

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO

Facoltà di Scienze Agrarie e Alimentari

Corso di Laurea Magistrale in Scienze agrarie



**EFFICACIA DELL'IMPIEGO DI BATTERIOCINE PER LA DISINFEZIONE DEI
CAPEZZOLI ALLA MUNGITURA**

Relatore: Prof.ssa Maddalena ZUCALI

Correlatore: Prof.ssa Renata PICCININI

Correlatore: Prof.ssa Anna Alfea SANDRUCCI

Tesi di Laurea di:

Maria Cecilia BIANCHI

Matr. 939813

Anno Accademico 2019/2020

INDICE

RIASSUNTO	5
PREMESSA	5
CAPITOLO 1 GLI ANTIMICROBICI	11
1.1 Gli antibiotici nel tempo	12
1.2 Antibiotico-resistenza	13
1.3 Non solo antibiotici	14
1.4 Antibiotici di Importanza Critica e accorgimenti d'uso	15
CAPITOLO 2 L'EUROPA E L'ITALIA CONTRO LA RESISTENZA AGLI ANTIBIOTICI IN ZOOTECNIA	17
CAPITOLO 3 ANTIBIOTICI E RESISTENZE NEGLI ALLEVAMENTI DI BOVINE DA LATTE	21
CAPITOLO 4 BUONE PRATICHE IN PREVENZIONE ALL'INSORGENZA DI MASTITI	23
4.1 La routine di mungitura	23
4.1.1 I prodotti pre-dipping e post-dipping tradizionali	27
4.2 Pulizia e disinfezione nel sistema mungitura	28
4.3 Teat apex score	29
4.4 Igiene score	30
CAPITOLO 5 PRODOTTI ALTERNATIVI IN PREVENZIONE E CURA ALLA MASTITE	32
5.1 Alternative agli antibiotici contro la mastite bovina	32
5.2 Le batteriocine	34
5.2.1 Sintesi delle batteriocine	34
5.2.2 I batteri dell'acido lattico	35
5.2.2 Le batteriocine nel settore zootecnico	37
CAPITOLO 6 SCOPO	39
CAPITOLO 7 MATERIALI E METODI UTILIZZATI	40
7.1 I prodotti utilizzati nella sperimentazione	40
7.2 Campionamenti e rilevazioni aziendali	41
7.2.1 Il prelievo di latte	43
7.2.2 Le valutazioni di igiene e salute degli animali	45
7.3 Le analisi in laboratorio	47

7.3.1 Analisi cito-batteriológica	48
7.4 Analisi dei dati	50
7.4.1 Conta delle cellule somatiche e analisi degli esiti batteriologici	51
7.4.2 Analisi di Hygiene Score e Teat Apex Score	53
7.4.3 Analisi della varianza	53
CAPITOLO 8 RISULTATI E DISCUSSIONE	55
8.1 La situazione aziendale nel 2019	55
8.1.1 Dati produttivi dell'anno 2019	55
8.1.2 Cellule somatiche nell'anno 2019	58
8.1.3 Effetto del numero di parto sui parametri analizzati	59
8.2 La situazione aziendale nel 2020	65
8.3 Risultati cito-batteriologici	67
8.4 Hygiene score e Teat apex score	76
8.4.1 Effetto dell'igiene degli animali e dello stato dei capezzoli sui parametri registrati	79
8.4.2 Evoluzione di Hygiene score e Teat Apex score nei due gruppi sperimentali	81
CAPITOLO 9 CONCLUSIONI	84
BIBLIOGRAFIA	86
SITOGRAFIA	93

RIASSUNTO

Negli ultimi anni, il problema dell'antibiotico-resistenza ha suscitato una certa preoccupazione a causa delle ripercussioni sanitarie, ambientali ed economiche che il fenomeno comporta in tutto il mondo. Nei paesi europei e aderenti al SEE, lo Spazio Economico Europeo, si stima che, nel corso del 2015, si siano verificati più di 670 000 casi di infezioni da batteri resistenti agli antibiotici, con circa 33 000 morti. Inoltre, emerge che l'Italia sia uno dei paesi con il maggior numero di casi legati a questo fenomeno. Il problema coinvolge, in modo complesso e interconnesso, numerosi ambiti e si ricercano da tempo nuove e diverse strategie per prevenirlo e contrastarlo. Un ruolo importante nel fenomeno dell'antibiotico-resistenza è svolto dalla zootecnia: l'utilizzo di antibiotici riguarda, infatti, il campo medico come il campo veterinario, e la situazione è aggravata dall'impiego frequente delle medesime molecole antibiotiche nell'uomo e negli animali. L'Italia, inoltre, risulta essere tra i primi paesi europei per uso di antibiotici in campo veterinario. Oltre all'antibiotico-resistenza, negli ultimi anni sono emerse resistenze riguardanti alcune sostanze chimiche, quali disinfettanti e composti a base di metalli, come il rame o lo zinco, spesso utilizzate in ambito zootecnico. Sembrerebbe, inoltre, che l'esposizione a concentrazioni sub-letali di biocidi favorisca l'insorgenza di fenomeni di co-resistenza verso alcuni antibiotici, come i fluorochinoloni, frequentemente impiegati in zootecnia. In aggiunta a ciò, occorre considerare il punto di incontro tra settore zootecnico e uomo: il consumo di alimenti di origine animale, il quale rende ancora più necessario il coinvolgimento di questo settore nel piano di contrasto al fenomeno delle resistenze.

