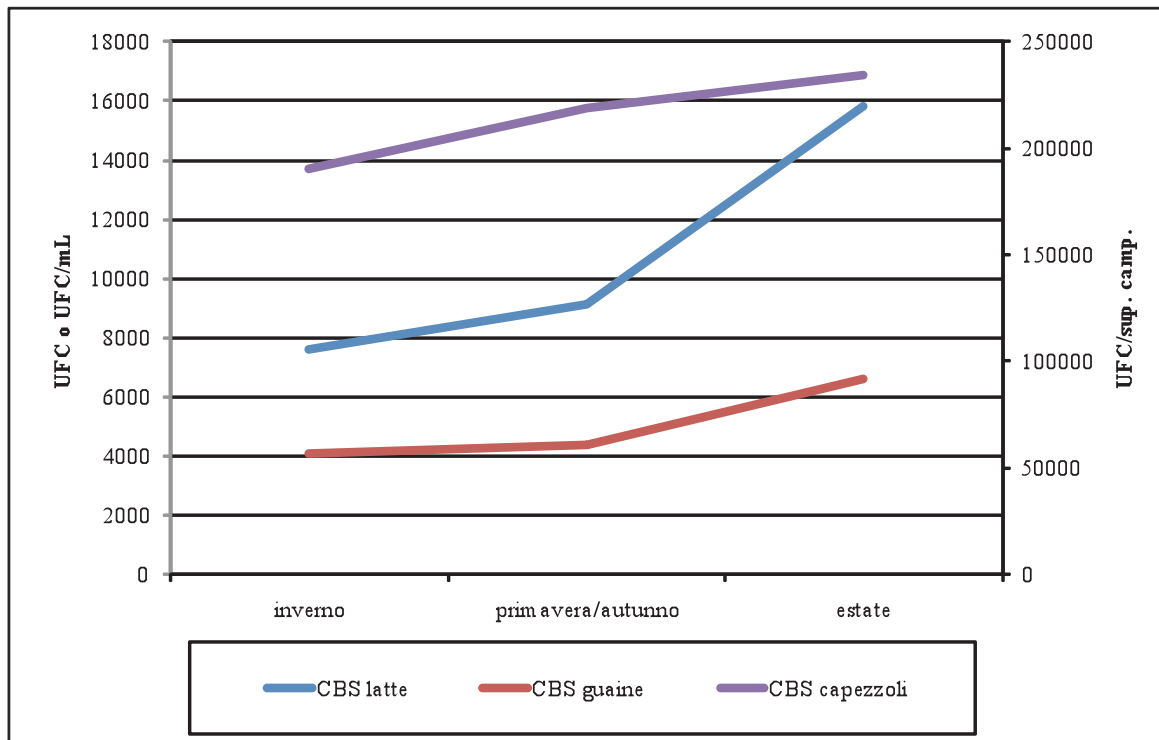
Figura 2 - Variazione stagionale di CBS e coliformi nel latte (UFC/mL)



Per quanto riguarda gli altri campioni, i valori estivi di CBS e coliformi sono sempre risultati più elevati di quelli invernali a tutti i livelli (capezzoli, guaine e vaso terminale) anche se le differenze non hanno mai raggiunto la significatività statistica (tabella 4 e figura 3).

Sulle guaine si sono ottenute differenze significative tra le stagioni in termini di *Staphylococcus aureus* con valori più elevati durante l'inverno rispetto alla stagione estiva e a quella intermedia (tabella 4). Tali risultati possono essere spiegati da un'insufficiente temperatura dell'acqua di lavaggio dell'impianto, che nei mesi più freddi si abbassa ulteriormente soprattutto a livello delle guaine, e non è quindi in grado di eliminare completamente il microrganismo. Non va dimenticato infatti che *Staphylococcus aureus* produce una matrice extracellulare e si aggrega in ammassi, formando un biofilm (Costerton *et al.*, 1999), che gli consente una maggiore adesione ai materiali in gomma e aumenta la resistenza ai disinfettanti. L'andamento stagionale trova parziale conferma nei valori di *S. aureus* sui tamponi effettuati sui capezzoli che hanno evidenziato valori più elevati in inverno rispetto alle altre due stagioni ( $P < 0,001$ ). Anche Makovec e Ruegg (2003) hanno osservato valori di *S. aureus* nel latte più elevati nella stagione invernale rispetto al resto dell'anno.

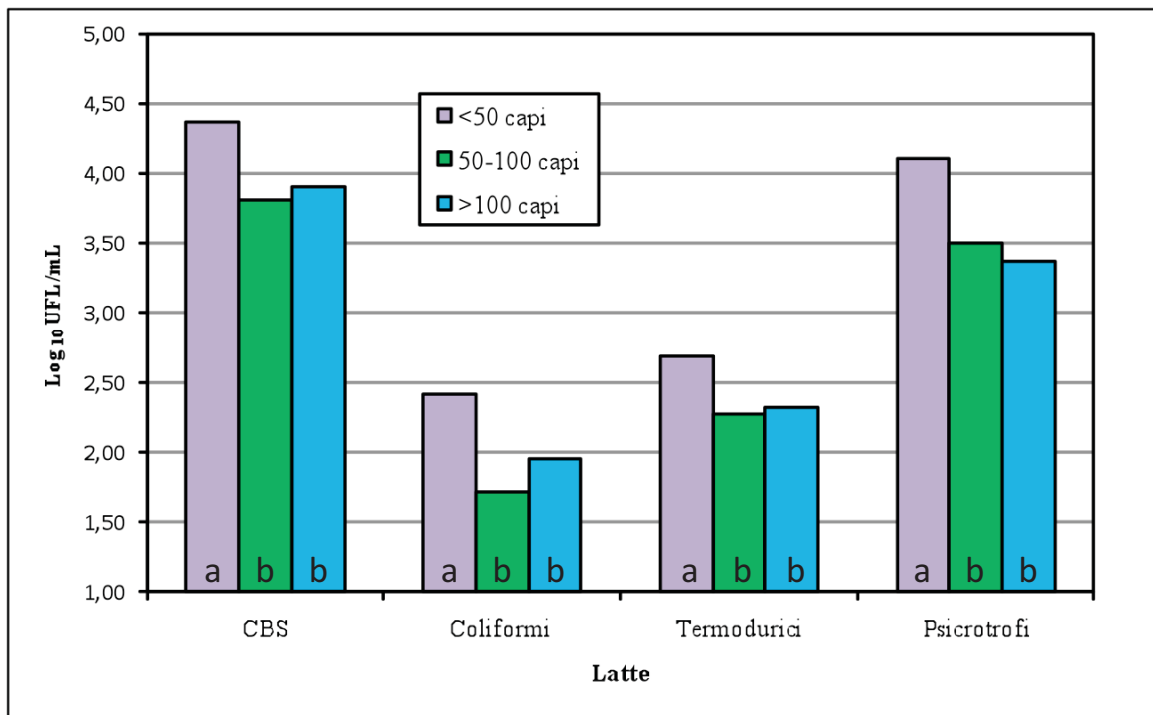
Figura 3 - Variazione stagionale di CBS sui capezzoli, sulle guaine e nel latte (UFC/mL o UFC/sup. campionata)



## 8.5. Dimensione aziendale

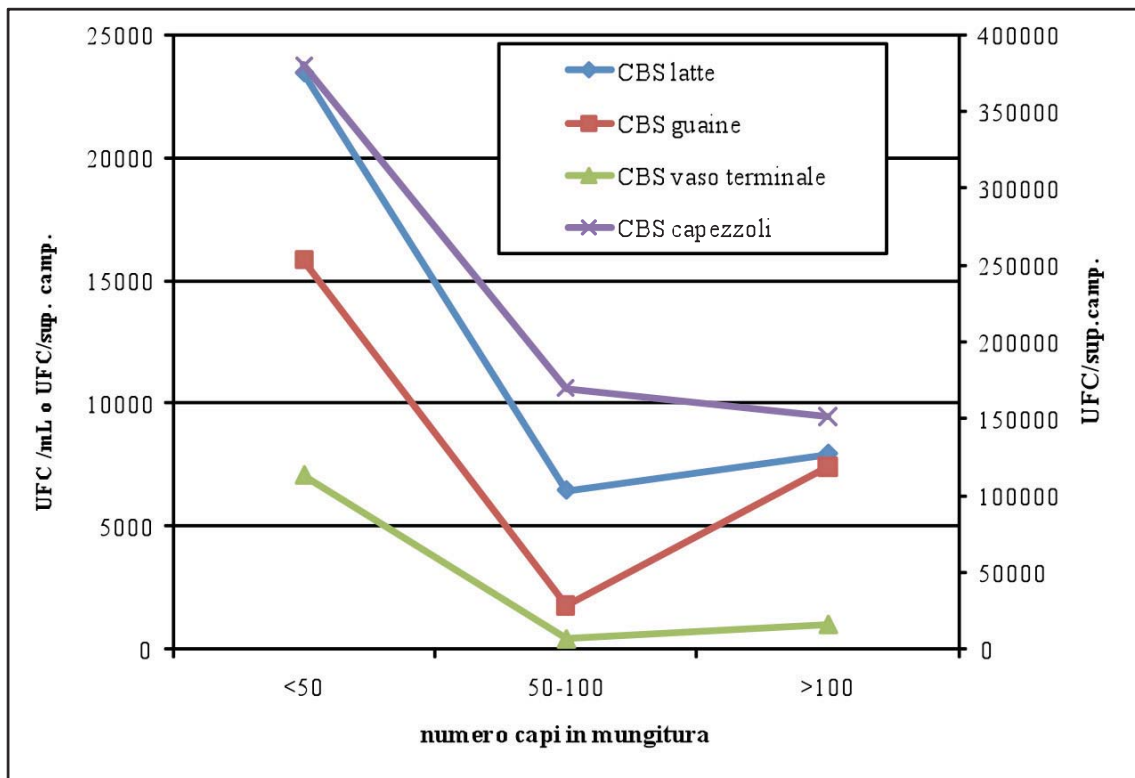
La maggior parte dei parametri microbiologici controllati ha fatto registrare differenze significative in funzione della dimensione delle aziende, espressa come numero di capi in mungitura. La figura 4 mostra l'effetto della dimensione aziendale sulle principali caratteristiche microbiologiche del latte. In particolare nelle aziende più piccole si sono riscontrati valori significativamente più elevati, rispetto alle altre aziende, per tutti i parametri microbiologici del latte e per le cellule somatiche (fa eccezione solo *E. coli* che non è risultato statisticamente differente tra il primo e il terzo gruppo di aziende). La CBS del latte è risultata nelle aziende piccole, medie e grandi, di 4,37, 3,81 e 3,90  $\log_{10}$  UFC/mL pari a circa 23400, 6500 e 7900 UFC/mL, rispettivamente. Anche relativamente all'igiene dell'impianto e alla carica batterica dei capezzoli, il gruppo di aziende più piccole ha quasi sempre avuto valori superiori rispetto agli altri due gruppi (figura 5). Per quanto riguarda gli altri due gruppi di aziende, rispettivamente con 50-100 capi e con più di 100 capi, i migliori risultati nella maggior parte dei casi si sono avuti nel gruppo di aziende di medie dimensioni rispetto alle aziende più grandi. Risultati analoghi per quanto riguarda l'effetto della dimensione aziendale sulla qualità microbiologica del latte si sono osservati in un precedente lavoro (Bava *et al.*, 2008) dove le aziende più piccole hanno fatto registrare i peggiori risultati in termini di CBS e coliformi del latte.

Figura 4 - Effetto della dimensione aziendale sulla carica batterica del latte ( $\log_{10}$  UFC/mL)



Le classi con lettere differenti differiscono significativamente almeno per  $P < 0,05$

Figura 5 - Effetto della dimensione aziendale sulla CBS di capezzoli, guaine, vaso terminale (UFC/sup. camp.) e latte (UFC/mL)





Anche Jayarao *et al.* (2004) hanno evidenziato un effetto significativo della dimensione aziendale sulla carica batterica del latte di massa.

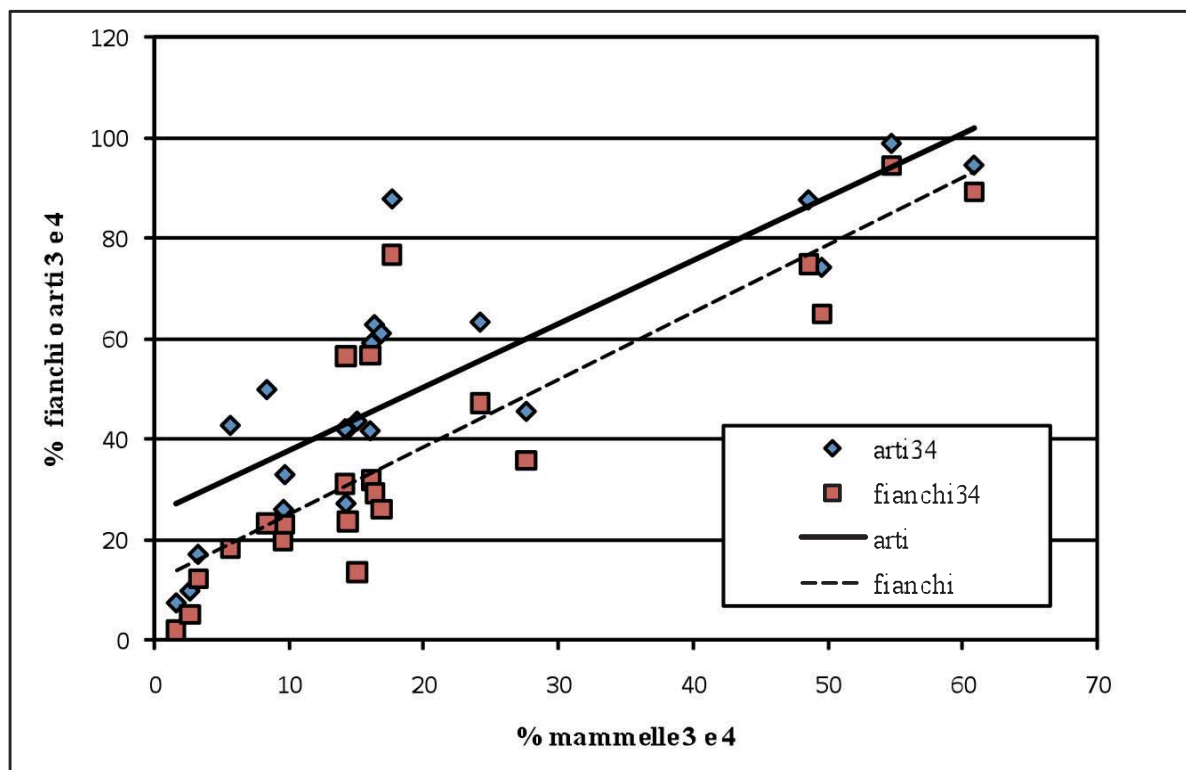
Le differenze registrate in questo lavoro si possono spiegare principalmente considerando il fatto che in molti casi le aziende più piccole avevano strutture di allevamento molto vecchie e tendenzialmente non adeguate ad assicurare una buona pulizia degli ambienti e degli animali. Inoltre anche le sale di mungitura e gli impianti di mungitura e di refrigerazione del latte si presentavano in molti casi chiaramente obsoleti. Nelle aziende sopra i 100 capi invece il problema non risiedeva sicuramente nelle strutture, spesso recenti e generalmente adeguate, ma più probabilmente nel personale salariato non sempre attento e forse non sempre adeguatamente preparato.

## **8.6. Pulizia degli animali e pulizia della stalla**

Come già illustrato, per la valutazione della pulizia degli animali è stato utilizzato lo schema di *hygiene score* ideato da un gruppo di ricercatori americani (Schreiner e Ruegg, 2002; 2003) che prevede l'assegnazione a 3 diverse aree anatomiche (arti, fianchi e mammella) di un punteggio da 1 a 4, da pulizia ottima a imbrattamento molto esteso. La valutazione è stata effettuata su tutte le bovine in mungitura durante tutte e tre le visite per un totale di più di 4200 animali punteggiati.

In media la percentuale di animali con fianchi classificati come sporchi o molto sporchi (punteggi 3 e 4) è stata di  $37,8 \pm 29\%$ , quella con arti sporchi è stata di  $50,2 \pm 30,4\%$ , quella con mammelle sporche di  $19,8 \pm 20,7\%$ . I risultati indicano quindi un maggior grado di sporcizia degli arti rispetto alle altre zone del corpo esaminate, mentre le mammelle sono risultate mediamente piuttosto pulite. Nonostante ciò le correlazioni tra le percentuali di animali con punteggi 3 e 4 per le diverse parti anatomiche dell'animale sono risultate tutte molto elevate a dimostrazione del fatto che comunque, quando gli animali si presentano visibilmente sporchi, difficilmente possono avere mammelle pulite. La correlazione tra i punteggi di arti e fianchi, espressi sempre come percentuali di animali con punteggi 3 e 4, è risultata positiva con un coefficiente di correlazione ( $r$ ) pari a 0,74 ( $P < 0,001$ ), mentre tra arti e mammelle  $r$  è stato di 0,67 ( $P < 0,001$ ) e tra fianchi e mammelle di 0,72 ( $P < 0,001$ ). Nella figura 6 è evidenziata la relazione tra percentuali di fianchi e arti sporchi e percentuale di mammelle sporche. In un precedente lavoro (Bava *et al.*, 2008) condotto su 10 stalle lombarde si erano ottenuti coefficienti di correlazione più elevati: in particolare tra punteggi delle mammelle e punteggi dei fianchi di 0,89 e tra punteggi delle mammelle e punteggi degli arti di 0,88.

Figura 6 - Relazione tra percentuali di fianchi e arti sporchi (punteggi 3 e 4) e percentuale di mammelle sporche



La pulizia della mammella all'entrata in mungitura ha dimostrato di avere un effetto importante nei confronti della qualità microbiologica del latte. Quando più del 15% dei capi in mungitura ha ricevuto un punteggio superiore o uguale a 3 per la mammella (tabella 5) si sono avuti valori significativamente più alti di CBS, coliformi e psicrotrofi nel latte rispetto a quanto si è registrato con meno del 15% di mammelle sporche. Il contenuto di batteri termodurici del latte invece ha confermato di essere poco correlato con la pulizia degli animali.

Come era da attendersi la pulizia della mammella è risultata in relazione con la sanità della mammella stessa: con mammelle più pulite il numero di cellule somatiche è risultato significativamente più basso. Il livello di contaminazione dei campioni di acqua e dei tamponi effettuati sull'impianto di mungitura (guaine e vasi terminali) non è invece risultato influenzato dalla pulizia delle mammelle. La CBS dei capezzoli, pur risultando superiore nel caso di elevata percentuale di mammelle sporche, non ha mostrato differenze statisticamente significative. Non si sono evidenziate differenze in merito alla carica di *S. aureus* su capezzoli e guaine.

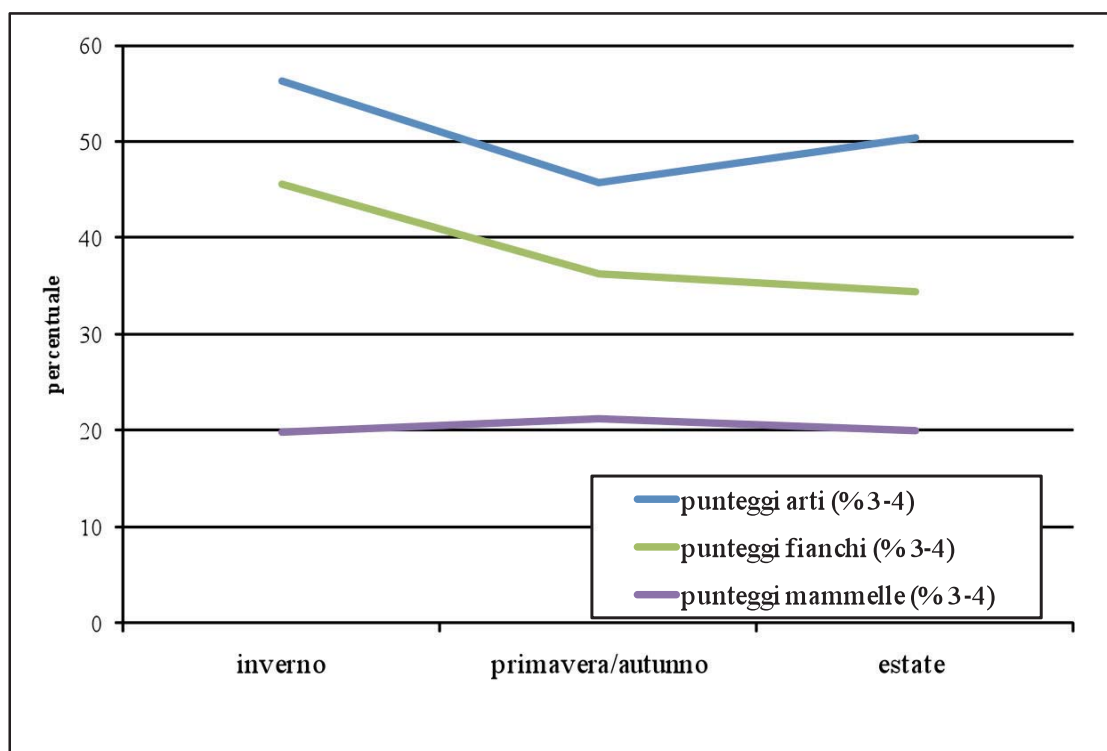
Per quanto riguarda l'effetto stagionale sulla pulizia degli animali, la percentuale di mammelle con punteggi 3 e 4 è risultata poco influenzata dalla stagione mentre arti e fianchi hanno mostrato maggiore variabilità (figura 7).

Tabella 5 - Effetto della pulizia delle mammelle sulle caratteristiche microbiologiche del latte ( $\log_{10}$  UFC/mL), dei tamponi effettuati sui capezzoli ( $\log_{10}$  UFC/sup. campionata) e sulle cellule somatiche del latte (LS)

Campione	Parametro	< 15% mammelle 3-4 n=32	≥15% mammelle 3-4 n=33	ES	P
	Punteggi fianchi (% di 3-4)	26,2	47,9	2,95	****
	Punteggi arti (% di 3-4)	36,3	60,3	3,25	****
	Punteggi mammelle (% di 3-4)	5,9	29,8	3,33	****
Latte	CBS	<b>3,87</b>	<b>4,06</b>	0,06	*
Latte	Coliformi	<b>1,87</b>	<b>2,06</b>	0,13	*
Latte	<i>E. coli</i>	<b>1,02</b>	<b>1,05</b>	0,05	
Latte	Termodurici	<b>2,39</b>	<b>2,51</b>	0,06	
Latte	Psicrotrofi	<b>3,41</b>	<b>3,75</b>	0,09	**
Latte	Cellule somatiche	<b>4,01</b>	<b>4,34</b>	0,12	*
Guaine	CBS	<b>3,53</b>	<b>3,82</b>	0,17	
Vaso terminale	CBS	<b>2,97</b>	<b>3,31</b>	0,23	
Capezzoli	CBS	<b>5,18</b>	<b>5,40</b>	0,10	

\*=P<0,05; \*\*=P<0,01; \*\*\*\*=P<0,001

Figura 7 - Effetto della stagione sulla pulizia degli animali



L'inverno è risultata la stagione in cui si è registrata la maggior percentuale di animali con fianchi e arti sporchi o molto sporchi (45,6 e 56,3%, rispettivamente): in particolare la percentuale di fianchi sporchi è risultata significativamente ( $P < 0,05$ ) più elevata d'inverno rispetto alla primavera e all'estate. La motivazione di tali differenze è probabilmente da ricercare nella maggiore difficoltà che si incontra nel mantenere pulite e asciutte le stalle, soprattutto a livello di paddock e corsie, in condizioni di pioggia, neve e basse temperature. Il fatto che il livello di pulizia delle mammelle sia rimasto invece sostanzialmente invariato nelle 3 stagioni suggerisce che la buona manutenzione delle aree di riposo (in particolare le cuccette) possa consentire anche durante l'inverno di evitare un eccessivo imbrattamento delle mammelle.

Nella maggior parte delle aziende con stabulazione libera a cuccette (che erano 17 sulle 22 totali), il fondo della cuccetta era rappresentato semplicemente da cemento o mattoni (71%) mentre nei rimanenti casi erano presenti materassini o tappetini in materiale sintetico. I materiali da lettiera utilizzati nelle cuccette erano principalmente paglia (47%) e segatura (35%); in una sola azienda si impiegava sabbia, in una stocchi di mais e infine in un'azienda non si usava lettiera ma solo il tappetino in gomma. Nel caso delle stalle con lettiera permanente (5 su 22), il materiale di lettiera nelle aree destinate alle bovine in lattazione era sempre rappresentato da paglia. Nelle stalle con cuccette, il numero di cuccette, tranne che in un solo caso, è sempre risultato uguale o superiore al numero di capi presenti (in media 1,2 cuccette per capo); non vi erano quindi condizioni di sovraffollamento dei ricoveri.

La valutazione del grado di pulizia delle cuccette e della lettiera permanente è stata effettuata attraverso l'attribuzione di un punteggio. Per valutare la pulizia delle cuccette è stata utilizzata una scala su 3 livelli in funzione della presenza di deiezioni in cuccetta: da 1 (cuccetta priva di residui fecali) a 3 (cuccetta con presenza abbondante di feci). Per le stalle con lettiera permanente invece è stato dato un giudizio complessivo sulla pulizia della lettiera da 1 a 3 per lettiera pulita, mediocre e sporca, rispettivamente. Sono state classificate nel gruppo "lettiera pulita" 9 aziende a cui non è mai stato assegnato il punteggio di 3 per la lettiera (delle cuccette o del box) in nessuna delle 3 visite. Le 13 aziende rimanenti sono state incluse nel gruppo "lettiera sporca".

Confrontando i risultati microbiologici delle aziende classificate in questo modo (tabella 6) si può notare come la pulizia degli animali, espressa come percentuale di punteggi 3 e 4 assegnati a fianchi, arti e mammelle, sia risultata fortemente influenzata dalla pulizia della lettiera. La pulizia della lettiera ha influito sensibilmente anche sulla contaminazione del latte, delle superfici dell'impianto di mungitura e dei capezzoli con differenze significative in termini di CBS, batteri

termodurici e psicrotrofi del latte, termodurici ed *Escherichia coli* delle guaine, coliformi del vaso terminale e carica batterica della superficie del capezzolo. Altri autori hanno messo in evidenza l'importanza della pulizia delle lettiera nei riguardi della contaminazione batterica del latte (Kelly *et al.*, 2009).

Le condizioni igieniche della lettiera hanno mostrato un effetto altamente significativo sulle cellule somatiche del latte, a sottolineare l'importanza dell'igiene ambientale nella prevenzione delle mastiti. Non si sono notate invece differenze in termini di *S. aureus* su capezzoli e guaine; il risultato non sorprende in quanto *S. aureus* è un patogeno contagioso che non vive nell'ambiente.

Tabella 6 - Effetto della pulizia della lettiera sulla pulizia degli animali, sulle caratteristiche microbiologiche del latte ( $\log_{10}$  UFC/mL), dei tamponi effettuati su guaine, vaso terminale e capezzoli ( $\log_{10}$  UFC/sup. campionata) e sulle cellule somatiche del latte (LS)

Campione	Parametro	Pulizia lettiera		ES	P
		pulita n=27	sporca n=39		
	Punteggi fianchi (% di 3-4)	25,5	47,9	2,87	***
	Punteggi arti (% di 3-4)	30,6	64,7	4,00	***
	Punteggi mammelle (% di 3-4)	9,9	27,6	3,03	***
Latte	CBS	<b>3,82</b>	<b>4,15</b>	0,06	***
Latte	coliformi	<b>1,85</b>	<b>2,10</b>	0,12	
Latte	<i>E. coli</i>	<b>1,02</b>	<b>1,08</b>	0,05	
Latte	termodurici	<b>2,28</b>	<b>2,52</b>	0,08	*
Latte	psicrotrofi	<b>3,50</b>	<b>3,77</b>	0,10	*
Latte	cellule somatiche	<b>3,78</b>	<b>4,66</b>	0,10	***
Guaine	CBS	<b>3,47</b>	<b>3,84</b>	0,15	
Guaine	coliformi	<b>0,53</b>	<b>0,65</b>	0,06	
Guaine	<i>E. coli</i>	<b>0,34</b>	<b>0,49</b>	0,05	*
Guaine	termodurici	<b>1,81</b>	<b>2,13</b>	0,10	*
Guaine	psicrotrofi	<b>2,84</b>	<b>3,20</b>	0,18	
Vaso terminale	CBS	<b>3,03</b>	<b>3,33</b>	0,22	
Vaso terminale	coliformi	<b>0,40</b>	<b>0,71</b>	0,10	*
Capezzoli	CBS	<b>5,05</b>	<b>5,53</b>	0,09	***

\*=P<0,05; \*\*=P<0,01; \*\*\*=P<0,001

## 8.7. Igiene in mungitura

Nelle 22 aziende del campione la *routine* di mungitura, ossia l'insieme di operazioni che vengono eseguite prima, durante e dopo la mungitura, è risultata piuttosto diversificata (figura 8): il post-dipping, cioè la disinfezione dei capezzoli dopo la mungitura, è risultata una pratica abbastanza

diffusa (73% delle aziende), il pre-dipping, cioè la disinfezione prima della mungitura, era eseguito meno frequentemente (46%) mentre l'eliminazione manuale dei primi getti di latte, prima dell'attacco del gruppo, veniva effettuata nel 59% delle aziende. Tre aziende si limitavano a pulire i capezzoli con acqua, 5 aziende impiegavano fazzoletti a secco mentre 2 aziende non effettuavano alcuna operazione.

Tutte le operazioni alla mungitura hanno mostrato effetti importanti su quasi tutti i parametri microbiologici controllati, sia a livello di latte che a livello di impianto di mungitura e di capezzoli. Anche l'effetto sulle cellule somatiche del latte è risultato altamente significativo. La valutazione dell'effetto e dell'importanza relativa delle diverse operazioni alla mungitura nei confronti della qualità igienica del latte è stata complicata dalla ridotta numerosità del campione studiato e dalla presenza contemporanea nelle stesse aziende di più operazioni, come è possibile ricavare dalla tabella 7 in cui è riportata la distribuzione nel campione delle 3 operazioni principali.

Figura 8 - Percentuale di aziende del campione che eseguivano le diverse operazioni in mungitura

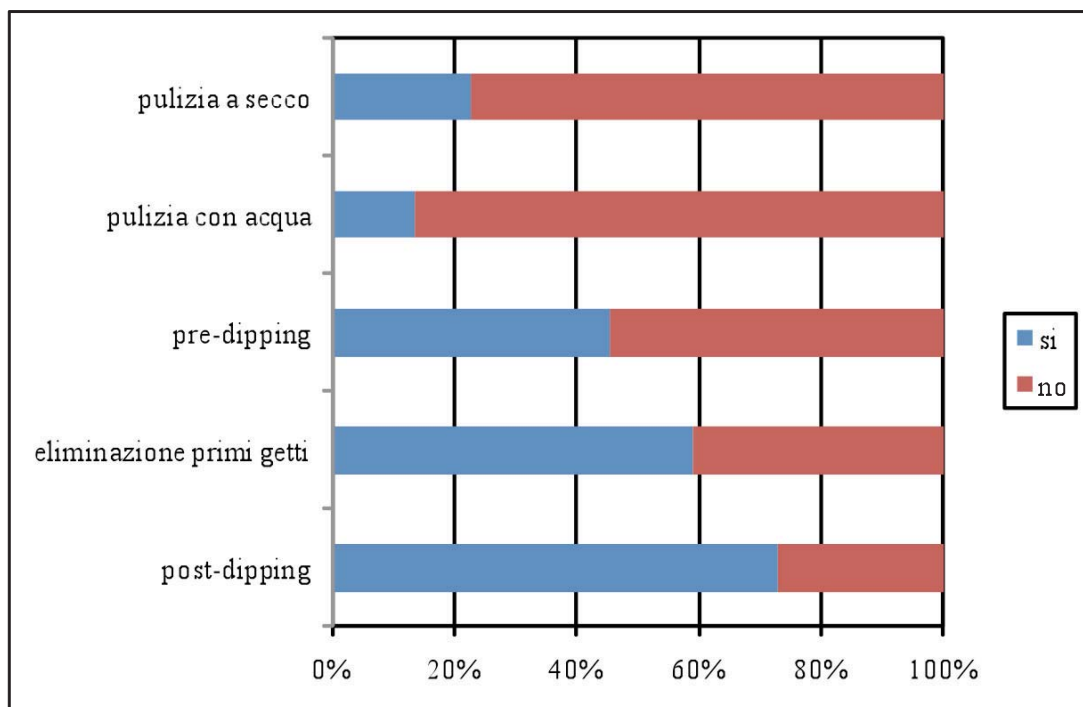


Tabella 7 - Distribuzione delle 3 principali operazioni alla mungitura nelle 22 aziende

	Totale aziende	Eliminazione getti	Pre-dipping	Post-dipping
<b>Nessuna operazione</b>	3	0	0	0
<b>Una operazione</b>	7	1	1	5
<b>Due o più operazioni</b>	12	12	9	11

Nella tabella 8 vengono riportati gli effetti dell'adozione del pre-dipping sulla qualità microbiologica del latte e sulla contaminazione di capezzoli, guaine e vaso terminale. Il latte delle aziende con pre-dipping è risultato significativamente meno contaminato in termini di CBS, batteri termodurici e psicrotrofi; la CBS, in particolare, è risultata di 3,75 con pre-dipping contro 4,23 log<sub>10</sub> UFC/mL senza pre-dipping, pari a 5600 e 17.000 UFC/mL, rispettivamente, con un abbattimento pari a circa il 67%. Inoltre con l'esecuzione del pre-dipping si è osservata una riduzione significativa della CBS sui tamponi effettuati sui capezzoli a conferma dell'efficacia di tale trattamento nella riduzione della carica batterica del capezzolo. Questi risultati sono in accordo con quanto riportato da molti autori (Galton *et al.*, 1982; Gibson *et al.*, 2008) anche se, come si è già ricordato, i prodotti per il pre-dipping commercializzati in Italia tendono ad avere un'azione più detergente che disinfettante; nonostante ciò l'uso del pre-dipping sembra comunque in grado di abbassare significativamente la carica microbica sulla superficie dei capezzoli con effetti positivi sulla qualità microbiologica del latte.

Tabella 8 - Effetto del pre-dipping sulle caratteristiche microbiologiche del latte (log<sub>10</sub> UFC/mL), dei tamponi effettuati su guaine, vaso terminale e capezzoli (log<sub>10</sub> UFC/sup. campionata) e sulle cellule somatiche del latte (LS)

Campione	Parametro	Pre-dipping		ES	P
		no n=36	si n=30		
Latte	CBS	4,23	3,75	0,06	****
Latte	Coliformi	2,14	1,84	0,11	
Latte	<i>E. coli</i>	1,09	1,01	0,05	
Latte	Termodurici	2,56	2,26	0,08	**
Latte	Psicrotrofi	3,88	3,40	0,09	****
Latte	Cellule som.	4,89	3,59	0,10	****
Guaine	CBS	3,92	3,41	0,14	**
Guaine	<i>S. aureus</i>	0,14	0,11	0,06	
Vaso terminale	CBS	3,65	2,67	0,20	****
Capezzoli	CBS	5,67	4,92	0,08	****
Capezzoli	<i>S. aureus</i>	3,08	3,01	0,03	

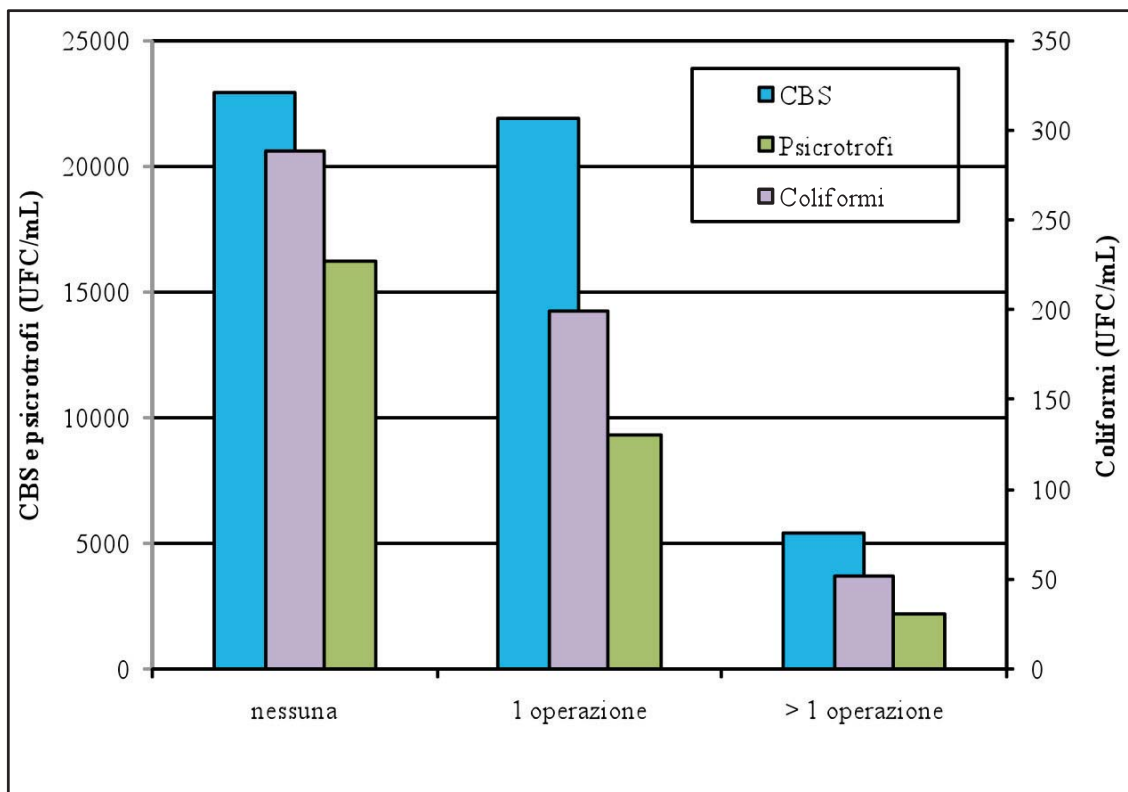
\*=P<0,05; \*\*=P<0,01; \*\*\*=P<0,001

Il pre-dipping ha mostrato un effetto importante anche sul Linear Score che è risultato significativamente più basso nelle aziende che attuavano tale operazione (3,59 contro 4,89); traducendo i valori di LS in cellule somatiche risulta una riduzione del 59%, da circa 371.000 a

151.000 cellule/mL. Con il pre-dipping si è abbassata anche la contaminazione batterica delle guaine e del vaso terminale. Nessuna differenza è emersa invece in termini di valori di *S. aureus* sia sui capezzoli che sulle guaine.

Gli ottimi risultati del pre-dipping vanno valutati con attenzione in quanto, come già ricordato, a causa della ridotta dimensione del campione e della sovrapposizione tra diverse operazioni alla mungitura (pre-dipping, eliminazione dei primi getti e post-dipping) una parte degli effetti positivi evidenziati per il pre-dipping possono essere dovuti alla contemporanea presenza di altre operazioni. Valutando nel loro insieme tutte e tre le principali operazioni eseguite (pre-dipping, eliminazione dei primi getti e post-dipping) si è visto che, rispetto alle aziende che non eseguivano alcuna delle tre operazioni, le aziende che adottavano 2 o più di tali operazioni alla mungitura hanno fatto registrare valori significativamente più bassi di carica batterica sui capezzoli e di carica batterica del latte ( $P < 0,001$ ). Nella figura 9 si può osservare come l'adozione di 2 o più operazioni alla mungitura abbia consentito un abbattimento della CBS sul capezzolo dell'85% circa (da 780.000 a 110.000 UFC) e della CBS del latte del 76% circa (da 23.000 a 5400 UFC/mL) rispetto all'ipotesi di nessuna operazione.

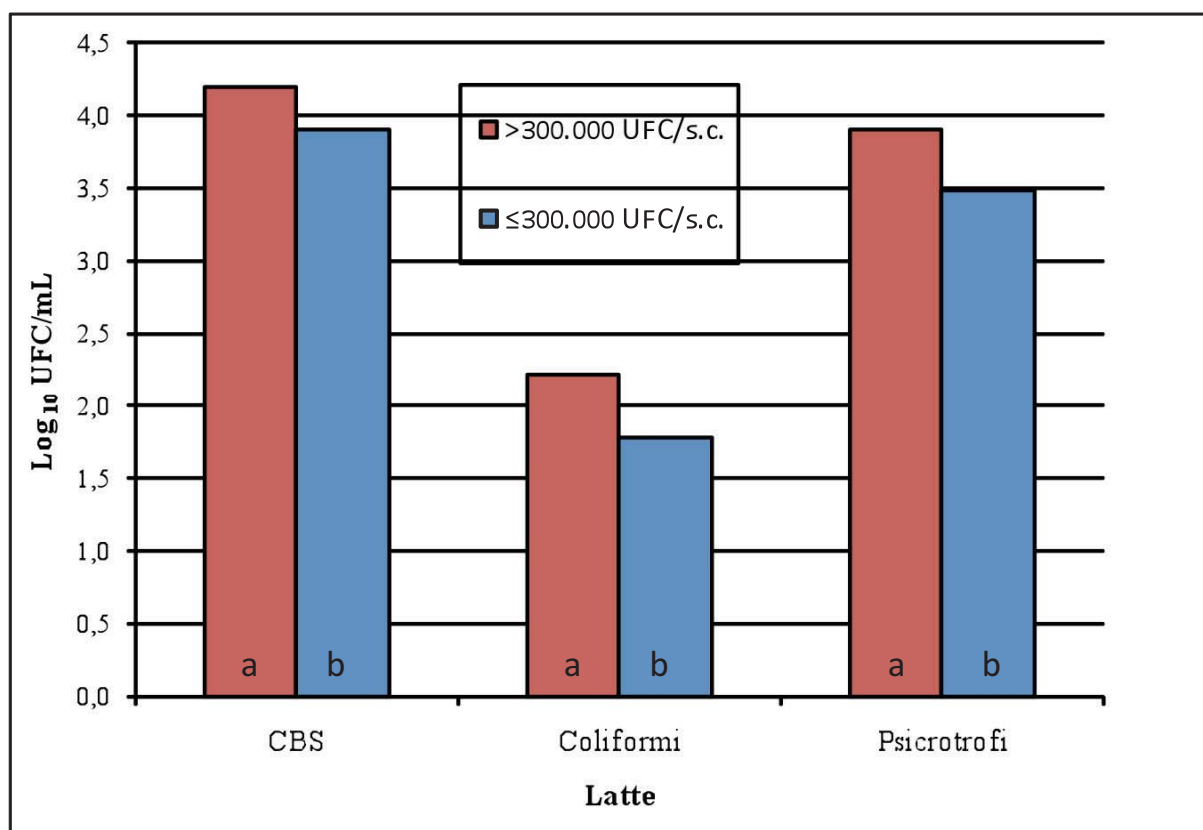
Figura 9 - Caratteristiche microbiologiche del latte (UFC/mL) in funzione del numero di operazioni effettuate alla mungitura (pre-dipping, eliminazione dei primi getti e post-dipping)





Per quanto riguarda la relazione tra la carica batterica dei capezzoli, dopo le operazioni di pulizia dei capezzoli stessi e prima dell'attacco del gruppo, e le caratteristiche microbiologiche del latte (figura 10), è emerso che, con CBS del capezzolo superiore a 300.000 UFC (su una superficie campionata rappresentata dall'intero capezzolo), le caratteristiche microbiologiche del latte sono risultate significativamente peggiori in termini di CBS, coliformi e psicrotrofi rispetto alla situazione di carica del capezzolo inferiore o uguale a 300.000 UFC/sup. campionata: la CBS del latte passa infatti da 3,90 a 4,20  $\log_{10}$  UFC/mL pari a circa 8000 a 15800 UFC/mL, rispettivamente. Le aziende con elevata carica sui capezzoli hanno fatto registrare una percentuale di mammelle sporche o molto sporche all'entrata in sala di mungitura significativamente superiore all'altro gruppo (25% contro 12,7%;  $P < 0,05$ ); inoltre la percentuale di aziende che eseguivano il pre-dipping nei due gruppi era rispettivamente 36,9% e 9,23% per il gruppo con CBS dei capezzoli più bassa e per quello con CBS dei capezzoli più alta.

Figura 10 - Effetto della carica batterica dei capezzoli (CBS/sup. campionata) sulle caratteristiche microbiologiche del latte ( $\log_{10}$  UFC/mL)



Le classi con lettere differenti differiscono significativamente almeno per  $P < 0,05$

## 8.8. Lavaggio dell'impianto di mungitura

Nel corso di ciascuna visita aziendale è stato monitorato il lavaggio dell'impianto al termine della mungitura mediante l'impiego di flussometri elettronici (Lactocorder®). In 8 aziende su 22 il lavaggio dell'impianto di mungitura veniva effettuato in modo manuale, riempiendo una vasca di acqua e introducendo il detergente, dosato con un misurino. In questa tipologia di lavaggio è la persona addetta a tale operazione a decidere quando introdurre acqua calda nell'impianto, in quale quantità e a quale temperatura. Analogo discorso vale per l'aggiunta di detergente. Il lavaggio manuale, ancora diffuso nelle aziende di piccole dimensioni, è difficilmente standardizzabile e la sua efficacia può non essere costante. Inoltre nel lavaggio manuale, e spesso anche in quello automatico, la turbolenza non può essere regolata in maniera precisa: l'immissione di aria infatti non è effettuata con un iniettore ma viene ottenuta quando si riduce il livello dell'acqua nella vasca, con l'entrata attraverso lo scarico di una quantità di aria non controllata. Dalle curve di lavaggio registrate nel corso delle tre visite aziendali sono stati ottenuti i valori medi riportati in tabella 9.