L'obiettivo di questo studio è stato quello di analizzare la validità di un prodotto naturale come alternativa ai disinfettanti biocidi comunemente utilizzati durante la mungitura delle bovine da latte per la prevenzione delle mastiti. L'evidenza dell'efficacia di tale prodotto consentirebbe di prevenire e contenere le patologie mammarie, una tra le principali ragioni di impiego di antibiotici nell'allevamento delle vacche da latte; di conseguenza, sarebbero favoriti benessere e salute degli animali, e si abbatterebbero i costi dovuti all'infezione mammaria. Allo stesso tempo, si limiterebbero il consumo di sostanze disinfettanti e i relativi fenomeni di resistenza, e si ridurrebbe il rischio del passaggio di sostanze antibatteriche nel latte destinato alla caseificazione, e i conseguenti effetti negativi sul processo di trasformazione. Il prodotto sperimentale oggetto delle analisi, applicato in alternativa ai comuni prodotti di pre e post dipping, contiene una batteriocina prodotta da un ceppo di *Lac. lactis* subsp. *cremoris*. Questa molecola uccide i batteri target aprendo pori all'interno della parete batterica. La sperimentazione ha avuto luogo in una azienda della Pianura Padana di circa 120 vacche in lattazione. Le

bovine in lattazione presenti in azienda sono state divise in due gruppi di pari numero: il gruppo sottoposto al trattamento (T) e il gruppo di controllo (C), a cui erano applicati i prodotti di disinfezione tradizionali. Sono stati eseguiti 6 prelievi sterili di latte ogni due settimane (ad eccezione degli ultimi mesi, in cui i tempi si sono dilatati), nel periodo tra gennaio e maggio 2020. I campioni di latte venivano successivamente sottoposti ad analisi cito-batteriologicala in laboratorio. Durante le uscite di gennaio, febbraio e marzo un operatore si occupava di valutare le condizioni igieniche degli animali, tramite il metodo dell'Hygiene Score, e le condizioni degli apici capezzolari, mediante la metodica del Teat Apex Score. La sperimentazione ha dato i seguenti risultati: il 23% dei campioni è risultato positivo all'analisi batteriologicala; il 24% dei campioni ha avuto una conta delle cellule somatiche (CCS) pari o superiore a 200 000 cell/ml. Attraverso una analisi della varianza sulla CCS (\log_{10} cell/ml), sono emerse differenze significative tra i due gruppi, T e C (valori medi: 3,98 per il gruppo C, 3,61 per il gruppo T; valore di significatività= $1,92 \times 10^{-13}$ con $\alpha=0,05$). L'evoluzione delle infezioni intramammarie e della CCS dei due gruppi nel corso dei mesi ha mostrato che la percentuale di campioni positivi all'analisi batteriologicala, già prima dell'applicazione del prodotto sperimentale, risultava maggiore nel gruppo destinato al trattamento (7% T; 4% C) e così emerge anche nei rilevamenti successivi, ad eccezione del campionamento di maggio. In generale, le variazioni delle percentuali di animali infetti nei due gruppi sono sovrapponibili e non si rilevano peggioramenti evidenti negli animali del gruppo trattato. Quindi, come risulta anche da altri studi sperimentali, si ipotizza che il nuovo prodotto abbia un effetto di controllo delle infezioni del tutto analogo a quello dei prodotti tradizionali. Per quanto riguarda l'andamento della CCS, sono stati considerati i valori logaritmici decimali medi: i conteggi più alti sono stati rilevati nel gruppo di controllo per quasi tutta la durata della sperimentazione. Tra il mese di aprile e maggio, il differente andamento tra i due gruppi si inverte e sarebbe stato interessante eseguire campionamenti successivi per ricercarne la causa. Complessivamente, si può solo affermare che, ad eccezione dell'ultima rilevazione, il livello di cellule somatiche nel gruppo T è rimasto relativamente costante; in tale gruppo, inoltre, le variazioni riguardanti questo dato sono inferiori rispetto al gruppo di controllo, fatto che lascia ben sperare riguardo all'efficacia del prodotto sperimentale. Il prodotto a base di batteriocine, ad eccezione dell'ultimo rilevamento, non sembra aver influito negativamente sulla CCS dei campioni di latte, come invece era avvenuto in altre prove sperimentali. Per quanto riguarda le valutazioni di Hygiene Score, si è ricercata una possibile influenza dello stato di imbrattamento degli animali sulle differenze nella conta di cellule somatiche tra i gruppi T e C. Le percentuali di bovine con punteggio pari o superiore a 3 nella valutazione dell'igiene dell'animale sono aumentate nel corso della prova, sia nel gruppo T (da gennaio a marzo si passa da un 42% a un 50%), sia nel gruppo C (54% a gennaio e 61% a marzo). Il fatto di non aver registrato particolari peggioramenti nelle analisi cito-batteriologicalhe del gruppo T, nonostante il peggioramento dello stato di igiene degli animali, può essere considerato un risultato positivo. Successivamente, sono state esaminate le valutazioni di Teat Apex Score per comprendere se l'utilizzo del prodotto sperimentale potesse aver favorito o meno la cheratinizzazione dei capezzoli

nel tempo. Effettivamente, nel gruppo di animali trattati si sono osservate valutazioni delle condizioni dei capezzoli mediamente migliori, ma l'ipotesi avanzata è da confermarsi solo attraverso altri studi.