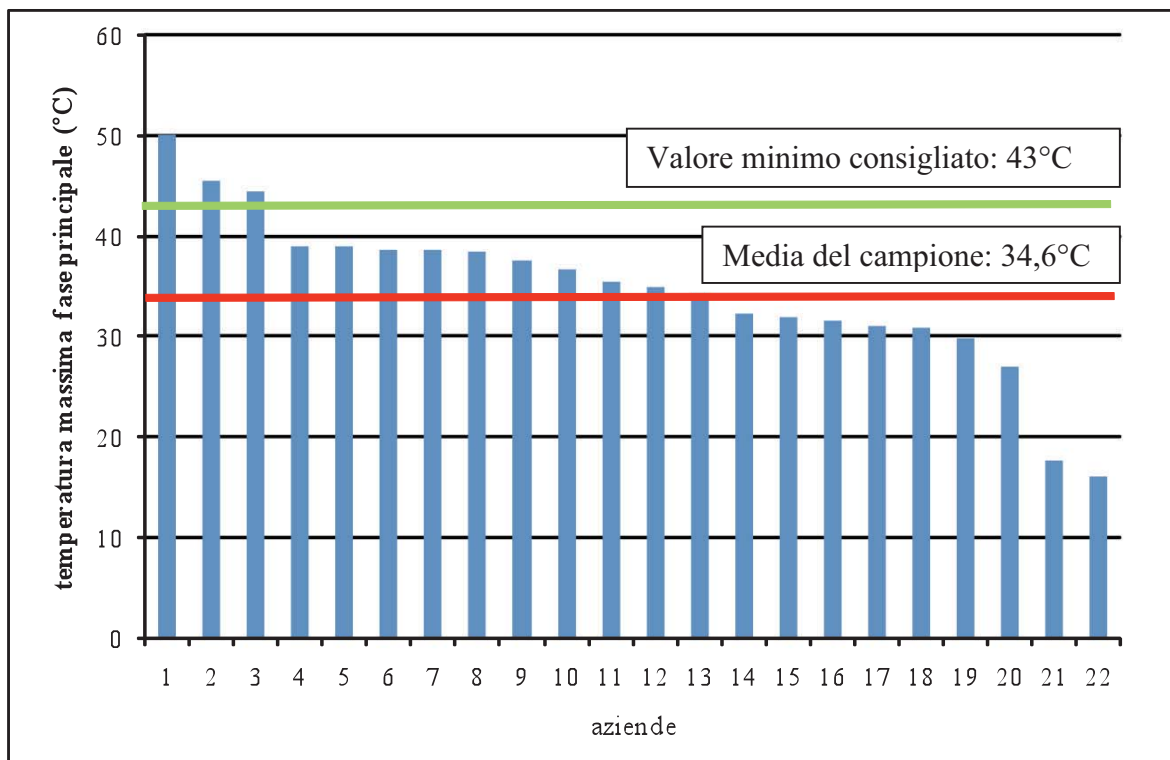
Tabella 9 - Medie dei parametri del lavaggio degli impianti di mungitura

		Media	DS	Minimo	Massimo
<i>Pre-risciacquo (n=45)</i>					
Durata	<i>min</i>	<b>6,1</b>	2,7	1,7	15,0
Conducibilità elettrica	<i>mS/cm</i>	<b>0,39</b>	0,94	0,04	5,96
Temperatura massima	<i>°C</i>	<b>21,4</b>	8,2	8,0	38,0
Riempimento	<i>%</i>	<b>67,0</b>	21,5	8,0	98,0
Turbolenza	<i>%</i>	<b>12,5</b>	6,9	0,0	30,0
<i>Lavaggio principale (n=65)</i>					
Durata	<i>min</i>	<b>17,4</b>	5,8	5,3	32,1
Conducibilità elettrica	<i>mS/cm</i>	<b>4,10</b>	1,84	0,34	8,77
Temperatura massima	<i>°C</i>	<b>34,6</b>	9,1	10,0	55,7
Riempimento	<i>%</i>	<b>64,3</b>	18,4	10,0	96,0
Turbolenza	<i>%</i>	<b>24,6</b>	13,9	1,0	81,7
<i>Post-risciacquo (n=30)</i>					
Durata	<i>min</i>	<b>4,8</b>	2,3	2,4	9,6
Conducibilità elettrica	<i>mS/cm</i>	<b>0,31</b>	0,25	0,04	0,80
Temperatura massima	<i>°C</i>	<b>20,0</b>	5,1	11,5	34,5
Riempimento	<i>%</i>	<b>65,1</b>	26,4	5,0	98,0
Turbolenza	<i>%</i>	<b>10,9</b>	8,5	0,0	39,5

E' possibile notare che non tutte le registrazioni effettuate avevano le fasi di risciacquo; questo perché, come è spiegato in Appendice, in molti casi non è stato possibile ottenere una separazione tra le fasi, non essendosi verificata un'interruzione del flusso di acqua. Per quanto riguarda la fase di pre-risciacquo si può rilevare un valore di temperatura massima dell'acqua piuttosto basso, pari a 21,4°C; tale valore si pone ben al di sotto delle temperature suggerite da Reinemann *et al.* (2000) per questa fase che dovrebbero essere comprese tra 38 e 55°C. Riguardo alla durata del pre-risciacquo si sono registrati valori molto variabili: da una durata inferiore ai 2 min, sulla cui efficacia e utilità si può avanzare qualche dubbio, fino a valori decisamente elevati di 15 min.

Per quanto riguarda la fase principale di lavaggio, quella con il detergente, il punto critico che risulta subito evidente è la temperatura massima dell'acqua che si è attestata sul valore di soli 34,6°C ( $\pm 9,1$ ). Secondo Reinemann *et al.* (2000) la temperatura di azione ottimale della maggior parte dei detergenti, per garantire un'adeguata rimozione di residui organici (grasso e proteine) e sali, sarebbe compresa tra 43 e 77°C. La temperatura massima di lavaggio è risultata significativamente diversa nelle 3 stagioni: 37,2°C in estate, 35,0°C nella stagione intermedia (autunno/primavera) e 31,6°C in inverno. Il fenomeno è dovuto alla dispersione di calore durante l'inverno nel contatto dell'acqua con le tubazioni di acciaio e contribuisce ad aggravare il problema della bassa temperatura dell'acqua, riducendo ulteriormente l'efficacia del lavaggio.

Figura 11 - Temperatura massima della fase di lavaggio principale nelle 22 aziende



Per questo è importante che la progettazione degli ambienti preveda, oltre ad una opportuna coibentazione delle tubazioni, il posizionamento del sistema di riscaldamento dell'acqua in prossimità della sala di mungitura, al fine di minimizzare il percorso dell'acqua. Nello studio effettuato sono state evidenziate realtà molto diverse, come mostrato nella figura 11; la variabilità tra aziende, relativamente alla temperatura di lavaggio, è abbastanza rilevante. Si possono notare alcune situazioni in cui la temperatura massima non arriva ai 20°C.

La temperatura massima della soluzione detergente raggiunta durante la fase centrale del lavaggio è risultata correlata negativamente alla CBS del latte ( $r=-0,28$ ;  $P<0,05$ ). Nella tabella 10 viene riportato l'effetto della temperatura di lavaggio sulle caratteristiche microbiologiche del latte e sulle condizioni igieniche dell'impianto di mungitura. Una temperatura dell'acqua di lavaggio superiore o uguale a 35°C ha consentito di ottenere un latte di migliore qualità in termini di carica batterica standard e di contenuto in cellule somatiche. Simile tendenza è emersa anche per i diversi gruppi microbici, senza però che si evidenziassero differenze significative tra le due classi, probabilmente in conseguenza del fatto che, anche nelle aziende più virtuose ( $\geq 35$  °C), la temperatura di lavaggio era comunque troppo bassa. In un lavoro di Bava *et al.* (2009) che ha valutato l'effetto di una temperatura di lavaggio superiore a 40°C rispetto a temperature inferiori, si è potuta notare una differenza significativa in termini di contenuto in batteri coliformi nel latte, che è risultato inferiore nella classe di aziende con temperatura di lavaggio più elevata.

Per quanto riguarda l'effetto della temperatura massima di lavaggio sull'igiene dell'impianto (vaso terminale e guaine), appare evidente che a maggiore temperatura di lavaggio corrisponde una miglior pulizia dell'impianto. Sul vaso terminale si può notare una riduzione sia della CBS che dei diversi gruppi microbici, con acqua di lavaggio a temperatura maggiore, pur senza differenze significative. Per quanto riguarda l'igiene della superficie interna delle guaine, questa è risultata significativamente migliore con temperatura di lavaggio superiore; tale andamento era stato rilevato anche nel lavoro di Bava *et al.* (2009). La temperatura massima della soluzione detergente è risultata correlata negativamente con la CBS e con i coliformi dei tamponi effettuati sulle guaine dell'impianto (rispettivamente:  $r=-0,27$ ;  $P<0,05$  e  $r=-0,32$ ;  $P<0,01$ ).

La qualità microbiologica dell'acqua di risciacquo è indice dell'adeguatezza del lavaggio e del risciacquo stesso dell'impianto di mungitura. Nella tabella 10 si può notare una diminuzione sia della CBS che dei batteri psicotrofi nell'acqua di risciacquo, con maggiori temperature di lavaggio.

Tabella 10 - Effetto della temperatura massima di lavaggio sulle caratteristiche microbiologiche del latte, dell'acqua di risciacquo ( $\log_{10}$  UFC/mL), dei tamponi effettuati su guaine e vaso terminale ( $\log_{10}$  UFC/sup. campionata) e sulle cellule somatiche (LS)

Campione	Parametro	Temperatura massima di lavaggio		ES	P
		<35 °C n=29	≥35°C n=36		
	Temp. max lavaggio (°C)	27,7	40,0	0,72	***
Latte	CBS	4,12	3,93	0,07	*
Latte	coliformi	2,18	1,91	0,13	
Latte	<i>E. coli</i>	1,07	1,03	0,06	
Latte	termo durici	2,50	2,33	0,09	
Latte	psicrotrofi	3,86	3,57	0,12	
Latte	cellule somatiche	4,50	3,99	0,11	***
Guaine	CBS	3,97	3,5	0,15	*
Guaine	coliformi	0,80	0,46	0,07	***
Guaine	<i>E. coli</i>	0,50	0,34	0,05	*
Guaine	termo durici	2,20	1,77	0,12	*
Guaine	psicrotrofi	3,42	2,90	0,19	
Guaine	<i>S. aureus</i>	0,14	0,11	0,08	
Vaso terminale	CBS	3,28	3,19	0,23	
Vaso terminale	coliformi	0,63	0,50	0,12	
Vaso terminale	<i>E. coli</i>	0,38	0,32	0,05	
Vaso terminale	termo durici	1,82	1,58	0,10	
Vaso terminale	psicrotrofi	2,69	2,44	0,25	
Acqua risciacquo	CBS	2,81	2,20	0,14	***
Acqua risciacquo	coliformi	0,33	0,19	0,12	
Acqua risciacquo	<i>E. coli</i>	0,03	0,03	0,04	
Acqua risciacquo	termo durici	1,45	1,24	0,12	
Acqua risciacquo	psicrotrofi	1,94	1,24	0,16	**

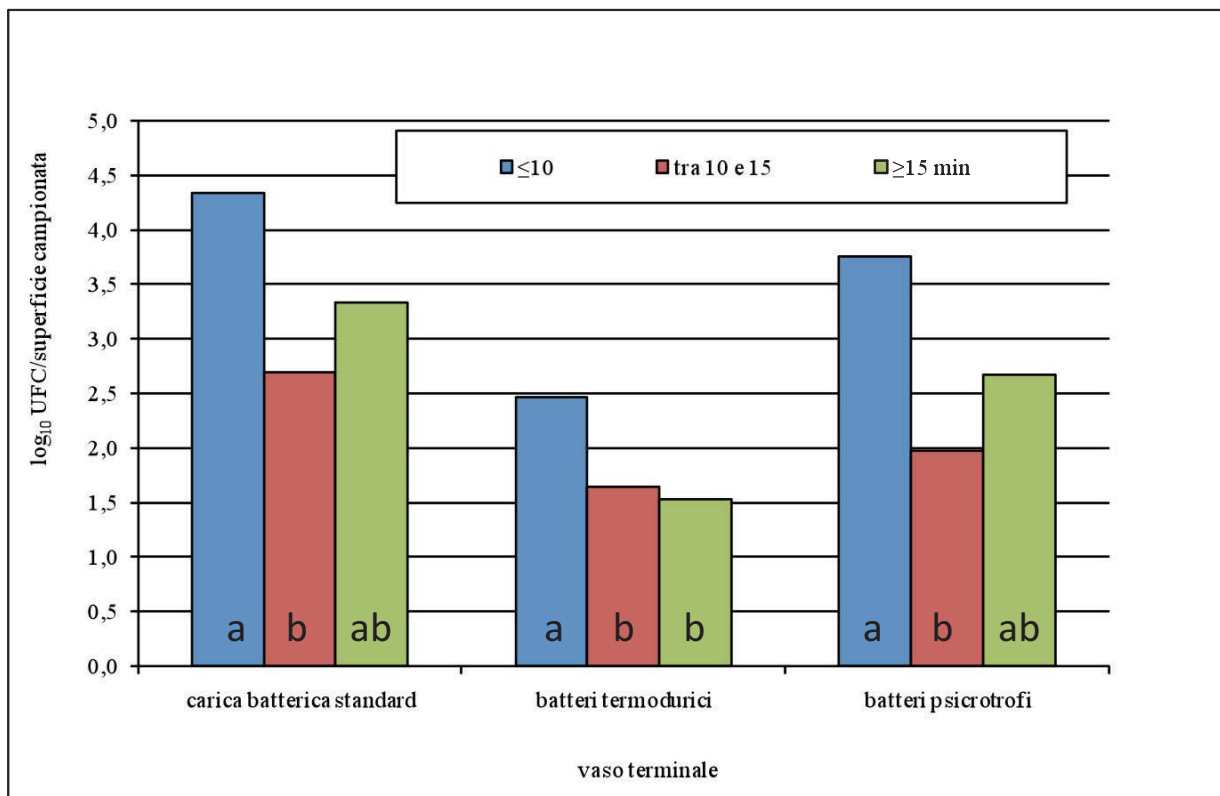
\*=P<0,05; \*\*=P<0,01; \*\*\*=P<0,001

La durata della fase principale di lavaggio con acqua calda e detergente è un altro fattore importante per la buona riuscita del lavaggio; nel nostro studio è stata mediamente pari a 17,4±5,8 min con punte massime di 32,1 min. Tali valori sono superiori a quelli registrati da Bava *et al.* (2009). Nelle figure 12 e 13 sono riportati, rispettivamente, gli effetti della durata della fase di lavaggio (divisa in 3 classi: ≤10 min; tra 10-15min; ≥15 min) sull'igiene del vaso terminale e sulle caratteristiche microbiologiche del latte. Innanzitutto si può notare che non sono state riscontrate differenze significative tra la seconda e la terza classe (ad eccezione della CBS del latte che è risultata di poco ma significativamente più bassa nel secondo gruppo rispetto al terzo); non c'è stato quindi un miglioramento nell'igiene dell'impianto o nella qualità microbiologica del latte prolungando la

durata del lavaggio oltre i 15 minuti. Questo risultato può dare un'indicazione pratica importante: è possibile evitare sprechi di energia e di tempo limitando a non più di 15 minuti la fase principale di lavaggio. Una durata inferiore ai 10 minuti ha portato invece ad un significativo peggioramento della pulizia del vaso terminale sia in termini di CBS, che di batteri termodurici e psicrotrofi. Anche la CBS nel latte è risultata significativamente più elevata quando la durata della fase di lavaggio è stata inferiore ai 10 minuti.

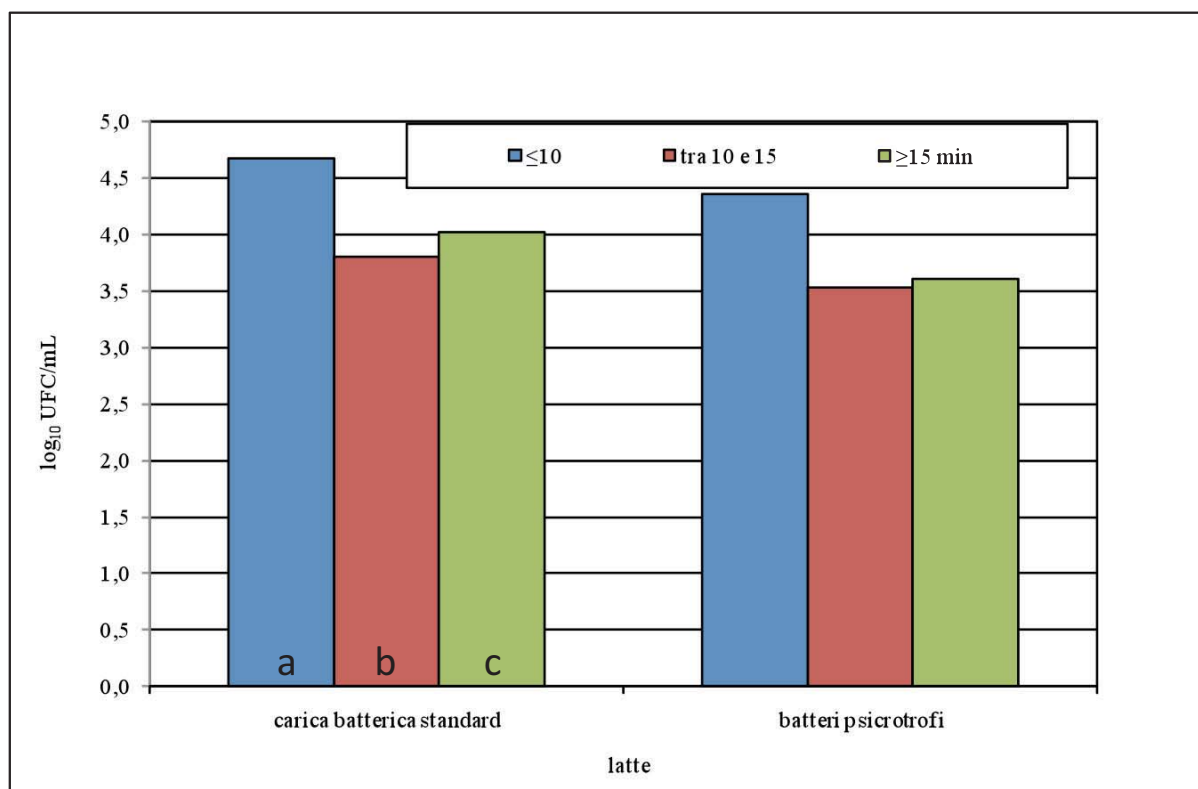
La tipologia e la quantità di detergente da utilizzare per il lavaggio dell'impianto rappresentano aspetti importanti poiché da un lato il detergente rappresenta una voce di costo per l'allevatore mentre d'altro canto si tratta di una delle variabili più facilmente modificabili dell'intero processo di lavaggio dell'impianto. È necessario prima di tutto fare una distinzione tra detergenti acidi e basici: i primi sono utilizzati, in genere con cadenza settimanale, per eliminare i residui inorganici (calcare, sali) che possono rimanere sulle superfici dell'impianto in modo più o meno consistente in base alla durezza dell'acqua utilizzata per il lavaggio.

Figura 12 - Effetto della durata della fase principale di lavaggio sull'igiene del vaso terminale



Le classi con lettere differenti differiscono significativamente almeno per  $P < 0,05$

Figura 13 - Effetto della durata della fase principale di lavaggio sulle caratteristiche microbiologiche del latte



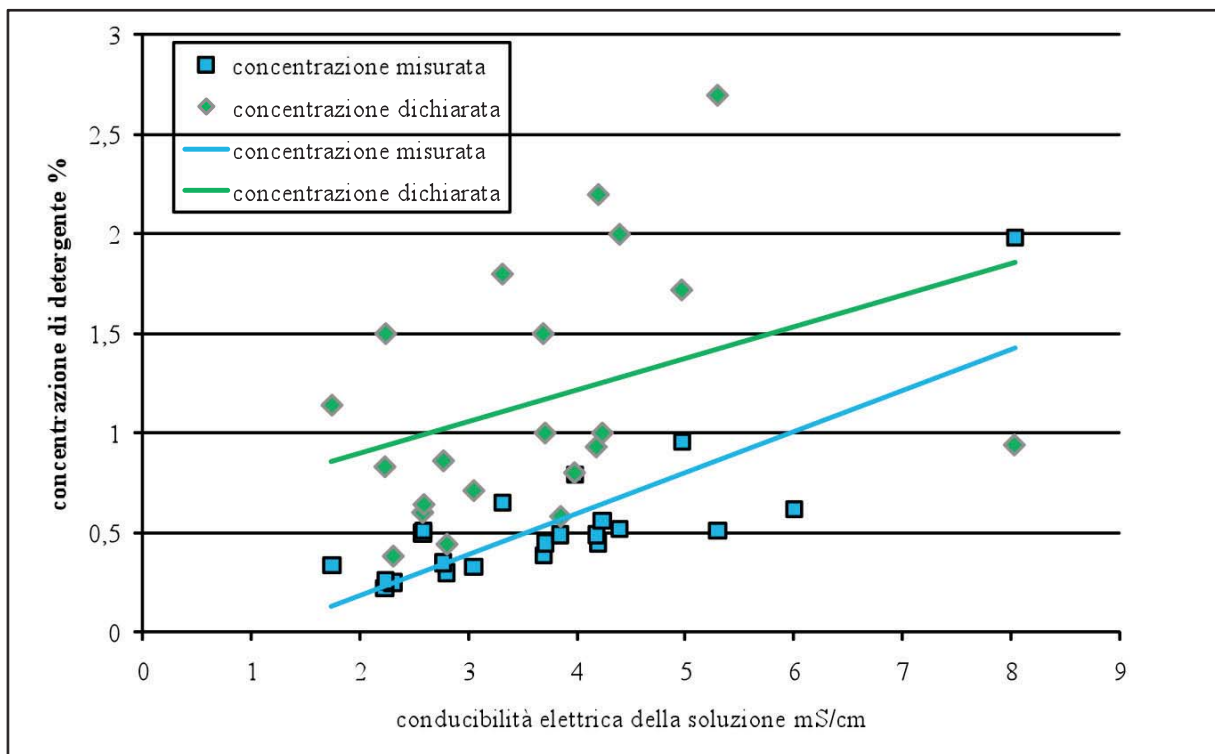
Le classi con lettere differenti differiscono significativamente almeno per  $P < 0,05$

I detergenti basici sono invece impiegati di *routine* al termine di ogni mungitura e hanno lo scopo di rimuovere i residui organici (grasso e proteine). I detergenti agiscono riducendo la tensione superficiale dell'acqua, così da permettere alla soluzione di bagnare e rimuovere i residui incrostati più facilmente. L'efficacia del detergente aumenta con l'incremento della temperatura dell'acqua e con la diminuzione della sua durezza (contenuto di ioni calcio). La durezza dell'acqua è stata valutata nelle aziende del campione utilizzando un test stick (Aquadur®; Macherey-Nagel) da immergere nell'acqua per 1 secondo: essa è risultata media (7-14°d) in 20 aziende ed elevata in 2.