In conclusione, l'applicazione di un prodotto a base di batteriocine ha dato risultati positivi e paragonabili ai prodotti tradizionali sul fronte della analisi batteriologica. Inoltre, sembra che i nuovi prodotti non abbiano influito negativamente sulla conta delle cellule somatiche del latte: le variazioni registrate nel gruppo trattato non sono state maggiori di quelle del gruppo di controllo. Nonostante i buoni risultati ottenuti, si ritengono necessarie ulteriori prove sperimentali. Inoltre, sarebbe interessante analizzare i risultati di una sperimentazione simile con la possibilità di escludere ulteriori fattori che solitamente influiscono sulla conta delle cellule somatiche e sulla frequenza dei batteri patogeni, non indagati in questo studio, come, ad esempio, produttività degli animali, flusso e durata della fase di plateau durante la mungitura, tipo di stabulazione e condizioni igieniche della stalla, presenza di altre patologie e condizioni di stress.

PREMESSA

Con questa premessa, si vuole fornire una visione d'insieme del fenomeno dell'antibiotico-resistenza, che si sviluppa in uno scenario multisetoriale e che vede coinvolti e concatenati diversi ambiti.

Si stima che nei paesi europei e aderenti al SEE, Spazio Economico Europeo, nel corso del 2015, si siano verificati più di 670 000 casi di infezioni da batteri resistenti agli antibiotici, con circa 33 000 morti a causa di questo tipo di infezioni. Dallo stesso studio, emerge che l'Italia sia uno dei paesi con il maggior numero di casi legati a questo fenomeno (Cassini et al., 2019). Nella comunicazione¹ della commissione al consiglio e al parlamento europeo riguardante il Piano d'azione "One Health" contro la resistenza antimicrobica, si riporta che, senza tempestivi interventi nei confronti di questo problema, entro il 2050, in tutto il mondo, le infezioni batteriche potrebbero arrivare a causare più morti del cancro.

Il fenomeno dell'antibiotico-resistenza è stato fin da subito riconosciuto dall'Unione Europea come un problema attuale e oneroso, che ha portato l'industria farmaceutica, negli ultimi 20 anni, a grossi investimenti nella ricerca di nuovi prodotti antimicrobici. Ciononostante, l'insorgenza di resistenza verso gli antibiotici sul campo è in aumento e occorrono nuove strategie per contrastare questo fenomeno.

Si rileva, inoltre, che la sempre più frequente insorgenza di resistenza da parte dei più comuni agenti patogeni comporta ingenti danni, non solo dal punto di vista sanitario e ambientale, ma anche dal punto di vista economico. Dai dati pubblicati nel 2019 dall'Organizzazione per la Cooperazione e lo Sviluppo Economico (OCSE), si stima, infatti, che tra il 2015 e il 2050, nei paesi UE e SEE,

¹ Bruxelles, 29.6.2017. COM (2017) 339 final.

verranno spesi più di 1,1 miliardi di euro all'anno per far fronte ai costi sanitari connessi alle infezioni da batteri antibiotico-resistenti.

Risulta evidente che il fenomeno dell'antibiotico-resistenza coinvolga in modo complesso più settori. Allo stesso modo occorre intervenire per contrastarlo: agendo, contemporaneamente, coinvolgendo più ambiti e con l'ausilio di diverse strategie.

Da non trascurare, in primis, ciò che concerne la divulgazione di informazioni riguardo al fenomeno, sia tra esperti del settore, sia nei confronti dei cittadini. In un report del 2016, riguardante un'indagine speciale sull'uso di antibiotici da parte degli europei, solo il 33% degli intervistati dichiara di aver ricevuto, nei dodici mesi precedenti, informazioni riguardo all'importanza di assumere sostanze antibiotiche solo per provata necessità. Una simile percentuale era stata riportata anche nel precedente report del 2013. Se si considerano solo i dati italiani, poi, la percentuale di questo dato si abbassa al 15%.

Un settore le cui azioni potrebbero avere grande rilievo nella lotta contro l'antibiotico-resistenza è il settore zootecnico. L'Italia, in particolare, risulta essere uno tra i principali paesi europei per uso di antibiotici in campo veterinario. Il peso di questo settore non è dovuto solo all'importante consumo di sostanze antibiotiche per la cura di animali, ma anche al fatto che molte di queste sostanze sono le stesse usate in campo medico; spesso, inoltre, i patogeni infettano ospiti sia umani, sia animali, e molte delle malattie causate da questi agenti patogeni sono zoonosi, quindi trasmissibili all'uomo, per esempio, attraverso il consumo di alimenti di origine animale infetti. Risulta evidente, quindi, quanto i diversi settori siano interconnessi e quanto sia importante un'azione sinergica da più parti.

L'obiettivo di questo elaborato è quello di analizzare, nello specifico, la sperimentazione di un prodotto naturale come alternativa ai disinfettanti biocidi comunemente utilizzati nel settore zootecnico delle bovine da latte. Si tratta di un prodotto a base di batteriocine, molecole proteiche ad alta attività antimicrobica, prodotte da determinati batteri per la difesa da altri

microrganismi. Gli studi e le sperimentazioni più recenti sembrerebbero, infatti, confermare l'efficacia di queste molecole nei confronti dei principali agenti patogeni mastidogeni (Klostermann et al., 2008; Brasca et al., 2018). L'efficacia di questo prodotto naturale permetterebbe, quindi, di ridurre il rischio di insorgenza di infezioni mammarie e il conseguente trattamento antibiotico.

CAPITOLO PRIMO

GLI ANTIMICROBICI

Si definisce antimicrobica una *“qualsiasi sostanza di origine naturale, semi-sintetica o sintetica che a concentrazioni in vivo uccide i microrganismi o ne inibisce la crescita interagendo con un target specifico»*². Secondo il codice sanitario per gli animali terrestri, gli antielmintici³ e le sostanze classificate come disinfettanti o antisettici sono esclusi dalla presente definizione.

Sono considerati antimicrobici gli antibatterici, attivi nei confronti di batteri, gli antivirali, che contrastano infezioni da virus, gli antimicotici, inibenti organismi responsabili di micosi, e gli antiprotozoici, attivi contro i protozoi. Gli antimicrobici possono essere di origine naturale, generalmente definiti antibiotici, oppure di origine unicamente sintetica, chiamati chemioterapici.

Queste sostanze rivestono una grande importanza nella prevenzione e nella cura delle infezioni in campo medico, umano e veterinario.

In zootecnia, in particolare, gli antibiotici hanno avuto per molti anni un ruolo fondamentale per lo sviluppo degli allevamenti intensivi e, ancora oggi, in assenza di terapie alternative, sono indispensabili per preservare la salute degli animali e mantenere performance produttive sostenibili. L'insorgenza di infezioni negli animali influenza il loro stato di benessere e il loro livello produttivo, influisce sui costi di gestione e di produzione dell'allevamento e ha effetti negativi sull'efficienza produttiva dello stesso e, quindi, sull'impatto ambientale (Macrì, 2017).

² Comunicazione della Commissione europea. Linee guida sull'uso prudente degli antimicrobici in medicina umana (2017/C 212).

³ (dal gr. αντί "contro" e ἔλμινς "verme"). Rimedi adoperati a combattere quello stato morboso che chiamasi elmintiasi, da elminti o vermi, parassiti del canale intestinale (Enciclopedia Treccani).

1.1 Gli antibiotici nel tempo

Già tra la fine del XIX secolo e l'inizio del XX, l'utilizzo esclusivo di sostanze naturali come rimedio alle malattie infettive inizia ad essere ritenuto insufficiente. Hanno luogo, in modo sempre più approfondito, sperimentazioni di laboratorio per lo studio di nuove sostanze. Si parla di “rivoluzione farmacologica” con la comparsa dei farmaci di sintesi, prodotti dalle prime industrie farmaceutiche, ma non si trattava ancora di sostanze efficaci direttamente sui microrganismi. All'inizio del Novecento si approfondiscono inoltre gli studi riguardanti la competitività biologica tra specie; viene scoperta e soprattutto compresa l'importanza della penicillina.

Nel 1928, Alexander Fleming individua l'azione selettiva di un micete, *Penicillium notatum*, su alcune colonie batteriche. Da questa muffa otterrà poi la “penicillina” in grado di, come scrisse lo stesso batteriologo scozzese, “svolgere un'azione selettiva batteriostatica e batteriocida per molti dei più comuni germi patogeni”. L'anno successivo viene comunicato ufficialmente alla comunità scientifica che “*la penicillina avrebbe potuto essere utile nella cura delle infezioni*”.

Nel 1939, un biochimico, Ernst Boris Chain, e un patologo, Howard Walter Florey, riescono a concentrare la penicillina, stabilizzandola, e a dimostrarne l'azione terapeutica.

Nel 1942, continuano gli studi sulla penicillina e, grazie a sperimentazioni cliniche più approfondite, si arriva rapidamente, con la fine della guerra, alla commercializzazione e alla diffusione del farmaco, prima negli Stati Uniti, poi nei paesi europei. Nello stesso anno, viene utilizzato per la prima volta, dal biologo Selman Abraham Waksman, il termine “*antibiotico*” per definire, in campo medico, una sostanza ad azione antibatterica.

Nel 1945, a Fleming, Chain e Florey viene assegnato il premio Nobel per la medicina.

L'utilizzo di antibiotici, in associazione ad altri importanti fattori, come l'aumento del benessere sociale ed economico e il miglioramento delle condizioni igieniche, ebbe un grande impatto sul miglioramento qualitativo e sul prolungamento della vita umana. Negli anni successivi procedettero la scoperta e l'isolamento di nuovi antibiotici.