Nel monitoraggio del lavaggio dell'impianto di mungitura, la concentrazione di detergente presente nella soluzione è stata misurata indirettamente attraverso la misurazione della conducibilità elettrica della soluzione circolante. Poiché tuttavia i detergenti contengono principi attivi differenti in concentrazioni diverse, analoghe quantità di detergenti possono determinare diversi valori di conducibilità elettrica della soluzione. Per studiare le relazioni tra questi parametri, e poter dare indicazioni pratiche, nel corso delle visite aziendali è stata campionata la soluzione di lavaggio e ne è stata misurata la conducibilità elettrica, utilizzando un conduttimetro, per poi risalire, mediante apposite curve di taratura costruite per i diversi prodotti, alla concentrazione reale del detergente.

Nella figura 14 i quadrati blu rappresentano, per ogni azienda, la corrispondenza tra conducibilità misurata con il Lactocorder e la concentrazione del detergente misurata nel modo descritto; i rombi verdi invece rappresentano le concentrazioni dichiarate dall'allevatore. I valori di concentrazione dichiarati risultano spesso molto distanti da quelli misurati, a sottolineare la scarsa consapevolezza delle quantità reali di acqua e detergente utilizzate per il lavaggio dell'impianto. Nel campione delle aziende monitorate il valore di conducibilità elettrica durante la fase di lavaggio con detergente è stato mediamente di  $4,10 \pm 1,84$  mS/cm; tale valore, secondo la relazione della figura 14 corrisponde ad una concentrazione di circa 0,5% in linea con quanto suggerito dalla maggior parte delle case produttrici di detersivi (0,5-1% per i detersivi a caldo; 2% per quelli a freddo).

Figura 14 - Relazione tra conducibilità elettrica della soluzione di lavaggio e concentrazione del detergente

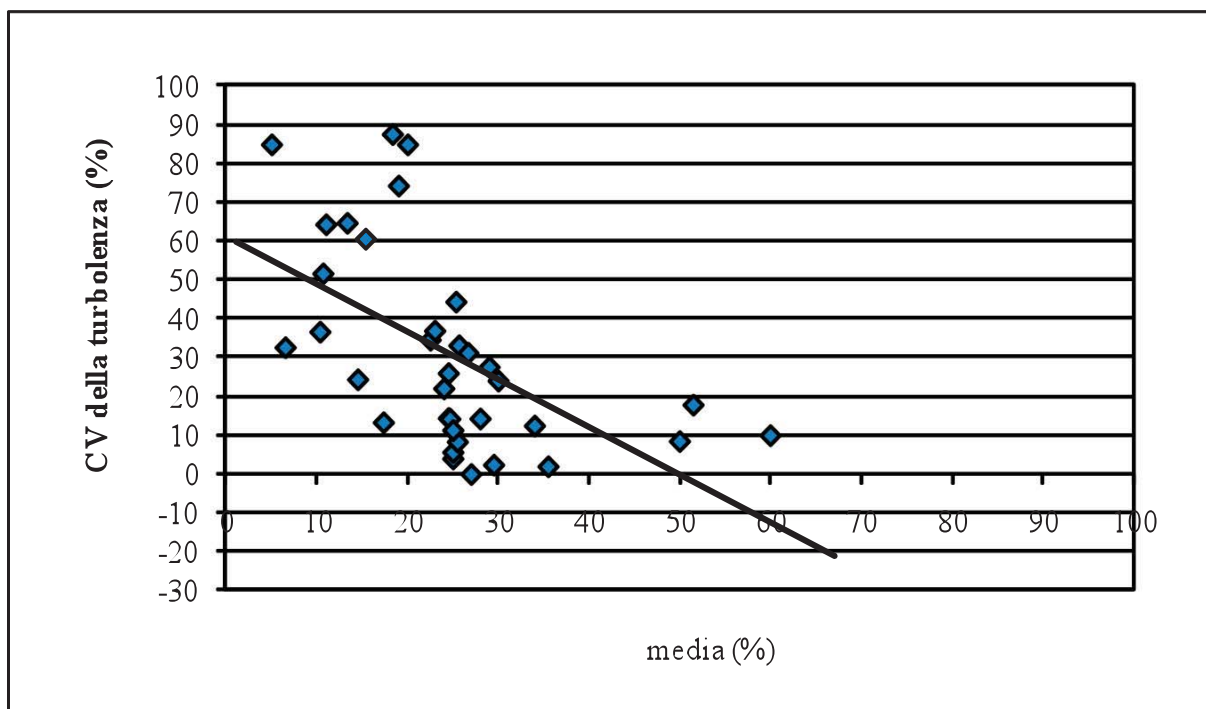


Per quanto riguarda gli altri parametri misurati nel monitoraggio del lavaggio dell'impianto, la turbolenza registrata nella fase principale di lavaggio è risultata compresa tra un minimo dell'1% e un massimo dell'82%; valori troppo bassi di questo parametro non permettono un'adeguata azione meccanica, necessaria per la rimozione dei residui di latte. Nel corso dello studio è stato possibile valutare, attraverso l'impiego contemporaneo di 2 (in qualche caso 3) flussometri elettronici in ogni sala, le variazioni della turbolenza nelle diverse postazioni della sala di mungitura. Può accadere



infatti che, a causa di anse, gomiti o tortuosità dei tubi, la soluzione di lavaggio non arrivi in modo uniforme in tutte le poste dell'impianto, provocando una scarsa igienizzazione di alcuni gruppi di mungitura. Per valutare queste variazioni tra postazioni è stato calcolato il coefficiente di variazione (CV) relativo alle diverse registrazioni effettuate nella stessa visita aziendale. Nella figura 15 è possibile notare che il CV per la turbolenza dell'acqua è risultato maggiore quando il valore medio di questo parametro è risultato basso; in altre parole, quando la turbolenza era insufficiente essa tendeva anche a non essere uniforme tra le postazioni.

Figura 15 - Coefficiente di variazione della turbolenza, in relazione alla media di questo parametro



## 8.9. Refrigerazione del latte

I termometri impiegati per il monitoraggio delle temperature dei tank di refrigerazione del latte restituiscono i dati sotto forma di grafici, di cui un esempio è visibile nella figura 16. L'analisi delle curve ha consentito di evidenziare la temperatura di stoccaggio del latte (A, registrata nel periodo di tempo compreso tra le due mungiture giornaliere), l'innalzamento di temperatura all'entrata del latte della prima mungitura nel tank vuoto (B) e l'innalzamento di temperatura del latte già stoccato all'arrivo del latte caldo appena munto in corrispondenza della successiva mungitura (C). E' possibile inoltre notare dei picchi più elevati che precedono il picco B corrispondenti al lavaggio del tank che avviene dopo ogni svuotamento. La temperatura media di stoccaggio del latte è stata nella

maggior parte delle osservazioni (83%) al di sotto dei 6°C (figura 17), rivelando come la maggior parte delle aziende considerate rispetti i limiti di legge.

Figura 16 - Variazione della temperatura del tank nel corso di 3 giorni consecutivi

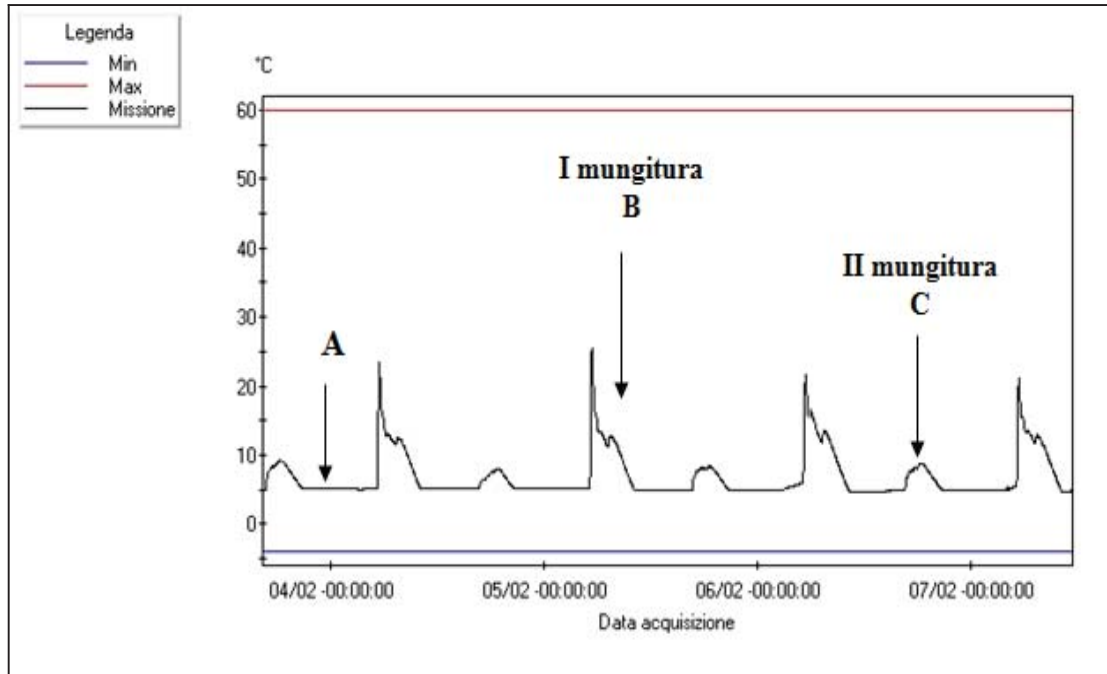
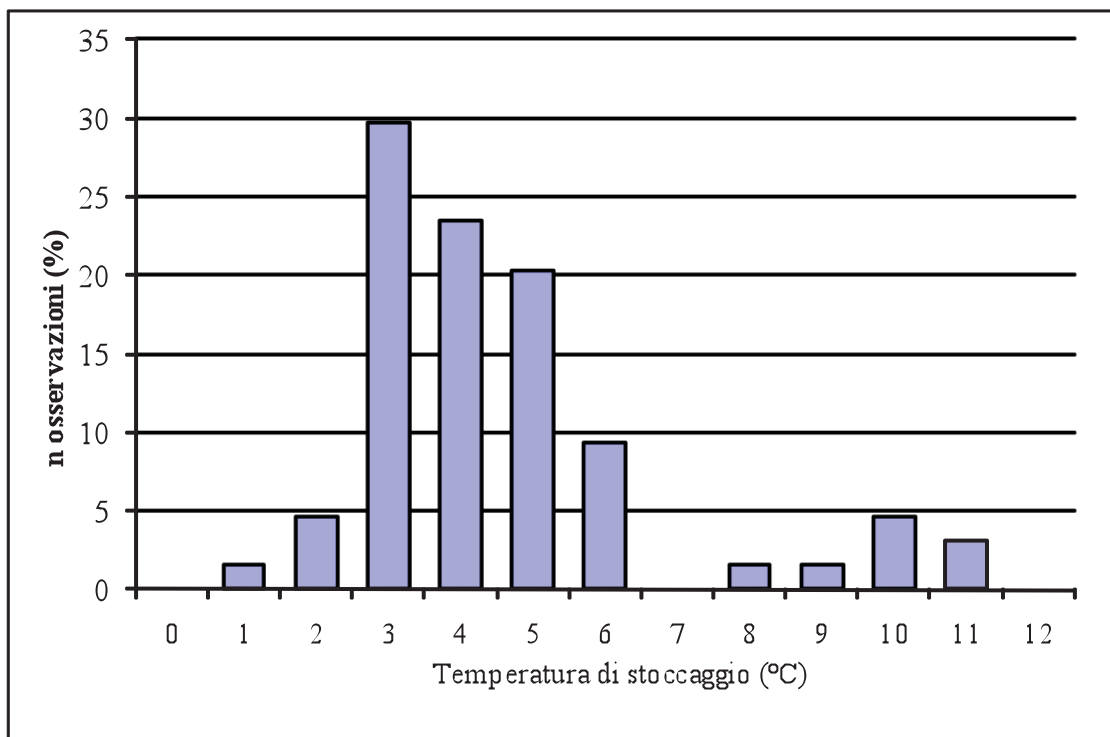
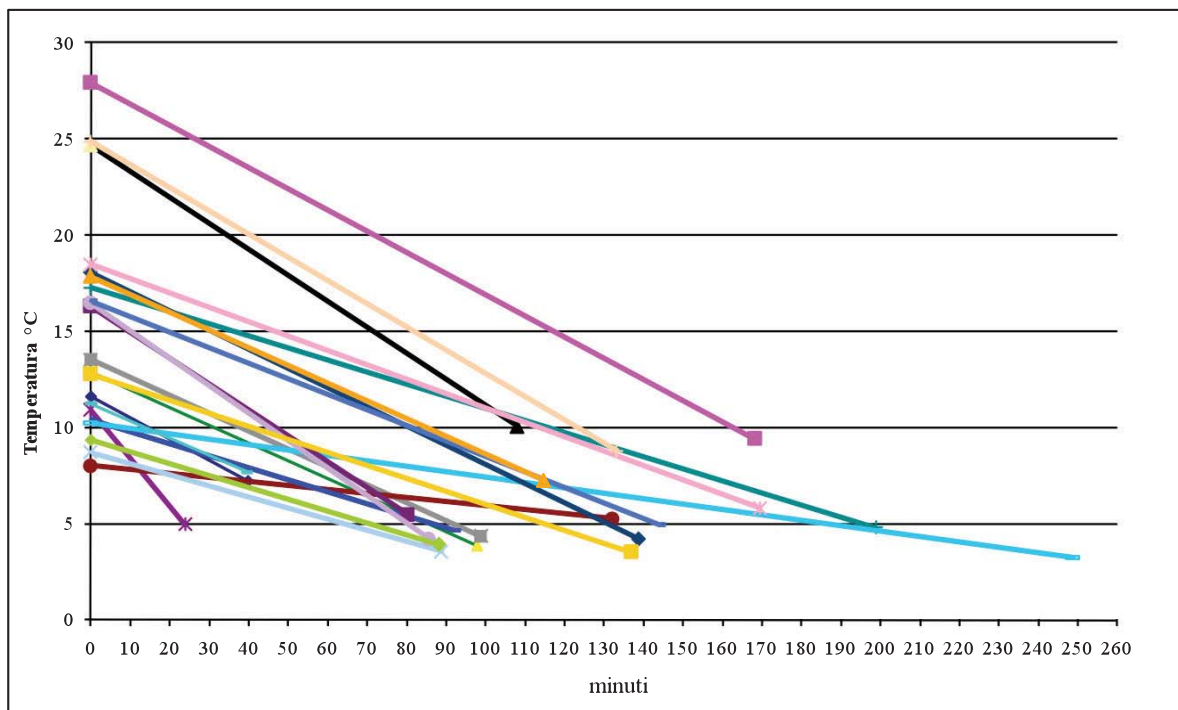


Figura 17 - Distribuzione di frequenza della temperatura media di stoccaggio (A) del latte



In base alla temperatura del latte in ingresso nel tank di refrigerazione al termine della mungitura, alla temperatura di stoccaggio e al tempo impiegato per raggiungere la temperatura di stoccaggio è stato possibile costruire delle curve in grado di esprimere l'efficienza di raffreddamento dei tank di refrigerazione presenti nelle 22 aziende (figura 18). Si nota una notevole variabilità di efficienza tra i diversi tank; inoltre dall'inclinazione delle rette è possibile osservare che in molti casi il raffreddamento del latte avviene in tempi molto lunghi, ben al di sopra degli standard previsti dalle normative che regolamentano il funzionamento dei refrigeratori. Questi risultati sono senza dubbio spiegati dal fatto che gran parte dei tank presenti nelle aziende sono obsoleti: circa l'80% dei tank è stato acquistato prima dell'anno 2000 e in molti casi l'acquisto si riferisce ad un prodotto già usato.

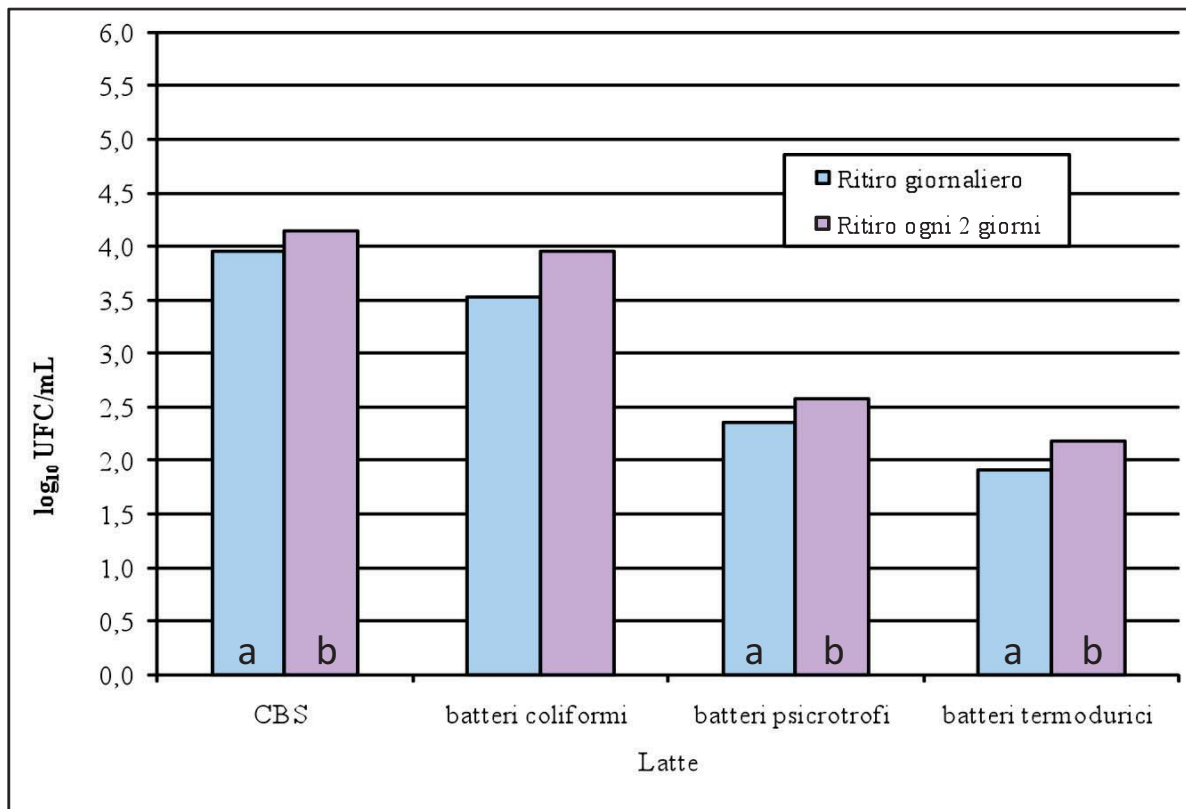
Figura 18 - Efficienza di raffreddamento dei tank nelle 22 aziende



Il ritiro veniva effettuato con cadenza giornaliera in 15 aziende mentre in 7 aziende il latte veniva ritirato ogni 48 ore. Non è stata riscontrata alcuna differenza statisticamente significativa tra i due gruppi di aziende nella temperatura di stoccaggio (A) che è stata di 4,85°C nel caso di ritiro giornaliero e di 4,09°C nel caso di ritiro ogni due giorni. Una differenza significativa tra i due gruppi ( $P < 0,001$ ) è stata registrata invece nell'innalzamento della temperatura del latte nel tank all'arrivo del latte della seconda mungitura (C): nelle aziende con ritiro giornaliero tale temperatura ha raggiunto il valore di 9,4°C mentre nelle aziende con frequenza di ritiro ogni due giorni è stata pari a 7,9°C; la differenza è probabilmente dovuta al differente rapporto tra capienza e potenza del

tank e quantità di latte stoccata. La frequenza di ritiro del latte dalla stalla ha influenzato le caratteristiche microbiologiche del latte (figura 19) e in particolare la CBS ( $P < 0,05$ ), i batteri psicrotrofi ( $P < 0,001$ ) e termodurici ( $P < 0,05$ ) che hanno fatto registrare valori più elevati nel gruppo con ritiro del latte ogni due giorni.

Figura 19 - Caratteristiche microbiologiche del latte nelle aziende con ritiro del latte giornaliero o ogni 48 ore



Le classi con lettere differenti differiscono significativamente almeno per  $P < 0,05$

Lo scambiatore di calore posto nel circuito fra la pompa e il tank di raccolta è un dispositivo che consente di raffreddare rapidamente il latte proveniente dalla sala di mungitura riducendo le variazioni di temperatura del latte eventualmente già presente nel tank. Lo scambiatore è risultato presente in 14 aziende del campione. Dalla tabella 11 è possibile osservare che sia la temperatura A di stoccaggio che la temperatura B del latte in entrata nel tank vuoto sono risultate significativamente più elevate nelle stalle senza scambiatore. La velocità di raffreddamento del latte, sia dopo la prima che dopo la seconda mungitura, sono state più brevi in presenza dello scambiatore (0,07 contro 0,11 °C/min). Risultati analoghi sono stati ottenuti anche in un'indagine svolta alcuni anni fa in Veneto, in cui è stata dimostrata chiaramente l'efficacia dello scambiatore di calore nell'abbassare velocemente la temperatura del latte nel tank (Barbieri, 2000).