Ben presto però, si presentarono difficoltà sempre più evidenti nella eliminazione di alcune infezioni. Si verificarono casi di inefficacia dell'attività di alcune sostanze antibiotiche nei confronti di alcuni agenti patogeni e si procedette con la somministrazione di dosi sempre più importanti di antibiotici per contrastare la resistenza presentata da parte di alcuni ceppi batterici. Nello stesso tempo, una negligenza nel controllo sull'utilizzo di queste sostanze, spesso somministrate in modo spropositato o senza un giustificato motivo, contribuì all'insorgenza del fenomeno della resistenza agli antimicrobici, e, più nello specifico, dell'antibiotico-resistenza.

1.2 Antibiotico-resistenza

L'antibiotico-resistenza è un fenomeno biologico naturale; può essere definita intrinseca, se un microrganismo, già per sua natura, non è sensibile all'azione di un determinato antibiotico, oppure può svilupparsi, come conseguenza di mutazioni genetiche e selezione naturale, in individui che, in precedenza, invece, manifestavano sensibilità verso un certo antibiotico; si parla allora di resistenza acquisita.

Le mutazioni che si fissano nella popolazione più rapidamente sono quelle che permettono una maggior probabilità di sopravvivenza all'organismo in cui si manifestano; in questi termini, la capacità di sopravvivere a determinati

antibiotici è definita resistenza agli stessi. Va ricordato, inoltre, che alcuni microrganismi, come i batteri, hanno una velocità riproduttiva estremamente elevata; ciò aumenta notevolmente la rapidità di sviluppo di un fenomeno di resistenza in un ceppo batterico.

La resistenza agli antibiotici, che sia essa intrinseca o acquisita, generalmente non è estesa a tutte le sostanze attive antimicrobiche. I microrganismi possono essere resistenti ad un tipo di antibiotico ma sensibili ad altri, e viceversa. Quando un agente patogeno manifesta resistenze nei confronti di quattro o più classi di antibiotici, si parla di resistenza multipla.

L'uso improprio e/o spropositato di antibiotici, somministrati, per esempio, non solo a scopo terapeutico, ma anche profilattico o auxinico, come in alcuni allevamenti prima che ne venisse vietato l'uso, e la conseguente pressione selettiva esercitata sui microrganismi, dovuta, in parte, al crescente inquinamento ambientale da antimicrobici, hanno agevolato il processo di trasmissione di queste mutazioni vincenti, rendendo inefficaci molti principi attivi, in medicina sia umana, sia animale.

Nel 2018, a livello europeo e del SEE, oltre la metà (58,3%) degli isolati di *Escherichia coli* da pazienti umani, segnalati alla rete europea di sorveglianza della resistenza antimicrobica (EARS-Net), erano resistenti ad almeno uno dei gruppi antimicrobici sotto sorveglianza regolare. Sempre nel 2018, è stata segnalata la più alta percentuale di resistenza media per popolazione europea e del SEE nei confronti di aminopenicilline (57,4%).

1.3 Non solo antibiotici

La resistenza acquisita si può manifestare attraverso due modalità: grazie a una mutazione genetica del microrganismo che acquisisce la resistenza, oppure grazie a geni di resistenza, come per esempio gli episomi o plasmidi, trasferiti

all'agente responsabile dell'infezione da altri organismi. Alcuni di questi elementi genetici trasferibili sono in grado di conferire resistenze multiple, non solo nei confronti di sostanze antibiotiche, ma anche di sostanze chimiche, quali disinfettanti o composti di metalli, come il rame o lo zinco, spesso utilizzati in ambito zootecnico. L'esposizione a concentrazioni sub-letali di biocidi sembrerebbe favorire, inoltre, l'insorgenza di fenomeni di co-resistenza anche nei confronti di alcuni antibiotici, come i fluorochinoloni, molecole utilizzate frequentemente in campo zootecnico (Randall et al., 2007; Davies et al., 2019).

1.4 Antibiotici di Importanza Critica e accorgimenti d'uso

Esiste una categoria di antimicrobici ritenuta di importanza critica per l'uomo, poiché utilizzata per il trattamento di infezioni di una certa rilevanza e per le quali, solitamente, non sono disponibili terapie alternative; si tratta degli Antibiotici di Importanza Critica (CIA).

L'elenco di questi agenti antimicrobici viene continuamente aggiornato dall'Organizzazione Mondiale della Sanità, con lo scopo di agevolare l'uso accorto di queste sostanze in medicina umana, e, quindi, in campo veterinario. Un elenco simile è stato stilato, infatti, anche dall'Organizzazione mondiale della sanità animale: si parla, in questo caso, di Antibiotici di Importanza Critica Veterinari (VCIA). Sono riportate, inoltre, dall'Organizzazione Mondiale della Sanità Animale, raccomandazioni d'uso riguardo ad alcune di queste sostanze, come le cefalosporine di ultima generazione, i fluorochinoloni e i macrolidi:

- non devono essere impiegate in assenza di segni clinici, per trattamenti somministrati in mangime o acqua;
- non devono essere impiegate per il trattamento di prima linea, se non per motivi giustificati e basati sui risultati di test di sensibilità;

- il trattamento a tappeto deve essere limitato e riservato a casi in cui non vi sia alcuna alternativa disponibile.