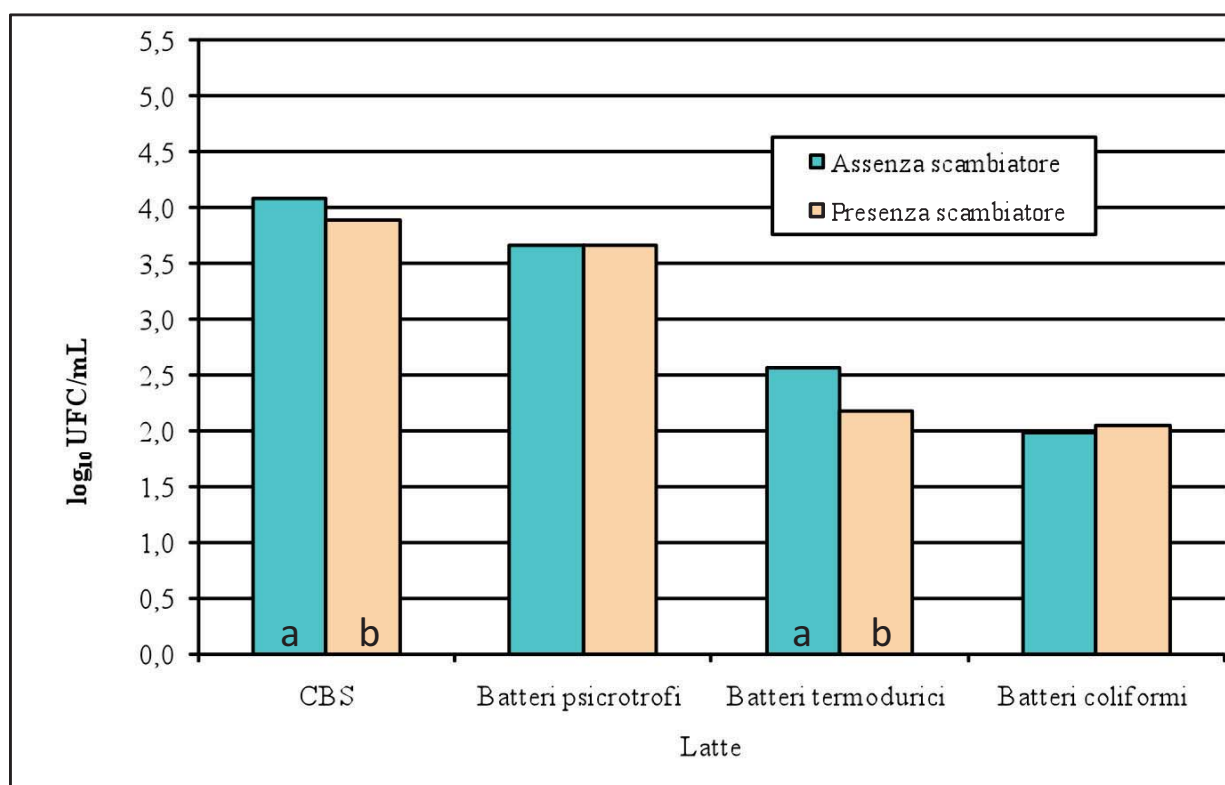
Tabella 11 - Effetto della presenza dello scambiatore sulle temperature di stoccaggio del latte e sulla velocità di raffreddamento

		Scambiatore		ES	P
		Assente	Presente		
Temperatura A	°C	5,03	3,89	0,37	*
Temperatura B	°C	9,63	7,57	0,34	***
Tempo di raffreddamento dopo la I mungitura	min	128	97	10	*
Tempo di raffreddamento dopo la II mungitura	min	127	95	11	*

A= temperatura di stoccaggio nel periodo di tempo compreso tra le due mungiture giornaliere

B= temperatura del latte in entrata nel tank vuoto

Figura 20 - Caratteristiche microbiologiche del latte nelle aziende con o senza scambiatore



Le classi con lettere differenti differiscono significativamente almeno per  $P < 0,05$

La presenza dello scambiatore ha inoltre influenzato positivamente le caratteristiche microbiologiche del latte: CBS e termodurici sono risultati significativamente inferiori ( $P < 0,05$ ) nelle aziende con questo sistema di raffreddamento (figura 20) rispetto a quelle che non lo avevano. Coliformi e psicrotrofi non hanno mostrato differenze tra i due gruppi.

## 8.10. Bioluminescenza

La valutazione del grado di pulizia di alcune superfici dell'impianto (guaine e vaso terminale) e della sala di mungitura (pavimento delle poste e pareti) mediante l'utilizzo del bioluminometro ha fornito i seguenti valori medi espressi tutti come  $\log_{10}$  RLU/superficie campionata: per le guaine 1,36, per il vaso terminale 1,20 mentre per pavimento e pareti 2,63 e 2,22, rispettivamente. I dati medi di bioluminescenza di pavimenti e pareti ottenuti nelle aziende sono mostrati nella figura 21.

La correlazione tra i dati di RLU ottenuti nelle guaine e nel vaso terminale è risultata altamente significativa ( $r = 0,45$ ;  $P < 0,001$ ), come era logico aspettarsi. Molto stretta è risultata anche la correlazione tra i dati ottenuti per il pavimento delle poste e le pareti della sala ( $r = 0,71$ ;  $P < 0,001$ ). Analogamente anche le correlazioni tra i risultati di guaine e parete, da un lato, e guaine e pavimento, dall'altro, hanno mostrato coefficienti piuttosto elevati ( $r = 0,51$  e  $r = 0,55$  rispettivamente;  $P < 0,001$ ). Una gestione accurata della pulizia della sala di mungitura è quindi generalmente correlata ad una buona pulizia anche dell'impianto di mungitura.

Figura 21 - Valori medi per azienda delle letture di bioluminescenza ( $\log_{10}$  RLU/superficie campionata) dei tamponi effettuati su pavimenti e pareti

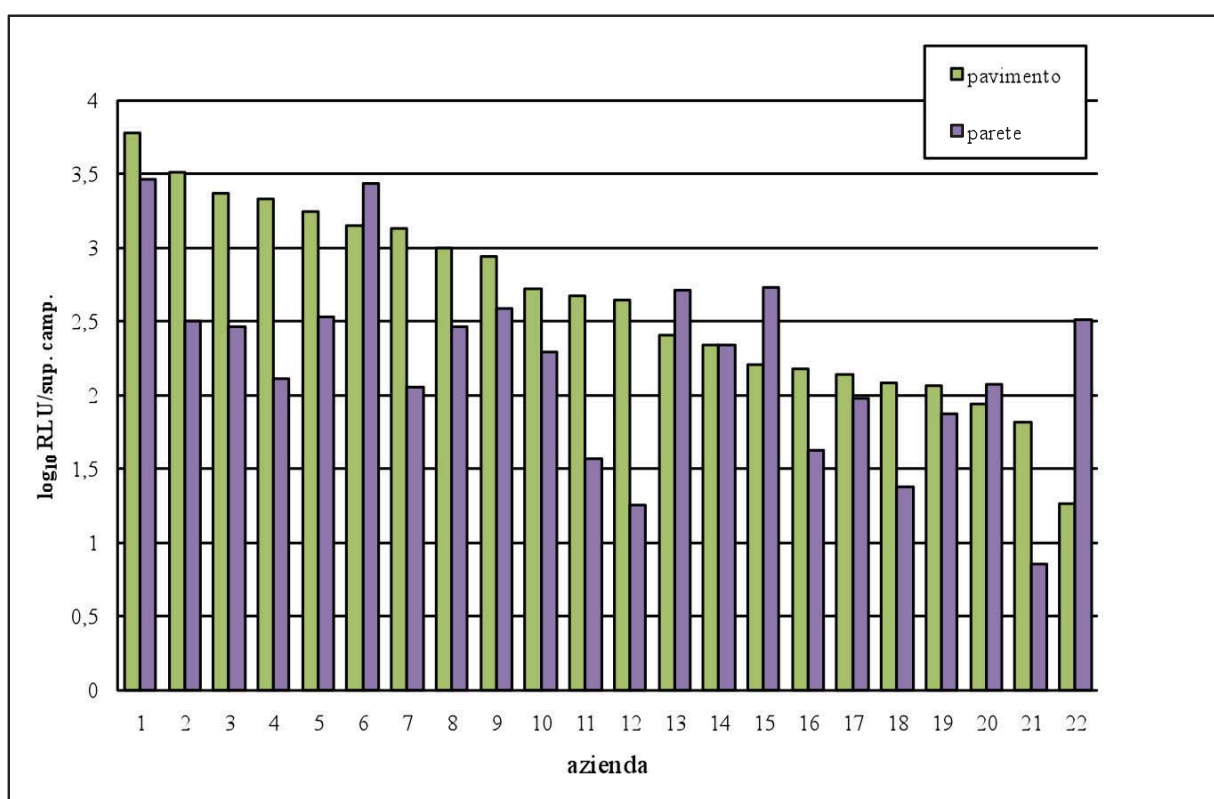


Figura 22 - Effetto stagionale sui parametri di bioluminescenza di guaine, vaso terminale, parete e pavimento ( $P < 0,01$ )

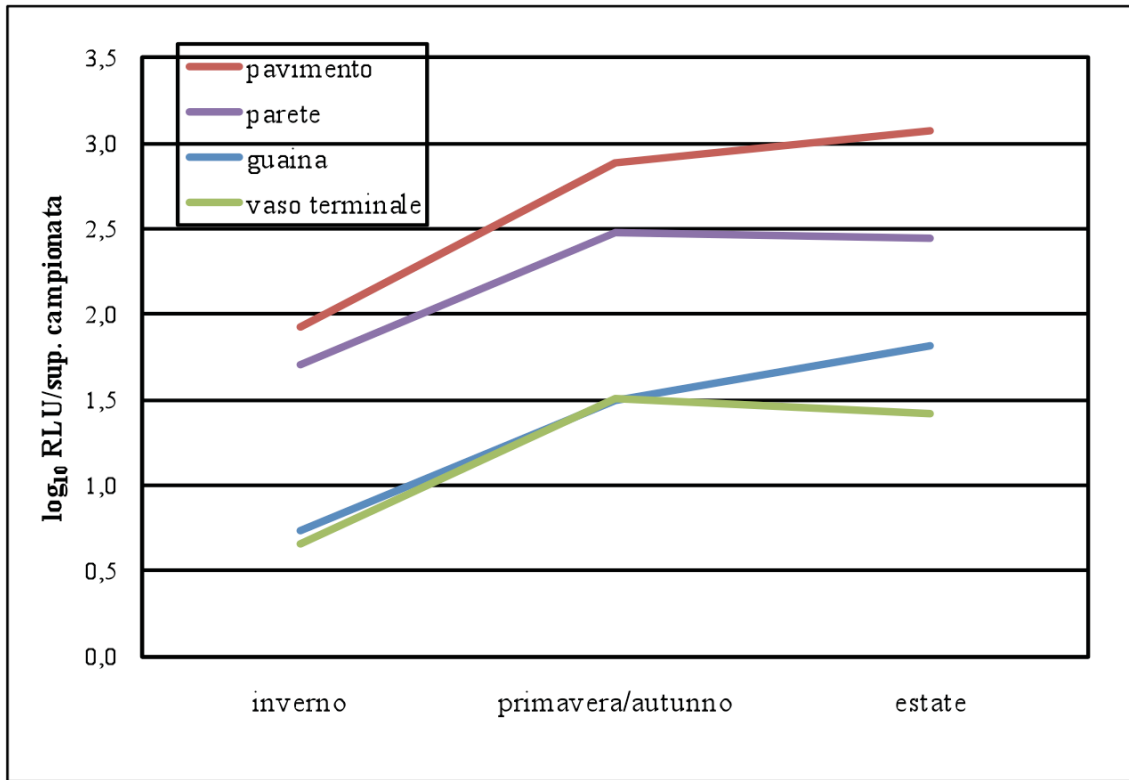
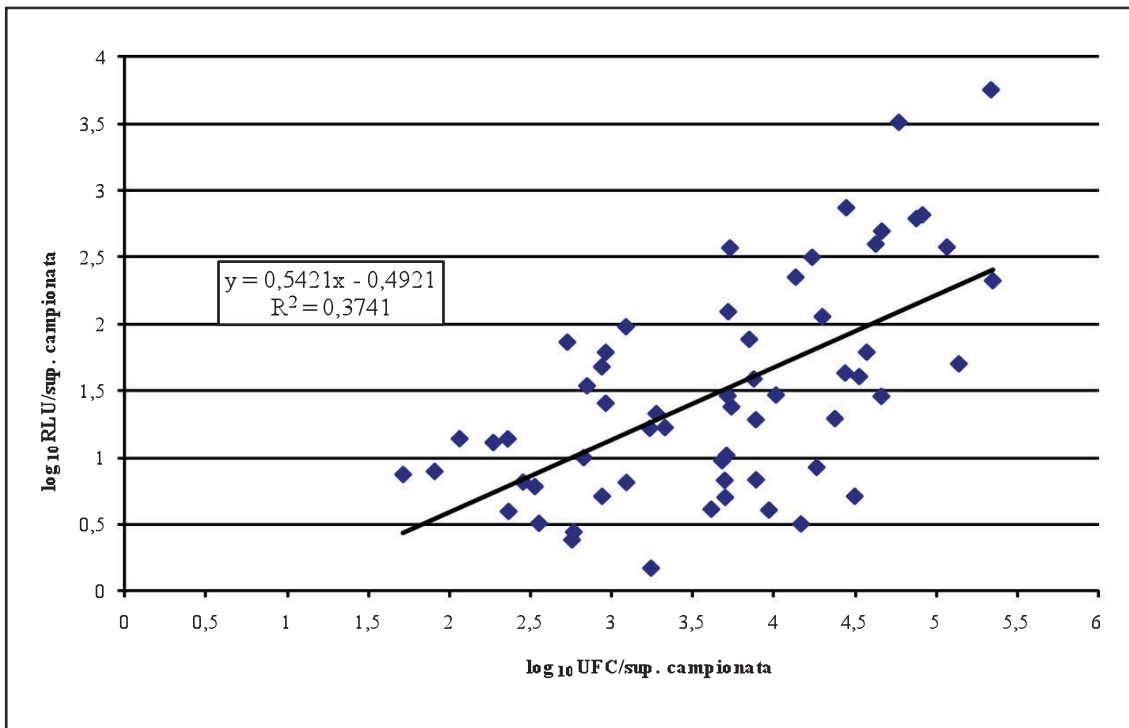


Figura 23 - Regressione tra CBS e bioluminescenza nelle guaine ( $n = 66$ )



Sui parametri di bioluminescenza è stato valutato l'effetto stagionale (figura 22) che è risultato sempre statisticamente significativo ( $P < 0,01$ ). I valori più elevati di RLU si sono avuti in estate mentre quelli più contenuti sono stati registrati in inverno. Questo risultato concorda con le indicazioni emerse dalle analisi microbiologiche effettuate sulle guaine e sul vaso terminale dell'impianto di mungitura anche se in quel caso gli innalzamenti dei livelli di contaminazione durante il periodo estivo non erano risultati statisticamente significativi.

La regressione tra i valori di bioluminescenza e i risultati microbiologici dei tamponi effettuati sulle guaine è presentata nella figura 23. Il valore di  $r^2$  ottenuto (0,37) è inferiore a quanto riportato da un lavoro di Finger e Sicho (2001) su tamponi effettuati sui capezzoli, ma questo potrebbe essere dovuto al fatto che all'interno delle guaine spesso si trova dell'acqua residua che può dare risultati molto variabili in termini di RLU (Reinmann e Ruegg, 2000).

I risultati ottenuti con il bioluminometro sono del tutto preliminari ma incoraggianti; si può ipotizzare che, dopo ulteriori prove, questo strumento possa essere utilizzato sulle superfici della stalla e sui capezzoli delle bovine per identificare rapidamente le fonti di contaminazione.

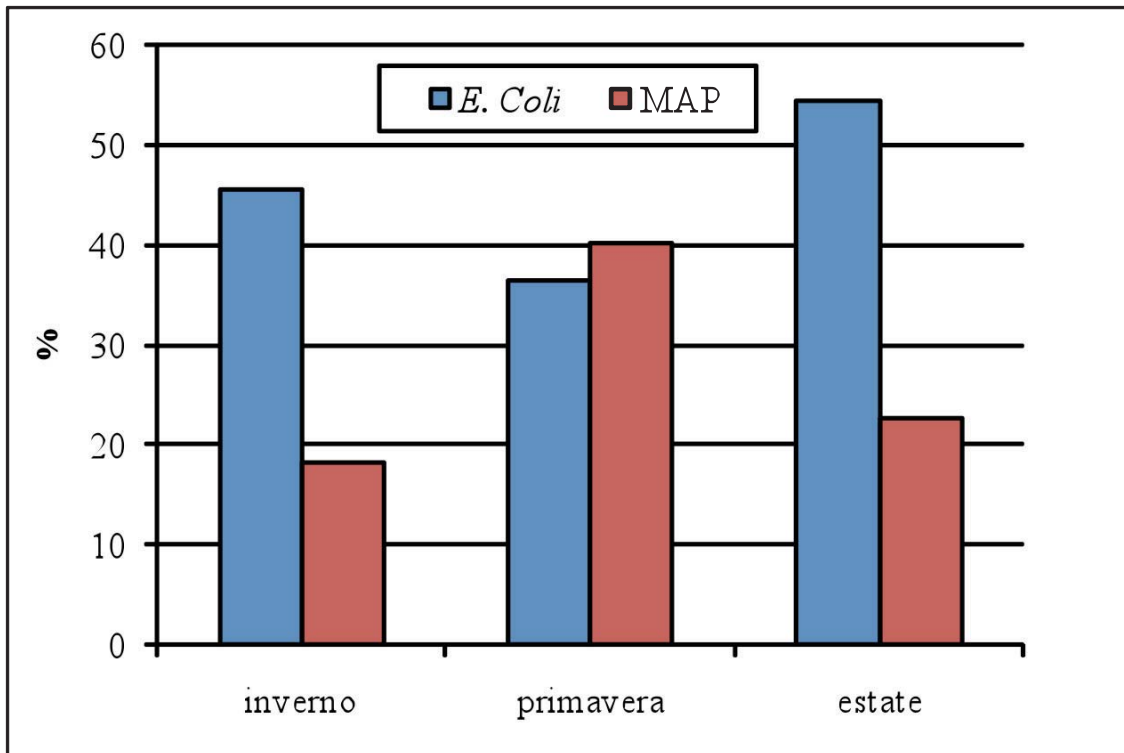
### 8.11. Patogeni zoonosici

La presenza di batteri zoonosici a livello di latte e filtro del latte è stata un'evenienza molto rara in tutte le stagioni. Solo in un'azienda infatti, è stato riscontrato un campione di latte contaminato da *E.coli* verocitotossici e in 3 aziende da *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* (MAP) nel corso dello studio. Per quanto riguarda il filtro del latte, in 3 aziende è stata evidenziata la presenza di *E.coli* verocitotossici e in 6 di MAP in almeno un campione, indipendentemente dalla positività del latte. *Staphylococcus aureus* è risultato presente nel latte di 5 mandrie; infine *Yersinia enterocolitica* è stata identificata in una sola azienda e in un singolo prelievo, sia nel latte che nel filtro, mentre non sono mai stati isolati campilobatteri o salmonelle. Al contrario, i campioni ambientali, rappresentati da campioni di feci delle bovine in lattazione, hanno dimostrato positività elevate per *E.coli* verocitotossici e MAP, con andamenti diversi nel corso dell'anno. Mentre infatti *E.coli* verocitotossici hanno mostrato una presenza abbastanza costante con un picco estivo, nel caso del micobatterio si è evidenziato un raddoppio dei campioni positivi durante la primavera rispetto all'inverno, con un calo poi nella stagione calda (figura 24). Nella quasi totalità delle aziende (91%) sono stati isolati *E.coli* verocitotossici in almeno un campione di feci nel corso delle 3 stagioni. Nel 60% di queste aziende è stata riscontrata anche la presenza di MAP, per lo più in una o due stagioni. In un solo campione è stata isolata *Salmonella enterica*, probabilmente per la



presenza di un animale portatore-eliminatore. Nello stesso periodo infatti, l'allevatore aveva segnalato un'elevata mortalità dei vitelli, causata dallo stesso microrganismo.

Figura 24 - Percentuale di campioni ambientali positivi a *E.coli* verocitotossici e MAP nelle diverse stagioni



La bassa frequenza di questi patogeni rende molto scarsa la possibilità di individuare indicatori di rischio a livello di carica batterica del latte o di pulizia della lettiera (tabelle 12 e 13). Infatti il rapporto di prevalenza, che indica la probabilità di avere lo specifico problema in presenza dell'indicatore di rischio, risulta non stimabile. Appare interessante il dato relativo alla presenza di *Staphylococcus aureus* nelle aziende dove i fianchi delle vacche risultano più sporchi. Dato che il *reservoir* di questo microrganismo è rappresentato dalla mammella infetta, è evidente che il grado di pulizia degli animali non può avere alcuna influenza sull'insorgenza di mastiti causate da *Staphylococcus aureus*. Si può ipotizzare che la scarsa cura nella gestione della lettiera sia tale anche in sala di mungitura, con il conseguente contagio di una buona percentuale degli animali.

Un risultato completamente inaspettato è rappresentato dalla consistente e confermata associazione tra perdita dell'integrità dello sfintere del capezzolo e presenza di MAP sia nell'ambiente che sul filtro del latte, come indicato dal rapporto di prevalenza.

Tabella 12 - Relazione fra caratteristiche igieniche dell'allevamento, condizioni dello sfintere del capezzolo, e rischio della presenza di batteri zoonosici nell'ambiente, nel latte e nel filtro

Indicatore di rischio	Rischio per						
	<i>E.coli</i> verocit. Ambiente	MAP Ambiente	<i>S.aureus</i> Latte	<i>E.coli</i> verocit. Latte	<i>E.coli</i> verocit. Filtro	MAP Latte	MAP Filtro
CBS latte				0,049			
Pulizia lettiera	0,08						
Punteggio fianchi >15% score 3-4							
Punteggio fianchi >25% score 3-4			0,06				
Punteggio arti >25% score 3-4							
Punteggio arti >50% score 3-4							
Punteggio mammella >5% score 3-4							
Punteggio mammella >15% score 3-4							
Punteggio capezzoli >5% di score 3-4							0,01
Punteggio capezzoli >15% di score 3-4		0,04					0,009

Il valore riportato in tabella indica la significatività (test esatto di Fisher)

L'integrità dell'estremità del capezzolo è in relazione con il rischio di mastiti ed è stata valutata su tutte le bovine in mungitura con il metodo *teat apex score* che consiste nell'assegnare ad ogni capezzolo un punteggio da 1 a 4 in funzione del grado di ipercheratosi dello sfintere capezzolare (da liscio a molto rugoso) (Mein *et al.*, 2001). Nel nostro campione la presenza di oltre il 15% di capezzoli con score 3-4 (cioè con estremità lesionate) è risultata associata ad un rischio rispettivamente 2 e 3 volte maggiore di riscontrare MAP nel filtro o nelle feci, rispetto alle aziende dove la frequenza dei capezzoli con score elevato è inferiore al 15%. Anche in questo caso, non esiste alcuna relazione patogenetica fra integrità dello sfintere ed infezione paratubercolare, ma tali alterazioni devono essere considerate come un indicatore di rischio. D'altra parte, le lesioni allo sfintere del capezzolo sono provocate da una mungitura non corretta e si manifestano con maggior frequenza all'aumento dell'età dell'animale: una scarsa attenzione manageriale e la presenza di

animali non giovani possono essere responsabili di una più elevata prevalenza di vacche infette che eliminano il microrganismo con il latte.

Tabella 13 - Influenza dei parametri di hygiene score e dell'integrità dello sfintere del capezzolo sul rischio di presenza dei patogeni zoonosici in ambiente, sul filtro-calza e nel latte

Indicatore di rischio	Rischio per	Frequenza a rischio	Frequenza non a rischio	Rapporto prevalenze
CBS latte	<i>E.coli</i> verocitotossici Latte	5,10%	0	Non stimabile
Pulizia lettiera	<i>E.coli</i> verocitotossici Ambiente	35,9%	59,3%	0,60
	<i>S.aureus</i> Latte	17,9%	3,7%	4,84
	MAP Latte	10,3%	0	Non stimabile
Fianchi >15% di score 3-4	<i>S.aureus</i> Latte	16,3%	0	Non stimabile
Fianchi >25% di score 3-4	<i>S.aureus</i> Latte	18,9%	3,45%	5,49
	MAP Latte	10,8%	0	Non stimabile
Mammella >5% di score 3-4	<i>E.coli</i> verocitotossici Filtro	56,6%	30,8%	1,84
Capezzoli >5% di score 3-4	MAP Ambiente	29,8%	10,5%	2,83
	MAP Filtro	36,2%	5,3%	6,87
Capezzoli >15% di score 3-4	MAP Ambiente	38,5%	15,0%	1,95 *
	MAP Filtro	46,1%	15,0%	3,08 *

\*  $P < 0,05$

Infine, data l'importanza che negli ultimi anni ha assunto la prototeca, un'alga che può essere causa di gravi mastiti nella bovina, è stata effettuata la ricerca anche di questo patogeno sia nel latte, che nel filtro del latte. Questo microrganismo è stato isolato in 2 aziende in tutti i campioni prelevati nel corso dello studio, mentre in un'azienda è stata riscontrata una sola volta nel latte.

Dai risultati ottenuti nel corso di questo studio si può affermare che il prelievo ambientale di campioni di feci costituisce una buona metodica per individuare il potenziale rischio zoonosico della mandria. È importante però ripetere tale campionamento più volte nel corso dell'anno (uno

ogni stagione), in quanto si tratta di microrganismi generalmente eliminati in modo saltuario dalle vacche. Anche l'analisi del filtro del latte si è dimostrata molto utile per indagare il grado di affidabilità delle procedure di mungitura. A differenza del latte di tank infatti, dove i microrganismi eventualmente presenti risultano molto diluiti, in questo caso la calza, fermando lo sporco grossolano, aumenta la possibilità di individuare i batteri presenti nel latte. Infine i dati dello studio mostrano che i microrganismi zoonosici, seppur presenti nell'ambiente di stalla, costituiscono però solo saltuariamente un reale rischio per il latte, se gli animali vengono munti seguendo pratiche corrette. Bisogna però sottolineare che lo studio è stato effettuato su un numero limitato di valutazioni per ogni azienda, non necessariamente rappresentative della situazione aziendale.

### **8.12. Caratteristiche delle stalle con diversa carica batterica del latte**

Le aziende caratterizzate da una CBS media del latte nelle 3 stagioni superiore alla media dell'intero campione (10.000 UFC/mL) sono state 12 su 22 (tabella 14).

Rispetto alle aziende che hanno avuto CBS media inferiore a 10.000 UFC/mL, tali aziende hanno presentato caratteristiche microbiologiche del latte significativamente meno buone per tutti i parametri controllati, ad eccezione di *E.coli*. Sempre a livello di qualità microbiologica del latte è possibile notare come, nelle aziende con CBS media  $\geq 10.000$  UFC/mL, il rapporto coliformi/CBS sia risultato significativamente superiore rispetto all'altro gruppo di aziende.

Le aziende con CBS media superiore a 10.000 UFC/mL hanno fatto registrare situazioni problematiche a più livelli. In primo luogo la pulizia degli animali all'entrata in sala di mungitura è risultata significativamente meno buona rispetto alle altre aziende in termini di percentuale di animali con punteggi 3 e 4 per arti, fianchi e mammelle; in particolare per le mammelle i due gruppi di aziende hanno fatto registrare percentuali di animali con mammelle sporche (punteggi di 3 e 4) di 8,5 e 30,3 % ( $P < 0,001$ ). Inoltre la percentuale di aziende che attuava il pre-dipping prima della mungitura è risultata di 32 contro 14 %, rispettivamente nel gruppo con bassa CBS e in quello con CBS media più elevata. Come risultato del diverso livello di imbrattamento delle mammelle e della diversa frequenza di adozione del pre-dipping, la CBS dei capezzoli è stata significativamente più elevata ( $P < 0,001$ ) nelle aziende con CBS nel latte superiore a 10.000 UFC/mL.

I due gruppi di aziende hanno mostrato differenze significative in termini di temperatura massima di lavaggio dell'impianto che è risultata più bassa, e quindi meno favorevole, nelle aziende con CBS del latte più elevata ( $P < 0,001$ ).

Tabella 14 - Caratteristiche delle aziende con diversa CBS media del latte

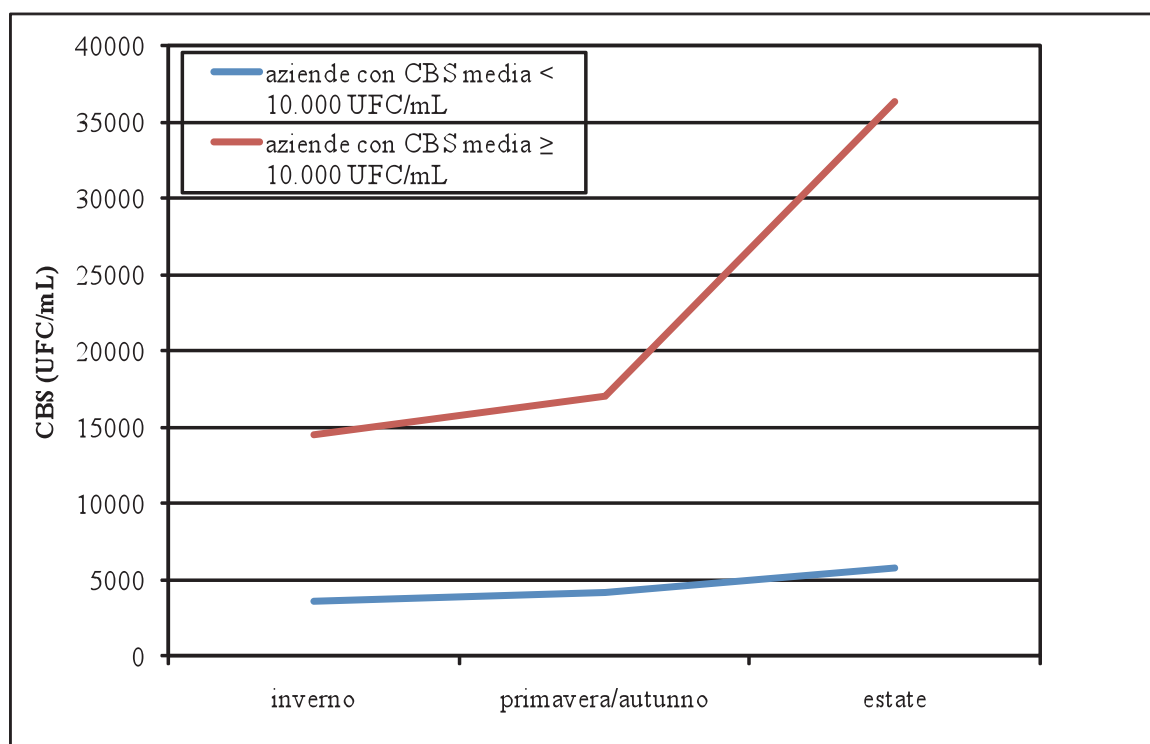
Campione	Parametro	CBS latte media		ES	P
		<10000 UFC/mL n=10	≥10000 UFC/mL n=12		
	Punteggio mammella (%3-4)	<b>8,5</b>	<b>30,3</b>	2,87	***
	Aziende con pre-dipping (%)	<b>32,0</b>	<b>14,0</b>		
	Temperatura max lavaggio (°C)	<b>39,5</b>	<b>30,5</b>	0,89	***
	Raffreddamento tank (°C/min)	<b>0,1</b>	<b>0,09</b>	0,01	
Latte	CBS	<b>3,64</b>	<b>4,32</b>	0,06	***
Latte	coliformi	<b>1,56</b>	<b>2,36</b>	0,11	***
Latte	<i>E. coli</i>	<b>1,01</b>	<b>1,09</b>	0,05	
Latte	termo durici	<b>2,19</b>	<b>2,62</b>	0,07	***
Latte	psicrotrofi	<b>3,23</b>	<b>4,02</b>	0,10	***
Latte	cellule somatiche	<b>3,77</b>	<b>4,73</b>	0,10	***
Latte	coliformi/CBS	<b>0,43</b>	<b>0,54</b>	0,02	***
Guaine	CBS	<b>3,36</b>	<b>3,96</b>	0,14	**
Guaine	coliformi	<b>0,55</b>	<b>0,64</b>	0,06	
Guaine	<i>E. coli</i>	<b>0,36</b>	<b>0,49</b>	0,05	
Guaine	termo durici	<b>1,65</b>	<b>2,28</b>	0,10	***
Guaine	psicrotrofi	<b>2,73</b>	<b>3,32</b>	0,16	**
Guaine	<i>S. aureus</i>	<b>0,08</b>	<b>0,16</b>	0,06	
Vaso terminale	CBS	<b>3,00</b>	<b>3,36</b>	0,20	
Vaso terminale	coliformi	<b>0,41</b>	<b>0,70</b>	0,10	**
Vaso terminale	<i>E. coli</i>	<b>0,30</b>	<b>0,40</b>	0,04	
Vaso terminale	termo durici	<b>1,49</b>	<b>1,86</b>	0,09	***
Vaso terminale	psicrotrofi	<b>2,30</b>	<b>2,75</b>	0,23	
Capezzoli	CBS	<b>4,96</b>	<b>5,64</b>	0,08	***
Capezzoli	<i>S. aureus</i>	<b>3,05</b>	<b>3,05</b>	0,04	

\*=P<0,05; \*\*=P<0,01; \*\*\*=P<0,001

Come risultato del differente livello di contaminazione dei capezzoli e della differente temperatura di lavaggio dell'impianto, la contaminazione delle guaine di mungitura è risultata significativamente più elevata nel gruppo di aziende con CBS media del latte elevata, sia in termini di CBS che di batteri termo durici e psicrotrofi; i tamponi nel vaso terminale hanno evidenziato differenze statisticamente significative per coliformi e termo durici. Nessuna differenza significativa è emersa invece per la presenza di *E. coli* su guaine e vaso terminale né per la presenza di *S. aureus* su guaine e capezzoli. Inoltre non si sono evidenziate differenze tra i due gruppi di aziende per quanto riguarda la velocità di raffreddamento del latte nel tank di refrigerazione.

Analizzando la variazione della CBS del latte dei due gruppi di aziende in funzione della stagione si è potuto verificare (figura 25) che le aziende caratterizzate da valori medi di CBS nel latte inferiori a 10.000 UFC/mL sono state in grado di mantenere anche durante la stagione calda un'ottima capacità di controllo della CBS del latte mentre le altre aziende non sono riuscite a fare altrettanto e durante il periodo estivo sono andate incontro a sensibili incrementi della carica batterica del latte. L'aumento percentuale di carica batterica del latte tra inverno ed estate è stato pari al 62% nelle prime e addirittura al 151% nelle seconde.

Figura 25 - Andamento della CBS media del latte nel corso delle stagioni in aziende con differente valore di CBS media nel latte

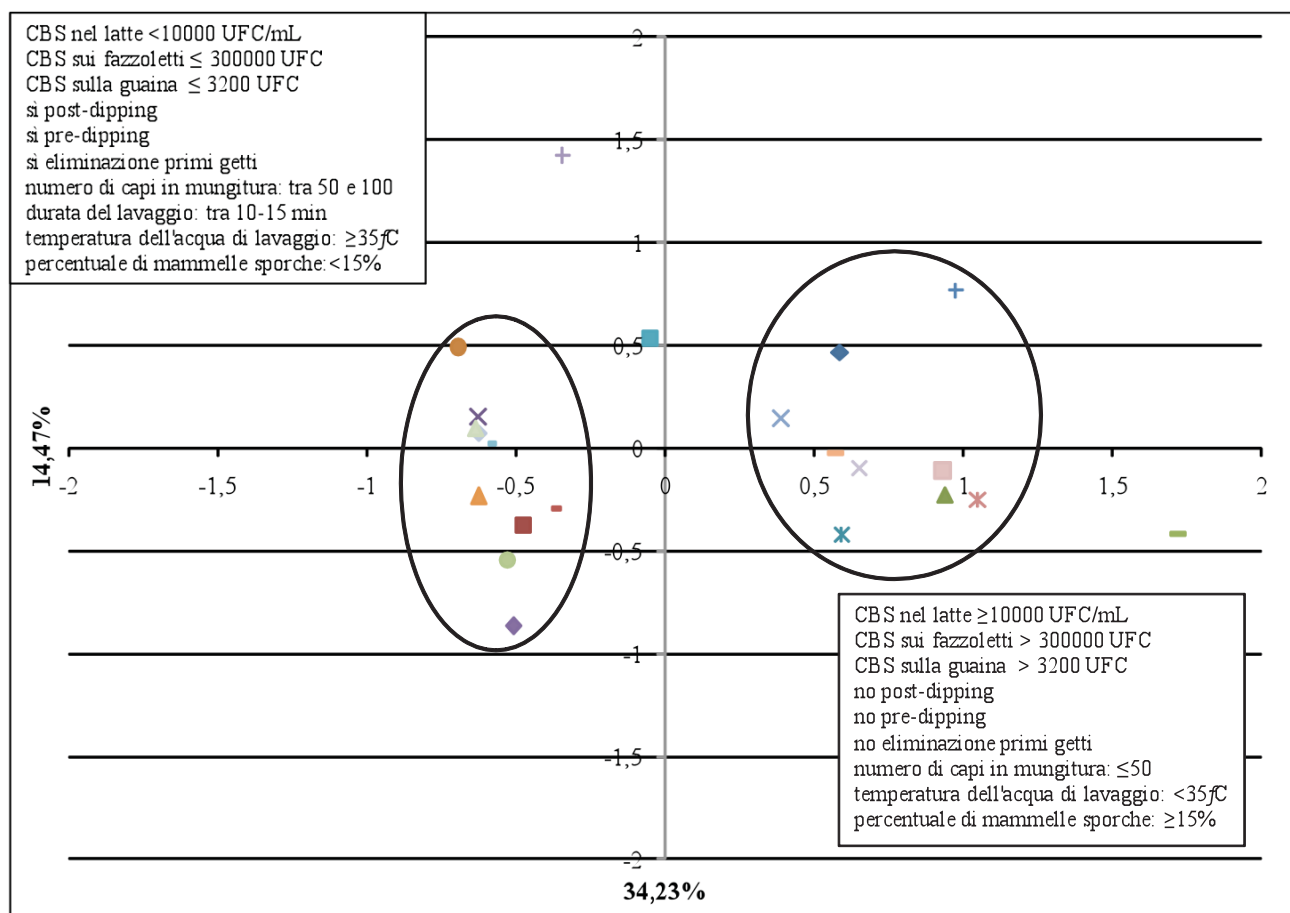


### 8.13. Analisi delle corrispondenze multiple

Un obiettivo importante dello studio di campo effettuato è stato quello di individuare le pratiche gestionali che possono maggiormente influenzare le caratteristiche igieniche del latte. Per fare questo, oltre a valutare l'effetto dei singoli fattori di influenza (pulizia della stalla, routine di mungitura, modalità di lavaggio, refrigerazione del latte, ecc), è stata fatta una valutazione contemporanea dei diversi fattori, attraverso un'analisi delle corrispondenze multiple, in modo da valutare l'associazione tra gli stessi. Dalla figura 26 è possibile individuare 2 gruppi di aziende ben distinti:

gruppo A: in questo gruppo si trovano aziende di medie dimensioni (50-100 capi in mungitura) con animali che presentano un elevato livello di pulizia delle mammelle; in sala di mungitura vengono effettuati con regolarità l'eliminazione dei primi getti, il pre-dipping e il post-dipping e i tamponi eseguiti sui capezzoli prima dell'attacco del gruppo presentano una carica batterica inferiore o uguale a 300.000 UFC/sup. campionata; inoltre la temperatura massima di lavaggio dell'impianto è superiore o uguale ai 35°C e la durata della fase di lavaggio è compresa tra 10 e 15 minuti; infine la CBS dei tamponi effettuati nelle teste delle guaine dell'impianto risulta inferiore o uguale a 3200 UFC/sup. campionata. In queste realtà la CBS media del latte risulta inferiore a <10000 UFC/mL.

Figura 26 - Analisi delle corrispondenze multiple



gruppo B: questo gruppo presenta caratteristiche quasi opposte rispetto al precedente: le aziende sono di piccole dimensioni (< 50 capi) con animali che non presentano un elevato livello di pulizia delle mammelle; non vengono effettuate regolarmente operazioni di pulizia alla mungitura e i capezzoli prima dell'attacco presentano una carica batterica superiore a 300.000 UFC/sup. campionata; la temperatura massima di lavaggio dell'impianto risulta inferiore ai 35°C e la CBS

delle guaine è superiore a 3200 UFC/sup. campionata. In queste aziende la CBS media del latte risulta superiore o uguale a 10.000 UFC/mL.

L'analisi delle corrispondenze multiple ha consentito anche di ottenere un'indicazione del "peso", cioè dell'importanza, dei diversi fattori nella suddivisione in gruppi delle aziende: il peso maggiore è rivestito dalla dimensione aziendale e dalle cure alla mungitura, in particolare pre-dipping ed eliminazione dei primi getti di latte. Successivamente in ordine decrescente compaiono la temperatura di lavaggio dell'impianto di mungitura, la carica batterica dei capezzoli, la durata del lavaggio dell'impianto, la percentuale di mammelle sporche all'entrata in sala di mungitura e la CBS delle guaine. I risultati di questa analisi confermano quindi come molti fattori concorrano a fare un latte di buona qualità microbiologica e come una maggior attenzione alla pulizia degli animali, alla routine di mungitura e al lavaggio dell'impianto possa consentire di ottenere un miglioramento delle caratteristiche igieniche del latte. Da sottolineare il fatto che nell'analisi delle corrispondenze multiple non siano mai comparsi, come fattori distintivi tra aziende, i valori dei diversi gruppi microbici (coliformi, termodurici, psicrotrofi) determinati nel latte e negli altri campioni e tamponi. Questo fenomeno è probabilmente da ricollegare al fatto che, tra i diversi gruppi microbici nel latte, come si è visto precedentemente, si sono evidenziate correlazioni molto strette a suggerire che nei nostri campioni i gruppi microbici hanno risposto in maniera analoga ai fattori esterni muovendosi compatti nella stessa direzione; ciò può aver ridotto la capacità discriminante di questi parametri e limita di fatto la possibilità di sfruttarli a fini diagnostici per identificare le fonti di contaminazione batterica.

#### **8.14. Sistema diagnostico integrato**

A partire dai risultati dello studio si è messo a punto, in via preliminare, un sistema di diagnosi dei problemi di innalzamento della carica batterica del latte alla stalla basato sull'impiego combinato di analisi microbiologiche e misurazioni strumentali. Si è scelto di considerare le misurazioni e le analisi più semplici e meno costose, in maniera tale da rendere il sistema applicabile nella pratica.

In considerazione del fatto che le aziende del campione con i più elevati valori medi di carica batterica del latte hanno in realtà mostrato difficoltà di controllo della carica del latte solo in estate, il consiglio è quello di studiare i problemi di carica durante il periodo caldo quando le problematiche latenti tendono ad emergere.

Dall'analisi delle corrispondenze multiple, come si è visto, è emerso che i fattori che, nel presente campione, hanno dimostrato di avere il maggior peso nei riguardi della carica batterica del latte



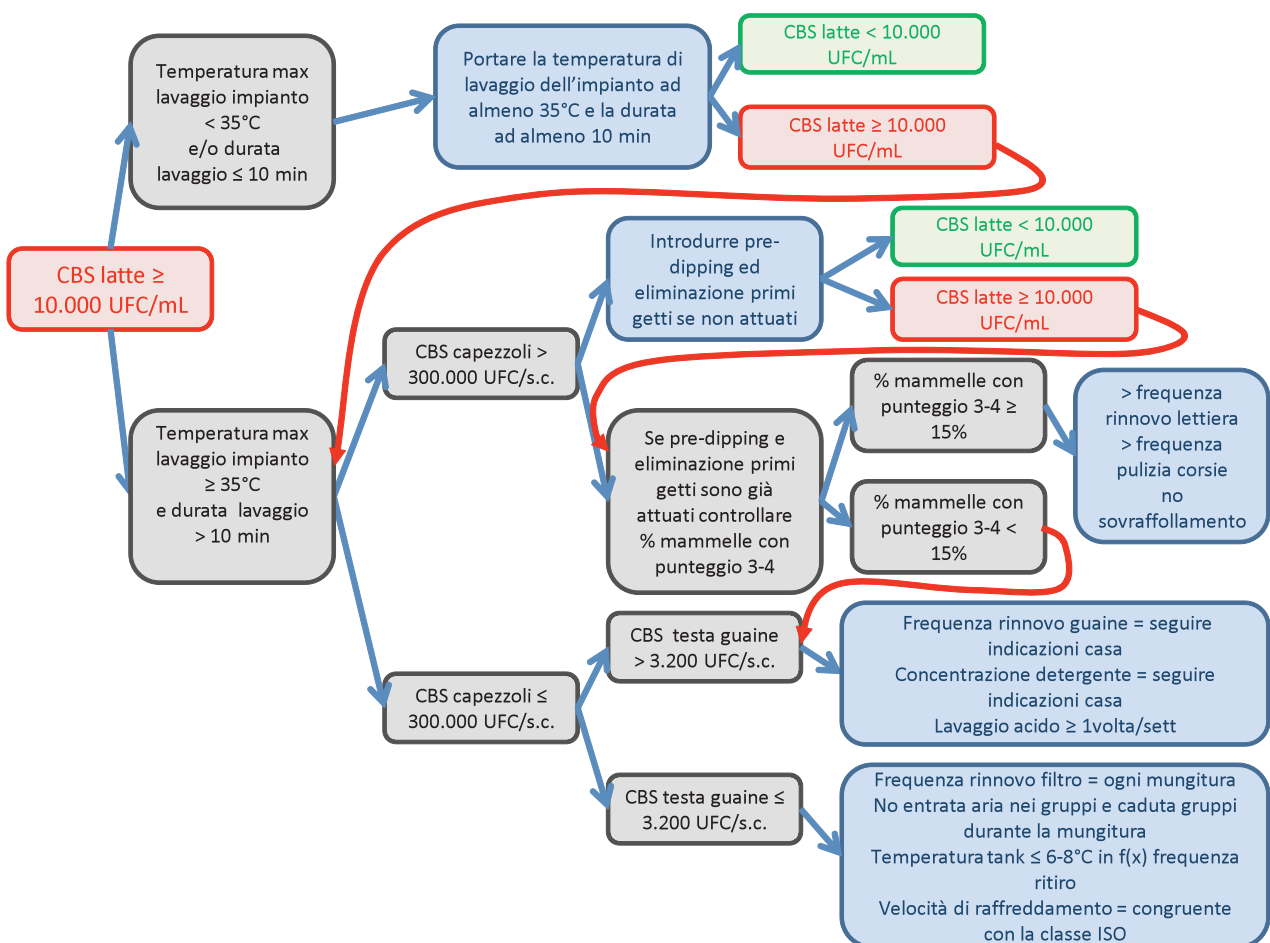
sono stati, in ordine decrescente di importanza, la dimensione aziendale, l'adozione del pre-dipping e dell'eliminazione dei primi getti di latte, la temperatura di lavaggio dell'impianto, la carica batterica sui capezzoli, la durata del lavaggio dell'impianto, il grado di pulizia delle mammelle degli animali, la carica batterica sulle guaine di mungitura. La dimensione aziendale non è stata presa in considerazione per questo sistema di diagnosi e soluzione dei problemi in quanto fattore non modificabile nel breve periodo. L'effetto importante della dimensione aziendale avrebbe potuto suggerire approcci differenziati di diagnosi per le aziende piccole rispetto alle più grandi ma la ridotta dimensione del campione studiato ha sconsigliato di fatto questa distinzione.