È fondamentale prestare attenzione alla scelta della molecola da utilizzare per evitare, dove possibile, la prescrizione di VCIA. Prima di prescrivere un farmaco, è necessario, inoltre, conoscere in modo approfondito lo stato sanitario dell'allevamento e dell'animale da trattare, attraverso, per esempio, diagnosi clinica, isolamento batterico e antibiogramma. L'antibiogramma è uno strumento indispensabile per individuare tra gli antibiotici quali e in che misura siano più efficaci nei confronti del patogeno da debellare.

Oltre a ciò, è importante seguire le indicazioni riguardanti tempi e dosaggi del trattamento e, se possibile, scegliere antimicrobici con uno spettro d'azione ristretto, evitando quelli impiegati in medicina umana.

Queste indicazioni non valgono solo per le molecole classificate come VCIA, ma si tratta di importanti procedure da seguire per qualsiasi trattamento antimicrobico terapeutico, con l'obiettivo di ridurre il più possibile l'insorgenza di antibiotico-resistenza.

Da alcune analisi in campo emerge, purtroppo, che non sempre la procedura di somministrazione di un farmaco antimicrobico viene eseguita in modo corretto. In uno studio sui consumi e sulle modalità di impiego di antibiotici nell'allevamento di bovini da latte, condotto in 50 aziende della provincia di Piacenza, si riporta che solo il 18% degli allevamenti eseguiva esami batteriologici e antibiogrammi in modo sistematico prima di effettuare un trattamento; il 10%, poi, eseguiva esami diagnostici solo in modo sporadico. Nel 78% degli allevamenti, inoltre, non venivano pienamente rispettate le indicazioni riguardo alla durata delle terapie, e, nel 76% delle aziende, non si seguivano gli esatti dosaggi dei prodotti antimicrobici utilizzati. In molti casi, poi, l'allevatore stesso non era consapevole dello stato sanitario effettivo dei suoi animali (Lanza et al., 2015).

CAPITOLO SECONDO

L'EUROPA E L'ITALIA CONTRO LA RESISTENZA AGLI ANTIBIOTICI IN ZOOTECCIA

Una volta riscontrata l'importanza del problema di uso e abuso delle sostanze antibiotiche anche nel settore zootecnico, sono stati presi provvedimenti: a livello europeo sono stati emanati regolamenti e direttive, recepiti poi, a livello nazionale, da decreti legislativi.

Attualmente, in Europa, si fa riferimento al Regolamento 2019/6 del Parlamento europeo e del Consiglio dell'11 dicembre 2018, per quanto riguarda *“immissione sul mercato, fabbricazione, importazione, esportazione, fornitura, distribuzione, farmacovigilanza, controllo e impiego dei medicinali veterinari”*. Lo stesso regolamento ha validità per sostanze con proprietà anaboliche, antinfettive, antiparassitarie, antinfiammatorie, ormonali, stupefacenti o psicotrope e che possono essere utilizzate negli animali. Non sono compresi nella regolamentazione gli additivi per mangimi, da cui sono però esclusi gli antibiotici, come riportato nell'articolo 5 del Regolamento (CE) n. 1831/2003 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 22 settembre 2003, sugli additivi destinati all'alimentazione animale.

La definitiva eliminazione, a livello europeo, di antibiotici intesi come additivi alimentari (diversi da coccidiostatici e istomonostatici) ha come data di riferimento il primo gennaio 2006 (reg. 1831/2003). Al bando, a partire da quell'anno, l'uso di antibiotici come promotori di crescita o a scopo profilattico

in animali da reddito⁴. Lo stesso divieto sarà poi emanato anche in USA, nel 2018.

Va sottolineato, però, che le normative messe a punto a livello europeo e nazionale sono indispensabili, ma non sufficienti a ridurre il fenomeno dell'antibiotico-resistenza. Fondamentali sono anche le diverse agenzie, autorità e organizzazioni, e le iniziative e i progetti di collaborazione internazionale contro il fenomeno dell'antibiotico-resistenza.

A livello comunitario, un ruolo di rilievo va attribuito all'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA), a cui ogni anno vengono conferiti i dati relativi al flusso delle zoonosi, poi comunicati alla Comunità Europea attraverso report di sintesi. EFSA è, inoltre, in collaborazione con il Centro Europeo per la prevenzione e il Controllo delle Malattie (ECDC), il quale ha lo scopo di identificare, valutare e comunicare i pericoli per la salute pubblica connessi a tutte le malattie infettive, conosciute ed emergenti, incluse quelle provocate da agenti zoonotici. ECDC coordina, poi, la Sorveglianza Europea dell'Antibiotico-resistenza (EARSS) e la Sorveglianza del Consumo di Antibiotici (ESAC), le quali gestiscono le reti EARS-Net ed ESAC-Net per la raccolta di dati da parte dei paesi europei.