In base ai risultati del lavoro il sistema che viene proposto per la diagnosi e la soluzione dei problemi di innalzamento della carica batterica del latte alla stalla è il seguente (figura 27):

- **determinare la carica batterica su almeno due campioni di latte di massa** prelevati dal tank ad almeno una settimana l'uno dall'altro e conservati al freddo prima dell'analisi;
- se la media geometrica della carica batterica del latte è superiore o uguale a 10.000 UFC/ml, **verificare in primo luogo la temperatura massima dell'acqua e la durata della fase principale del lavaggio dell'impianto di mungitura**. Tale controllo può essere effettuato semplicemente con un orologio e un termometro da inserire nella vasca di carico dell'acqua (ove presente) oppure, preferibilmente, mediante uno o più Lactocorder da montare in corrispondenza di uno o più gruppi di mungitura. L'impiego del Lactocorder può consentire di ottenere informazioni più precise e di registrare un maggior numero di parametri del lavaggio, come ad esempio la conducibilità, la turbolenza e il grado di riempimento dell'impianto. Inoltre impiegando più Lactocorder sullo stesso impianto, montati su gruppi di mungitura differenti, è possibile ricavare informazioni anche sulla omogeneità dei parametri di lavaggio lungo l'impianto. Il Lactocorder è un flussometro già diffuso e utilizzato per il controllo dell'emissione di latte dai Servizi di Assistenza Tecnica agli allevatori e può essere facilmente attrezzato con un software specifico per il monitoraggio del lavaggio dell'impianto di mungitura;
- se la temperatura massima della fase di lavaggio principale di lavaggio risultasse inferiore ai 35°C, e/o la durata di tale fase risultasse inferiore ai 10 minuti **elevare la temperatura sopra i 35°C e portare la durata ad almeno 10 minuti**; dopo una settimana, ripetere le analisi della carica batterica su un campione di latte di massa;
- se la temperatura di lavaggio e la durata del lavaggio risultassero già adeguate oppure, se dopo aver proceduto alla correzione, la carica batterica del latte si mantenesse sopra la soglia di

10.000 UFC/mL, **eseguire le analisi della carica batterica standard (CBS) su tamponi effettuati sui capezzoli** di un campione casuale di bovine in mungitura. Il numero di tamponi deve essere almeno pari a 1/10 delle bovine in mungitura, ma comunque mai inferiore a 5. L'operazione va effettuata dopo il termine delle eventuali operazioni di pulizia e preparazione alla mungitura, appena prima dell'attacco del gruppo di mungitura; il tampone deve essere eseguito su uno dei capezzoli posteriori dell'animale, quello più vicino all'operatore, impiegando un fazzoletto usa e getta umidificato privo di disinfettanti e stringendo la mano guantata intorno al capezzolo con un movimento verso il basso. I fazzoletti devono essere subito chiusi in sacchetti sterili e conservati al freddo fino all'analisi. Il livello di contaminazione del tampone dipende essenzialmente dalla pulizia delle mammelle all'entrata in mungitura e dall'efficacia delle operazioni di pulizia dei capezzoli prima dell'attacco del gruppo;

Figura 27 - Diagramma per la diagnosi e la soluzione dei problemi di innalzamento della carica batterica



- se la media geometrica della carica batterica del capezzolo risultasse superiore al valore di 300.000 UFC, **introdurre il pre-dipping**, purché ben effettuato e rigorosamente seguito da

un'ottima asciugatura dei capezzoli, e, se non già presente, anche **l'eliminazione dei primi getti di latte**; dopo una settimana, ripetere le analisi della carica batterica su un campione di latte di massa;

- se il pre-dipping e l'eliminazione dei primi getti risultassero già eseguiti oppure se, dopo averli introdotti/migliorati, la carica batterica del latte si mantenesse sopra la soglia di 10.000 UFC/mL, **controllare la percentuale di mammelle con punteggio 3-4** (sporche o molto sporche) su tutte le bovine in sala di mungitura;
- se la percentuale di mammelle con punteggio 3-4 dovesse essere superiore o uguale al 15%, **migliorare la pulizia della stalla** cominciando dai seguenti interventi: aumentare la frequenza di rinnovo del materiale di lettiera nelle aree di riposo, aumentare la frequenza di pulizia delle corsie e dei paddock, evitare le condizioni di sovraffollamento; il tutto fino ad ottenere un calo della percentuale di mammelle con punteggio 3-4 sotto la soglia del 15%;
- se la percentuale di mammelle con punteggio 3-4 dovesse essere già inferiore al 15% oppure se la media geometrica della carica batterica dei capezzoli risultasse inferiore o uguale a 300.000 UFC/sup. camp., **controllare la carica batterica dei tamponi nella testa delle guaine**. I tamponi vanno eseguiti su 2 guaine per gruppo (una anteriore e una posteriore) in almeno 2 gruppi di mungitura preferibilmente scelti ai due estremi dell'impianto, 3 gruppi per gli impianti di mungitura di grandi dimensioni. Il tampone deve essere passato su tutta la circonferenza dell'interno della testa della guaina, una sola volta, ad impianto pulito prima della mungitura; i tamponi devono essere immediatamente chiusi in contenitori sterili e conservati al freddo fino all'analisi. La carica sul tampone sulle guaine dipende essenzialmente dall'igiene dei capezzoli, dall'igiene in mungitura e dall'efficacia del lavaggio ma anche eventualmente dall'usura delle guaine stesse;
- se la media geometrica della carica batterica delle guaine dovesse essere superiore a 3200 UFC/sup. camp., **procedere con interventi sulle guaine e ulteriori miglioramenti del sistema di lavaggio** dell'impianto cominciando dai seguenti punti: sostituire le guaine e rispettare la durata indicata dalla casa costruttrice, verificare e aggiustare la concentrazione del prodotto detergente impiegato per il lavaggio dell'impianto seguendo le indicazioni della casa, rispettare le indicazioni sulla frequenza d'uso del detergente acido (almeno 1 volta la settimana);
- se la carica batterica delle guaine dovesse già risultare inferiore o uguale a 3200 UFC/sup. camp., oppure gli ulteriori interventi sulle guaine e sulle modalità di lavaggio dell'impianto non avessero consentito di abbassare la carica batterica del latte sotto 10.000 UFC/mL, **effettuare**

**ulteriori verifiche e relativi aggiustamenti:** verificare la sostituzione regolare del filtro a calza dopo ogni mungitura; verificare l'assenza di eventi come l'entrata d'aria nei gruppi durante la mungitura o la caduta dei gruppi di mungitura; verificare che la temperatura di stoccaggio del latte tra una mungitura e l'altra sia inferiore a 6°C mediante l'uso di un termometro inserito nel tank che sia in grado di registrare la temperatura per almeno 3 giorni; verificare l'efficienza di refrigerazione del tank in °C/min rispetto alla classe ISO di appartenenza del tank.

Il sistema proposto ha il vantaggio di essere stato costruito a partire da casi reali, ben rappresentativi della realtà produttiva lombarda, che sono stati analizzati in maniera estremamente dettagliata. Tuttavia il ridotto numero di aziende del campione costituisce un limite che impone la validazione del sistema su un elevato numero di aziende prima che esso possa essere considerato affidabile e trasferibile nella pratica. Il sistema si basa su un numero ridotto di misurazioni poco onerose: le analisi microbiologiche su latte e tamponi si limitano alla carica batterica standard che è l'analisi più semplice e meno costosa. Gli strumenti per le misurazioni possono essere rappresentati solo da semplici termometri, eventualmente dotati di datalogger per le misurazioni della temperatura del tank, integrati dove possibile, per il solo monitoraggio del lavaggio, dal Lactocorder che è un flussometro già ampiamente utilizzato nell'assistenza tecnica agli allevamenti con altre finalità.

I potenziali limiti del sistema, oltre alla scarsa numerosità del campione di partenza che impone una validazione su ampia scala, sono rappresentati in primo luogo dal fatto che le temperature massime di lavaggio sono risultate molto basse in tutte le aziende monitorate, con la conseguenza che il sistema, essendo costruito a partire dai dati reali, porta a consigliare temperature di lavaggio sopra i 35°C quando invece sarebbero sicuramente desiderabili temperature più alte. Un secondo possibile limite può essere rappresentato dalla esecuzione dei tamponi (fazzoletti) per la determinazione della carica batterica sui capezzoli. Il parametro si presenta molto interessante perché fornisce una misura dell'interazione tra pulizia degli animali e operazioni alla mungitura. Tuttavia la standardizzazione del metodo non è così semplice, a partire dalla scelta dei fazzoletti umidificati fino al movimento necessario per tamponare i capezzoli in maniera omogenea e ripetibile.

Infine il sistema presenta una certa macchinosità, in realtà più apparente che reale. Un approccio più diretto al problema potrebbe basarsi sul controllo e aggiustamento di più parametri contemporaneamente (ad esempio temperatura lavaggio, CBS capezzoli e pre-dipping, percentuale di mammelle sporche e pulizia stalla) ma ciò implica la disponibilità da parte dell'allevatore ad effettuare da subito interventi su più fronti, con i relativi costi per quanto piccoli, senza avere

precisa consapevolezza di quale sia il fattore o i fattori determinanti nel caso specifico della sua azienda.

Le soluzioni prospettate con questo sistema per il miglioramento del controllo della carica batterica del latte sono quelle più semplici e meno dispendiose: dall'aumento della temperatura dell'acqua di lavaggio all'adozione di maggiori cure alla mungitura. E' chiaro tuttavia che in mancanza di risposte alle soluzioni più semplici potrebbe essere necessario prendere in considerazione interventi più significativi come ad esempio il rinnovo di strutture o di attrezzature: impianto di mungitura, tank di refrigerazione, strutture della stalla.

## 9. Conclusioni

Nel campione di 22 aziende lombarde oggetto dello studio la carica batterica standard media dei campioni di latte raccolti dal tank in post mungitura è risultata di 4,00 log<sub>10</sub> UFC/mL ( $\pm 0,50$ ), pari a 10.000 UFC/mL, ben inferiore al limite fissato a livello europeo che è di 100.000 UFC/mL. Il campione di aziende studiato perciò, pur comprendendo alcuni casi aziendali caratterizzati storicamente da problematiche di carica batterica, ha presentato nella media un'ottima qualità microbiologica del latte. Anche i diversi gruppi batterici controllati nel latte (coliformi, termodurici, psicrotrofi ed *E. coli*) hanno fatto registrare valori medi nella norma.

Tra i fattori che hanno mostrato un'influenza sulla contaminazione del latte, l'effetto stagionale è risultato importante, con un innalzamento durante l'estate della carica batterica del latte ma anche, e soprattutto, dei coliformi. In particolare le aziende caratterizzate da valori medi annuali di CBS del latte superiori alla media del campione hanno mostrato problemi di controllo della carica concentrati nella stagione calda, mentre le aziende più virtuose hanno mostrato un'ottima capacità di controllo dell'inquinamento batterico durante l'intero arco dell'anno, con valori di carica pressoché costanti in tutte le stagioni.

Anche la dimensione aziendale ha mostrato un effetto significativo sulle caratteristiche microbiologiche del latte e sulla sanificazione dell'impianto di mungitura: le aziende più piccole, con meno di 50 capi in mungitura, hanno sempre fatto registrare i peggiori risultati. In molti casi le aziende di minori dimensioni erano caratterizzate da strutture di allevamento molto vecchie e poco adeguate ad assicurare una buona pulizia degli ambienti e degli animali; inoltre anche le sale e gli impianti di mungitura e di refrigerazione del latte erano di frequente obsoleti.

Si è osservato un effetto significativo del grado di pulizia delle bovine, e in particolare delle mammelle, sulla contaminazione del latte in termini di CBS, coliformi e psicotrofi mentre non si sono visti effetti sull'igiene dell'impianto di mungitura. La pulizia della lettiera ha mostrato un'influenza importante sulla pulizia degli animali, sulla qualità microbiologica del latte e anche su alcuni parametri microbiologici valutati sull'impianto di mungitura.

Le operazioni che accompagnano la mungitura (pre-dipping, eliminazione dei primi getti di latte, post-dipping) hanno mostrato effetti importantissimi su quasi tutti i parametri microbiologici controllati, sia a livello di latte che di capezzoli. In generale anche l'effetto sulle cellule somatiche del latte è risultato altamente significativo. In particolare l'adozione di due o più di tali operazioni alla mungitura ha dimostrato di consentire l'abbattimento della carica batterica del latte del 76% rispetto alla situazione in cui non venga adottato alcun accorgimento.

Per quanto riguarda il lavaggio dell'impianto di mungitura, lo studio ha evidenziato la tendenza generalizzata ad adottare temperature di lavaggio molto basse rispetto alle raccomandazioni internazionali. La temperatura massima di lavaggio della fase centrale del ciclo ha raggiunto i 34,6°C ( $\pm 9,1$ ) quando l'intervallo di temperature consigliato per questa fase è di 43-77°C. La temperatura massima della fase principale di lavaggio ha mostrato un'influenza significativa sulla qualità microbiologica del latte e sulla pulizia dell'impianto, soprattutto a livello di guaine.

Il monitoraggio della temperatura dei tank ha mostrato che le temperature di stoccaggio sono mediamente adeguate e rispettose dei limiti di legge. Per quanto riguarda l'efficienza di raffreddamento, valutata in base al tempo necessario per raggiungere la temperatura di stoccaggio, oltre ad una notevole variabilità tra le aziende, si è evidenziata la presenza di alcune situazioni in cui i tempi di raffreddamento risultano decisamente prolungati. Questi risultati sono senza dubbio spiegati dal fatto che la maggior parte dei tank presenti sono obsoleti e non sempre adeguati alle quantità di latte da stoccare.

Per quanto riguarda le misurazioni preliminari fatte con il bioluminometro in sala di mungitura e sull'impianto, per la loro scarsa numerosità i primi risultati non consentono per il momento di proporre l'impiego dello strumento nell'ambito della identificazione delle fonti di inquinamento del latte alla stalla. Tuttavia alcune relazioni emerse nello studio sembrano promettenti.

La presenza di patogeni zoonosici a livello di latte e filtro del latte è stata un'evenienza molto rara in tutte le stagioni, mentre i campioni di feci hanno dimostrato positività piuttosto elevate per *E.coli* verocitotossici e *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* (MAP).

Dall'analisi delle corrispondenze multiple infine è emerso che le caratteristiche che contraddistinguono le aziende con problemi di controllo (soprattutto estivi) della carica batterica del latte sono: le piccole dimensioni (< 50 capi in mungitura); il non elevato grado di pulizia delle mammelle ( $\geq 15\%$  di punteggi 3-4); la mancanza di operazioni alla mungitura (pre-dipping, eliminazione dei primi getti, post-dipping); l'elevata carica batterica sulla superficie dei capezzoli prima dell'attacco del gruppo mungitore ( $> 300.000$  UFC/sup. camp.); la bassa temperatura di lavaggio dell'impianto ( $< 35^{\circ}\text{C}$ ) e l'elevata carica batterica sulle guaine ( $> 3200$  UFC/sup. camp.).

A partire da queste indicazioni, e da quelle emerse precedentemente dalla valutazione dell'effetto dei singoli fattori, è stato elaborato in via preliminare un sistema di diagnosi e risoluzione dei problemi di innalzamento della carica batterica del latte alla stalla basato sull'impiego combinato di analisi microbiologiche e misurazioni strumentali. Tale sistema necessita di essere validato su un numero adeguato di aziende prima che possa essere considerato affidabile e trasferibile nella pratica.

## **10. Ringraziamenti**

Un ringraziamento particolarmente sentito alla nostra collega e amica, dott.ssa Roberta Lodi, per la profonda partecipazione umana e il serio contributo scientifico che ha saputo dare al gruppo di lavoro e al progetto di ricerca del quale non ha potuto seguire le fasi conclusive.

Un grazie anche a tutti gli allevatori che hanno partecipato al progetto per la disponibilità e la simpatia.

## 11. Bibliografia

ARPA, Agenzia Regionale Per la protezione dell'Ambiente della Lombardia, 2009. Servizio Meteorologico Regionale. Archivio dati meteorologici. <http://ita.arpalombardia.it/meteo/meteo.asp>

Barbieri V., 2000. Esperienze sul controllo dei tanks refrigeranti e sulla valutazione del grado di igiene delle mungitrici. <http://www.arav.it/Studi/RELACREM.htm>

Bramley A.J., McKinnon C.H., 1990. The microbiology of raw milk. in: Dairy Microbiology, vol. 1. Ed.: Robinson R.K., Elsevier, London, England. Pagg. 163-208.

Bava L., Zucali M., Zanini L., Brasca M., Todesco R., 2008. Relazione tra la pulizia delle bovine e la qualità igienica e sanitaria del latte. *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia*, 59:339-343.

Bava L., Zucali M., Brasca M., Zanini L., Sandrucci A., 2009. Efficiency of cleaning procedure of milking equipment and bacterial quality of milk. *Italian Journal of Animal Science*, vol. 8 (Suppl. 2): 387-389.

Circolare 19/SAN/2007 Regione Lombardia Direzione Sanità.  
[http://www.aral.lom.it/public/upload/00000267\\_07\\_19san.pdf](http://www.aral.lom.it/public/upload/00000267_07_19san.pdf)

Cliver, D.O., Riehman, M., 2002. Foodborne diseases, 2nd Edition. AP, San Diego Ca (USA).

Costerton J.W., Stewart, P.S., Greenberg E.P., 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284: 1318-1322.

Elmoslemany A.M., Keefe G.P., Dohoo I.R., Jayarao B.M., 2009. Risk factors for bacteriological quality of bulk tank milk in Prince Edward Island dairy herds. Part 1: Overall risk factors. *Journal of Dairy Science*, 92: 2634–2643.

Finger R., Sisco W.M. 2001. Bioluminescence as a technique to evaluate udder preparation. *Journal of Dairy Science*, 84:818-823.

Galton D.M., Adkinson R.W., Thomas C.V., Smith T.W., 1982. Effects of premilking udder preparation on environmental bacterial contamination of milk. *Journal of Dairy Science*, 65: 1540-1543.

Galton D. M., Petersson L. G., Merrill W. G., 1986. Effects of premilking udder preparation practices on bacterial counts in milk and on teats. *Journal of Dairy Science*, 69: 260-266.

Gehringer G., 1980. Multiplication of bacteria during farm storage. In: Factors influencing the bacteriological quality of raw milk. International Dairy Federation Bulletin, Document 120.

Gibson H., Sinclair L.A., Brizuela C.M., Worton H.L., Protheroe R.G., 2008. Effectiveness of selected premilking teat-cleaning regimes in reducing teat microbial load on commercial dairy farms. *Letters in Applied Microbiology*, 46: 295–300.

Hassan L., Mohammed H. O., McDonough P. L., 2001. Farm management and milking practices associated with the presence of *Listeria monocytogenes* in New York state dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine*, 51:63–73.



- Hogan J. S., Smith K. L., Hoblet K. H., Todhunter D. A., Schoenberger P. S, Hueston W. D, Pritchard D. E., Bowman G. L., Heider L. E., Brockett B. L., Conrad H. R., 1989. Bacterial counts in bedding materials used on nine commercial dairies. *Journal of Dairy Science*, 72:250–258.
- Holm C., Jepsen L., Larsen M., Jespersen L., 2004. Predominant microflora of downgraded Danish bulk tank milk. *Journal of Dairy Science*, 87: 1151-1157.
- IZSLER - Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, 2010. Dati Analitici Qualità del latte. Programma di pagamento del latte in base alla qualità. [http://www.izsler.it/pls/izs\\_bs/v3\\_s2ew\\_CONSULTAZIONE.mostra\\_pagina?id\\_pagina=405](http://www.izsler.it/pls/izs_bs/v3_s2ew_CONSULTAZIONE.mostra_pagina?id_pagina=405)
- Jayarao B. M., Wang L., 1999. A study on the prevalence of Gramnegative bacteria in bulk tank milk. *Journal of Dairy Science*, 82: 2620–2624.
- Jayarao B.M., Pillai S.R., Sawant A.A., Wolfgang D.R., Hegde N.V., 2004 Guidelines for monitoring bulk tank milk somatic cell and bacterial counts. *Journal of Dairy Science*, 87: 3561–3573.
- Kelly P.T., O’Sullivan K., Berry D.P., More S.J., Meaney W.J., O’Callaghan E.J., O’Brien B., 2009. Farm management factors associated with bulk tank total bacterial count in Irish dairy herds during 2006/2007. *Irish Veterinary Journal*, 62: 36-42.
- Krauss H., Weber A., Appel M., Enders B., Isenberg H.D., Schiefer H.D., Slenczka W., von Graevenitz A., Zahner H., 2003. Zoonoses, 3rd Edition. ASM Press, Washington, DC (USA).
- Kurweil R., Busse M., 1973. Total count and microflora of freshly drawn milk. *Milchwissenschaft* 28:427.
- Makovec J. A., Ruegg P. L., 2003. Results of milk samples submitted for microbiological examination in Wisconsin from 1994 to 2001. *Journal of Dairy Science*, 86:3466–3472.
- McKinnon C.H., Rowlands G.J., BramLey A.J., 1990. The effect of udder preparation before milking and contamination from the milking plant on bacterial numbers in bulk milk of eight dairy herds. *Journal of Dairy Research*, 57: 307-318.
- Mein G.A., Neijenhuis F., Morgan W.F., Reinemann D.J., Hillerton J.E., Baines J.R., Ohnstad 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, AABP-NMC International Symposium on Mastitis and Milk Quality, Vancouver, BC, Canada.
- Mucchetti G., Neviani E., 2006. Microbiologia lattiero-casearia. 2006. Ed. Tecniche Nuove, Milano.
- Murphy S.C, Boor K.J., 2000. Sources and causes of high bacteria counts in raw milk: an abbreviated review. <http://www.foodsci.cornell.edu/cals/foodsci/extension/upload/BactRawRev.doc>
- Pankey J. W., 1989. Premilking udder hygiene. *Journal of Dairy Science*, 72:1308–1312.
- Pantoja J. C. F., Reinemann D. J, Ruegg P. L., 2009. Associations among milk quality indicators in raw bulk milk. *Journal of Dairy Science*, 92 :4978–4987.