Nel 2011, a Bruxelles, viene definito un piano⁵ d'azione di lotta ai crescenti rischi di resistenza antimicrobica. Nella comunicazione si parla dell'approccio europeo "One Health", termine che sarà, nel 2016, utilizzato nella dichiarazione politica delle Nazioni Unite sulla resistenza antibiotica.

Con il termine "One Health" si fa riferimento ad un approccio integrato volto a considerare un'interconnessione tra uomo, animali, ambiente; secondo questa considerazione, risulta doverosa la collaborazione tra diversi settori: medicina, veterinaria, allevamento, agricoltura, ambiente e commercio.

⁴ Parlamento europeo e Consiglio europeo, (2003). Regolamento (CE) n. 1831/2003 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 22 settembre 2003, relativo agli additivi destinati all'alimentazione animale. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea*, 46, 29 - 43.

⁵ COM (2011) 748 definitivo.

Il 30 giugno 2017 la Commissione Europea adotta lo “European One Health Action Plan against Antimicrobial Resistance”.

Promotori di questo approccio integrato sono l’Organizzazione Mondiale per la Sanità (OMS), l’Organizzazione delle Nazioni Unite per l’Alimentazione e l’Agricoltura (FAO) e l’Organizzazione Mondiale della Sanità Animale (OIE).

Per quanto riguarda l’Italia, di una certa importanza è il ruolo del Ministero della Salute nella strategia nazionale contro l’antibiotico-resistenza: sono state pubblicate da parte del Ministero della Salute, infatti, diverse Linee Guida, utili a fornire alle Autorità competenti, ai veterinari aziendali e agli operatori di settore indicazioni pratiche sull’uso prudente degli antimicrobici in zootecnia. Il Ministero della Salute, inoltre, dal 2010, partecipa al progetto “The European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption” (ESVAC), il cui obiettivo è raccogliere informazioni sull’utilizzo di farmaci antimicrobici negli animali, da parte dei paesi di tutta l’Unione Europea (UE28). ESVAC è gestito dall’Agenzia Europea per i Medicinali (EMA), la quale, ogni anno, pubblica un rapporto sulle vendite di antibiotici veterinari. L’EMA ha sviluppato una strategia per il periodo 2016-2020, volta a consentire l’analisi delle tendenze nel consumo di antimicrobici per specie animale, utilizzando dati standardizzati tra i diversi paesi europei.

Sempre in Italia, dal 2014, è attivo il Piano di monitoraggio armonizzato della resistenza agli antimicrobici nei batteri zoonotici e commensali, ai sensi della Dec. 2013/652/EU.

È inoltre attivo il Piano Nazionale di Contrasto dell’Antimicrobico-Resistenza (PNCAR 2017-2020), con lo scopo di fornire un *“indirizzo coordinato e sostenibile per contrastare il fenomeno dell’AMR (antimicrobico resistenza) a livello nazionale, regionale e locale”*. Il PNCAR ha come riferimento l’approccio “One Health”; l’obiettivo principale del piano è ridurre la frequenza, sia di infezioni da microrganismi resistenti agli antibiotici, sia di infezioni associate all’assistenza sanitaria ospedaliera e comunitaria; in particolare, il PNCAR ha, entro il 2020, i seguenti obiettivi, in termini di mg/PCU:

- $\leq 30\%$ consumo di antibiotici totali;
- $\leq 30\%$ consumo di antibiotici somministrati per via orale;
- $\leq 10\%$ consumo di VCIA;
- consumo di colistina a un livello di 5 mg/PCU.

Grazie alla collaborazione di diversi attori, anche a livello internazionale, e all'impiego di interventi olistici e integrati, si sono già ottenuti alcuni risultati positivi che lasciano ben sperare nell'efficacia di questo approccio.

Per esempio, nell'ultimo rapporto ESVAC del 2019, si riporta che, in generale, tra il 2011 e il 2017, le vendite di antibiotici per animali, in Europa, sono diminuite più del 32%, e che, nello specifico, sono diminuite del 66% le vendite di polimixine, e di oltre il 20% le vendite di cefalosporine di terza e quarta generazione.

Si tratta però di dati sommari; nei capitoli successivi si analizzeranno, più nello specifico, i dati riguardanti gli allevamenti di bovini da latte.

CAPITOLO TERZO

ANTIBIOTICI E RESISTENZE NEGLI ALLEVAMENTI DI BOVINE DA LATTE

Gli allevamenti bovini, a differenza di quanto avviene per altre specie zootecniche, non sono tra i principali consumatori di antibiotici. Si stima che, in Europa, vengano venduti ogni anno circa 1300 tonnellate di antibiotici per le specie DPA, destinate a produzione di alimenti, e, di queste, solo l'1,38%, è destinato alla specie bovina⁶. Nonostante ciò, anche l'allevamento della vacca da latte ha un suo peso relativamente importante e risulta fondamentale affrontare il problema dell'antibiotico-resistenza anche in questo settore.

Si stima che circa il 68% degli antibiotici utilizzati negli allevamenti di bovine da latte sia impiegato per la cura di mastiti. In particolare, il 24% di sostanze antibiotiche è somministrato per la cura di mastite clinica in vacche in lattazione e il 44% per trattamenti di terapia durante il periodo di asciutta (Kuipers et al., 2016).