- Regolamento (CE) N. 853/2004 Del Parlamento Europeo e del Consiglio del 29 aprile 2004. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2004:139:0055:0205:IT:PDF>
- Reinemann D.J., Mein G.A., Bray D.R., Reid D., Britt J.S., 1997 Troubleshooting high bacteria counts in farm milk. <http://www.uwex.edu/MilkQuality/PDF/A3705.pdf>
- Reinemann D.J., Ruegg P., 2000. An investigation of ATP bioluminescence and quantitative bulk tank cultures to assess cleanliness of milking machines. ASAE annual International Meeting Milwaukee, Wisconsin, USA July 10-13.
- Reinemann D.J., Wolters G.M.V.H., Billon P., Lind O., Rasmussen M.D., 2000. Review of practices for cleaning and sanitation of milking machines. [http://www.uwex.edu/uwmril/pdf/MilkMachine/Cleaning/00\\_Nagano\\_CIP.pdf](http://www.uwex.edu/uwmril/pdf/MilkMachine/Cleaning/00_Nagano_CIP.pdf)
- Bade R.D., Reinemann D.J., Thompson P.D., 2008. Method for Assessing Teat and Udder Hygiene ASABE Annual International Meeting, Rhode Island June 29 – July 2.
- Sandrucci A., Crovetto G.M., Succi G., Lodi R., 1990. Influenza di alcuni fattori ambientali sulle caratteristiche igienico-sanitarie del latte bovino. *Atti della Società Italiana delle Scienze Veterinarie*, 44: 1779-1783.
- SAS 9.1, 2001 SAS Inst. Inc., Cary, NC.
- Schreiner D. A., Ruegg P. L., 2002. Effects of tail docking on milk quality and cow cleanliness. *Journal of Dairy Science*, 85:2503–2511.
- Schreiner D. A., Ruegg P. L., 2003. Relationship between udder and leg hygiene scores and subclinical mastitis. *Journal of Dairy Science*, 86:3460–3465.
- Sørhaug T., Stepaniak L., 1997. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: quality aspects. *Trends in food science and technology*, 8: 35-41.
- Tolle A., 1980. The microflora of the udder. In: Factors influencing the bacteriological quality of raw milk. Document 120, International Dairy Federation Bulletin, p 4.
- Villar A., Garcia J.A., Iglesias L., Garcia M.L., Otero A., 1996. Application of principal component analysis to the study of microbial populations in refrigerated raw milk from farms. *International Dairy Journal*, 6: 937-945.
- Zdanowicz M., Shelford J. A., Tucker C. B., Weary D. M., von Keyserlingk M. A. G., 2004. Bacterial populations on teat ends of dairy cows housed in free stalls and bedded with either sand or sawdust. *Journal of Dairy Science*, 87:1694–1701.
- Wiggans G.R., Shook G.E., 1987. A lactation measure of somatic cell count. *Journal of Dairy Science*, 70: 2666-2672.

## 12. Appendice

### Analisi microbiologiche

Le analisi microbiologiche eseguite sui campioni di latte e acqua di risciacquo e sui tamponi eseguiti sull'impianto (guaine, vaso terminale) sono state effettuate secondo le seguenti metodiche:

- Carica Batterica Standard (CBS): Petrifilm Aerobic Plate Count (3M) con incubazione a 30 °C per 72 h secondo norma ISO/FIL 4833:2003;
- Coliformi: Petrifilm Coliform Count Plates (3M) con incubazione di 24 ore a 30°C secondo norma ISO/FIL 4831;
- *Escherichia coli* - Petrifilm *Escherichia coli* Count Plates (3M) con incubazione di 24 ore a 30°C e di 24 ore a 37°C;
- Batteri psicrotrofi: Petrifilm Aerobic Plate Count (3M) con incubazione a 6.5 °C per 10 d secondo norma ISO 6730/IDF 101:2005;
- Batteri termodurici: Petrifilm erobic Plate Count (3M) con incubazione a 30 °C per 72 h previo trattamento termico a 63°C per 30 min;
- Stafilococchi coagulasi positivi, secondo norma ISO 6888-2/IDF 145:1999 (solo sui tamponi delle guaine);
- Cellule somatiche nel latte - Fossomatic (TM 400, Foss, Hillerod, Denmark).

Sui tamponi effettuati sui capezzoli si sono determinati la Carica Batterica Standard (Petrifilm Aerobic Count Plates (3M) con incubazione di 72 ore a 30°C) e gli Stafilococchi coagulasi positivi (secondo norma ISO 6888). La metodologia messa a punto per l'analisi dei fazzoletti prevede l'aggiunta di 100 mL di una soluzione di potassio fosfato bibasico anidro (2% w/v; pH: 7,5±0,1), e l'allestimento delle diluizioni successive in quarter-strength Ringer's solution. I dati ottenuti dai tamponi eseguiti su guaine, vaso terminale e capezzoli sono stati espressi in UFC/superficie campionata.

Sui campioni di feci, sui filtri a calza dell'impianto di mungitura e sui campioni di latte di massa prelevati nel corso della mungitura è stata effettuata la ricerca di patogeni secondo le seguenti metodiche:

*Campylobacter* spp - La metodica prevede l'isolamento del microrganismo su Preston broth (Mast diagnostic, UK), terreno selettivo, contenente specifici supplementi e addizionato di 5% di lisato di

sangue di cavallo, e la ricerca dei geni codificanti per flagelline mediante PCR. I risultati dell'amplificazione vengono poi visualizzati mediante elettroforesi capillare su chip miniaturizzati (lab-on-a-chip) su strumentazione Agilent Bioanalyzer.

*Escherichia coli* verocitotossici - La metodica prevede l'isolamento del microrganismo su Sorbitol-McConkey-agar (CT-SMAC) (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, UK), terreno selettivo contenente cefiximina e tellurite, addizionato di supplemento selettivo (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, UK). Successivamente viene effettuata la ricerca in PCR dei geni codificanti per le verotossine mediante due coppie di primer. I risultati dell'amplificazione sono poi visualizzati mediante elettroforesi capillare su chip miniaturizzati (lab-on-a-chip) su strumentazione Agilent Bioanalyzer.

*Listeria monocytogenes* - La metodica prevede l'isolamento del microrganismo su Listeria selective agar base (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, UK), addizionato di un supplemento selettivo contenente cicloexamide, colistina solfato, fosfomicina e acriflavina (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, UK), e la ricerca, mediante PCR, del gene *hlyA*, codificante per la listeriolisina O. I risultati dell'amplificazione vengono poi visualizzati mediante elettroforesi capillare su chip miniaturizzati (lab-on-a-chip) su strumentazione Agilent Bioanalyzer.

*Yersinia enterocolitica* - La metodica prevede l'isolamento del microrganismo su Yersinia selective agar base (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, UK), terreno selettivo, addizionato di supplemento selettivo contenente cefsulodina e novobiocina (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, UK), e la ricerca in PCR, del gene *ail*, codificante per un fattore di patogenicità responsabile dell'adesione e dell'invasione delle cellule bersaglio. I risultati dell'amplificazione vengono visualizzati mediante elettroforesi capillare su chip miniaturizzati (lab-on-a-chip) su strumentazione Agilent Bioanalyzer.

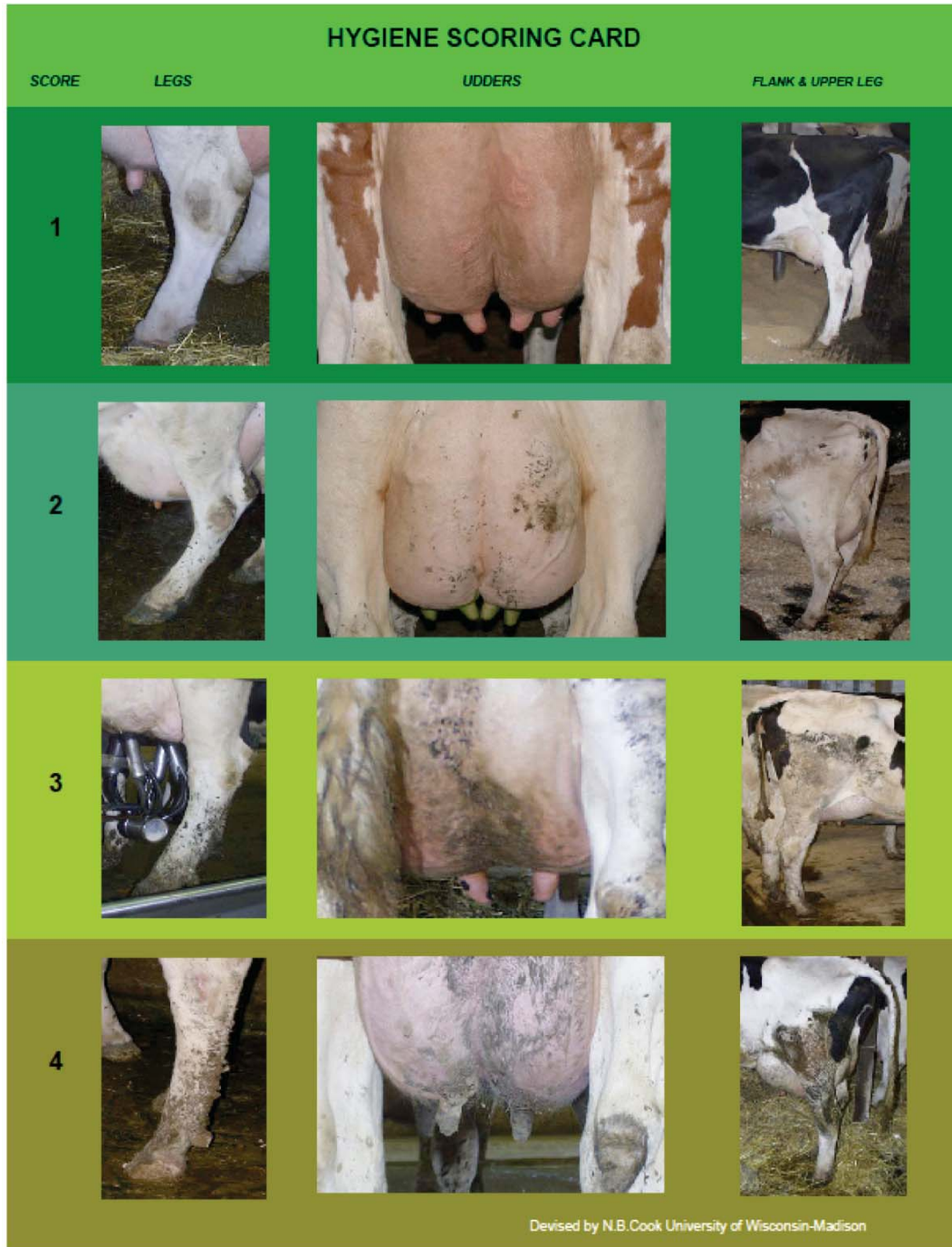
*Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* - La metodica utilizzata è quella a suo tempo sviluppata e messa a punto presso i laboratori del DIPAV, che si basa sull'estrazione del materiale genetico su mediante utilizzo di microsfele, e quindi sull'amplificazione delle sequenze ripetute IS900 mediante real-time PCR su strumento Opticon 2 (Bio-Rad).

*Staphylococcus aureus* - La ricerca del microrganismo è stata effettuata mediante esame batteriologico su agar-sangue (5% sangue di montone) e successiva identificazione delle colonie di crescita mediante test della coagulasi e, all'occorrenza, mediante API Staph.(Biomerieux, Marcy l'Etoile, F).

## Valutazione della pulizia degli animali

Durante ogni mungitura è stato valutato il livello di pulizia di tutte le bovine munte seguendo lo schema proposto da Schreiner e Ruegg (2002; 2003). In particolare sono state valutate separatamente 3 diverse regioni anatomiche (arti, fianchi e mammella) assegnando un punteggio tra 1 e 4 rispettivamente per pulizia ottima, buona, scarsa e molto scarsa (figura a).

Figura a - Schema per l'assegnazione dell'igiene score



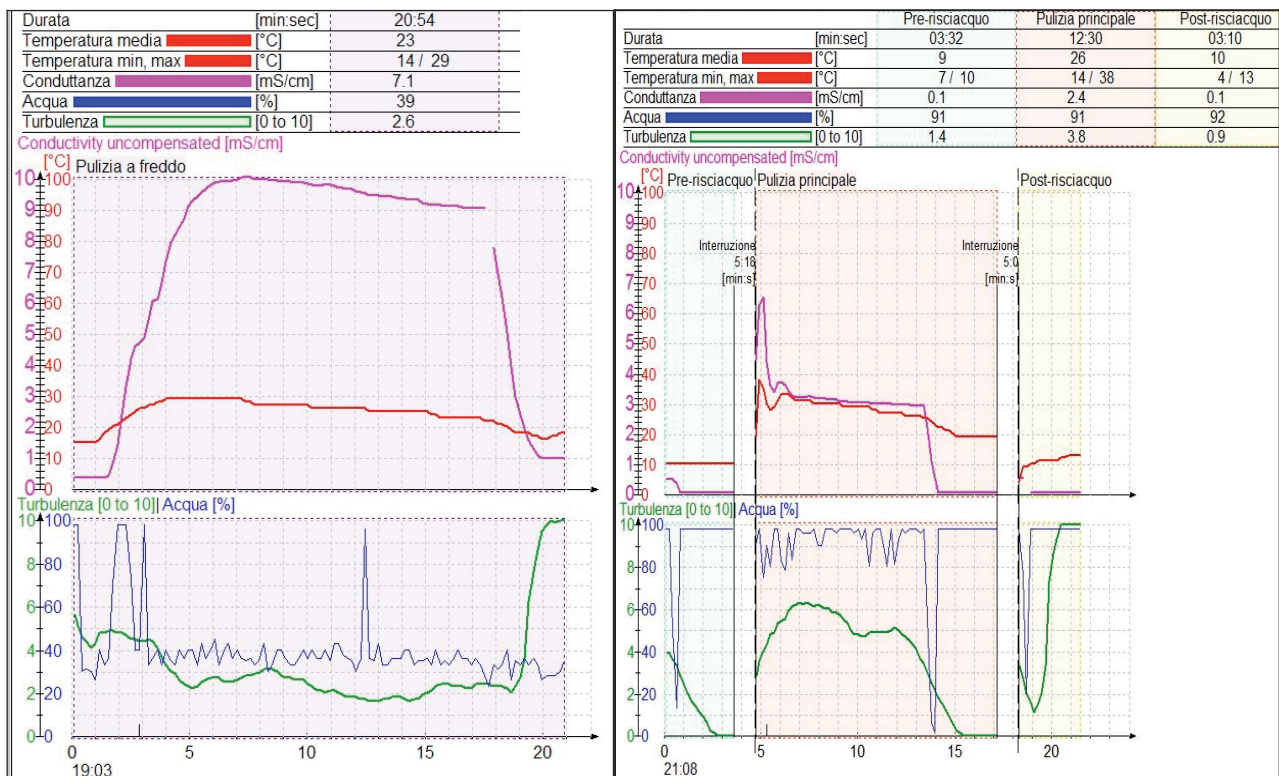
## Bioluminometro

Nel corso di ognuna delle 3 visite aziendali è stato valutato, prima dell'inizio della mungitura, il grado di contaminazione batterica di alcune superfici dell'impianto di mungitura (teste delle guaine e scarico del vaso terminale) e della sala di mungitura (pavimento delle poste e pareti della sala) utilizzando un bioluminometro (System Sure II, Labo-scientifica s.r.l., Parma, Italia). Lo strumento, portatile, viene impiegato per i controlli igienici rapidi di superfici e impianti ed è basato sulla rilevazione della presenza di ATP. La lettura della bioluminescenza che si ottiene con tale strumento è espressa come unità di luce ed è direttamente proporzionale alla quantità di ATP presente sui tamponi (RLU).

## Monitoraggio del lavaggio dell'impianto di mungitura

Per monitorare il lavaggio dell'impianto di mungitura sono stati utilizzati 2 flussometri elettronici (Lactocorder®, WMB, Balgach, Switzerland) per impianto, posizionati in corrispondenza del primo e dell'ultimo gruppo di mungitura, rispetto al punto di entrata dell'acqua di lavaggio (su impianti di grandi dimensioni si è usato un terzo flussometro posizionato su un gruppo intermedio).

Figura b - Rappresentazione grafica generata dal Lactocorder relativa all'andamento dei parametri del lavaggio dell'impianto di mungitura (con e senza divisione in fasi)



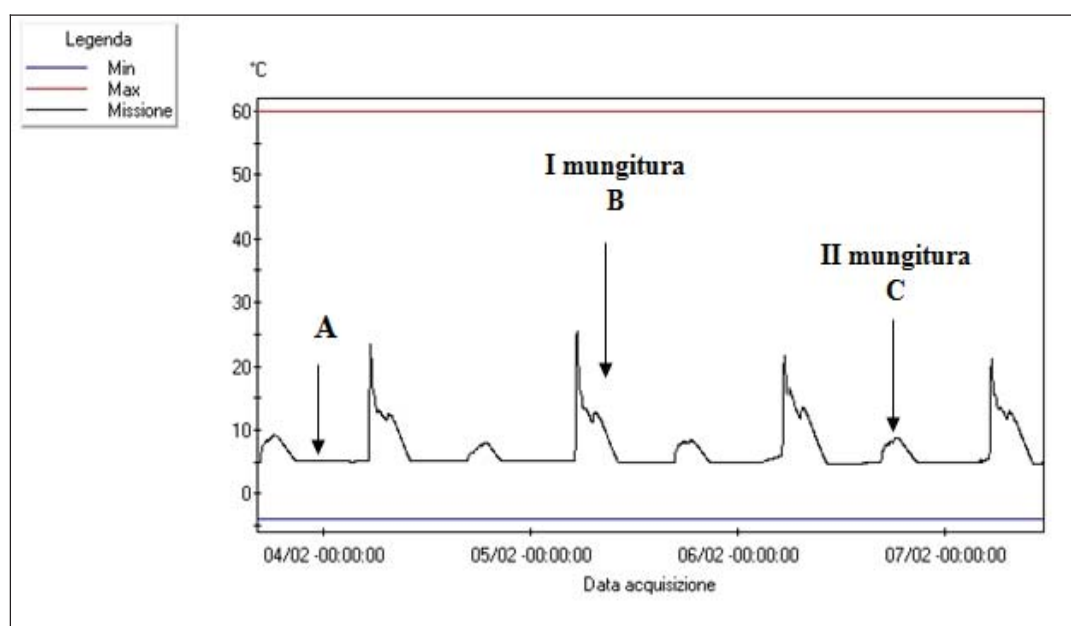
I flussometri impiegati erano dotati di uno specifico software per il monitoraggio del lavaggio.

Il software del Lactocorder genera un database con i valori medi, i minimi e i massimi di temperatura della soluzione, conducibilità elettrica, percentuale di acqua (riempimento) e turbolenza. Inoltre viene generato un grafico che schematizza l'andamento del lavaggio e l'eventuale divisione in fasi. Nella figura b è possibile vedere un grafico che riporta la divisione nelle 3 fasi (pre-risciacquo, fase principale di lavaggio e post-risciacquo) e un altro che invece riporta una unica fase. Lo strumento è in grado di suddividere le fasi e di calcolare i valori dei parametri per ogni fase solo quando vi sia interruzione del flusso d'acqua tra le fasi.

### Monitoraggio della temperatura del tank

La temperatura di stoccaggio del latte è stata monitorata utilizzando un termometro, opportunamente rivestito, dotato di datalogger in grado di registrare, ogni 2 min e per un periodo di 6 giorni successivi alla visita aziendale, l'andamento della temperatura del tank di refrigerazione del latte. Allo scopo il termometro è stato posizionato a circa 10 cm dal fondo del tank. I termometri impiegati per il monitoraggio delle temperature dei tank restituiscono i dati sotto forma di grafici, di cui un esempio è visibile nella figura c nella quale si individuano: la temperatura di stoccaggio (A, registrata nel periodo di tempo compreso tra le due mungiture giornaliere), la temperatura del latte in entrata nel tank vuoto (B) e le variazioni di temperatura del latte già stoccato all'arrivo del latte caldo appena munto in corrispondenza della mungitura (C). I picchi di temperatura più elevati sono dovuti all'innalzamento della temperatura causato dall'acqua di lavaggio.

Figura c - Tracciato relativo alle variazioni di temperatura del tank nel corso di 3 giorni



## Elaborazione dati e analisi statistica

I dati ottenuti dai questionari aziendali, dalle analisi di laboratorio e dai dati rilevati in campo sono stati elaborati statisticamente utilizzando il pacchetto statistico SAS (2001). Tutti i dati delle analisi microbiologiche sono stati sottoposti a trasformazione logaritmica ( $\log_{10}$ ) prima dell'analisi statistica. Sono state fatte analisi di tipo descrittivo utilizzando le procedure PROC MEANS e PROC FREQ. Per valutare l'effetto di alcune caratteristiche aziendali o gestionali sull'igiene del latte e dell'impianto di mungitura è stata utilizzata la PROC GLM. Le relazioni tra i fattori aziendali, gestionali e igienici del latte e dell'impianto di mungitura sono state valutate utilizzando l'analisi delle corrispondenze multiple PROC CORRESP.

L'analisi statistica della relazione fra le caratteristiche igieniche dell'azienda, le condizioni di integrità dello sfintere del capezzolo ed il rischio di presenza di batteri zoonosici nell'ambiente, latte o filtro, è stata effettuata definendo le appropriate tabelle di contingenza per gli indicatori di rischio e le relative variabili risposta (Rischio per), mediante procedure FREQ del software SAS (2001). Data la scarsa numerosità del campione, è stato considerato come significativo anche un valore di  $P < 0,1$ . Il rapporto di prevalenze e dei relativi limiti di confidenza è stato calcolato mediante software WIN Episcopo 2.0.





Finito di stampare  
nel mese di Ottobre 2010

Stand By Graph  
Via Arona, 95  
28021 Borgomanero (NO)





Regione Lombardia

Agricoltura

**Il sito della ricerca in agricoltura**  
**[www.agricoltura.regione.lombardia.it](http://www.agricoltura.regione.lombardia.it)**