La mastite è la patologia economicamente più impattante nel settore delle bovine da latte (De Jong et al., 2018), poiché implica costi di una certa rilevanza per l'allevatore, da oltre 50 a quasi 350 euro/capo/anno (Daprà et al., 2006). Un caso di mastite in allevamento comporta, solitamente, le spese per la terapia, i costi dovuti allo scarto del latte e a un maggior carico di lavoro, una ridotta produzione, eventuali costi di abbattimento e di sostituzione degli animali infetti.

Nonostante lo studio di approcci terapeutici alternativi agli antibiotici, o complementari al loro utilizzo, sembrerebbe promettere ottimi risultati per il futuro, ad oggi, non esistono ancora alternative valide alle sostanze

⁶ Dati AISA (Associazione Nazionale Imprese Salute Animale) relativi al rapporto ESVAC 2018.

antimicrobiche per il trattamento delle mastiti (Gomes e Henriques, 2016). Dati alla mano, risulta che il trattamento antimicrobico sia indispensabile per gestire la salute e il benessere animale e, contemporaneamente, gli aspetti economici aziendali (Krömker et al., 2017), anche se non assicura sempre la guarigione dell'animale e può comportare il rischio di favorire l'insorgenza di resistenza e del permanere nel latte di residui delle molecole utilizzate.

È provato che anche nel settore bovino l'utilizzo indiscriminato di sostanze antibiotiche promuova l'insorgenza di resistenze microbiche nel latte (Call et al., 2008). Inoltre, la presenza di residui di antibiotici nel latte destinato alla caseificazione, anche in modeste quantità, comporta limitazioni per lo sviluppo e l'attività di batteri impiegati come starter (Moretti et al., 2016).

È urgente, quindi, una continua ricerca di trattamenti alternativi e innovativi (Gomes e Henriques, 2016), non solo per la cura, ma soprattutto per la prevenzione delle mastiti, poiché queste, ad oggi, comporteranno l'inevitabile utilizzo di antibiotici.

Prima di analizzare quali siano i prodotti alternativi agli antibiotici, occorre sottolineare che, nella prevenzione all'insorgenza delle infezioni, in qualsiasi allevamento animale, un ruolo importante è giocato da biosicurezza, igiene e disinfezione dell'ambiente di allevamento e del personale, da una corretta routine di lavoro (gestire, per esempio, nel corso della giornata, prima gli animali più giovani e poi gli adulti, e mai viceversa), da un impiego idoneo di sostanze disinfettanti (Davies et Wales, 2019), e, in particolare, nelle aziende di bovine da latte, da una corretta routine di mungitura e, durante la stessa, dalla valutazione periodica dello stato di igiene e salute della mammella. Sembra esistere, infatti, una correlazione positiva tra la frequenza di mammelle sporche e l'insorgenza di nuove infezioni intramammarie (Schreiner et Ruegg, 2003). Il prossimo capitolo sarà dedicato proprio ad alcuni degli approcci preventivi, di cui appena accennato, da adottare nelle aziende di bovini da latte.

CAPITOLO QUARTO

BUONE PRATICHE IN PREVENZIONE ALL'INSORGENZA DI MASTITI

4.1 La routine di mungitura

I processi e le operazioni coinvolti nella mungitura compongono un sistema complesso, volto a garantire sicurezza e igiene di operatori, animali e ambiente circostante, benessere e salute per le bovine e alta qualità della produzione. È fondamentale, perciò, che ogni aspetto facente parte di questo sistema venga seguito con rigore e cura.

Di particolare importanza in questi termini è la routine di mungitura, che comprende una serie di operazioni svolte prima, durante e dopo l'attacco degli animali ai gruppi. Le operazioni vengono eseguite in modo sequenziale, attenendosi a tempistiche ben precise; di seguito, si vuole presentare l'elenco dei vari passaggi di una routine di mungitura eseguita correttamente:

1. Rapida pulizia della mammella per rimuovere eventuali imbrattamenti;
2. Forestripping, ovvero eliminazione e controllo dei primi getti di latte, (almeno tre per capezzolo); pratica prevista per legge⁷ con lo scopo di individuare eventuali anomalie del latte, come la presenza di sangue o coaguli di latte, utili e tempestivi indicatori di mastite, e di eliminare il latte della cisterna del capezzolo, caratterizzato, solitamente, da una carica batterica più elevata. Per una buona qualità della mungitura, l'eliminazione dei primi getti è fondamentale poiché induce l'emissione del latte a seguito dell'eiezione di ossitocina ipofisaria. Da studi recenti, è emerso che la percentuale di stalle lombarde che effettua

⁷ REGOLAMENTO CE N. 853/2004.

regolarmente forestripping è ancora insufficiente (<60%), con il rischio che latte mastitico sia convogliato nel tank e con possibile ritardo nella cura delle mastiti⁸;

3. Pre-dipping. Applicazione di un prodotto disinfettante su tutto il capezzolo; deve agire per almeno trenta secondi. Consente un elevato abbattimento (del 70% circa) di batteri sulla parte esterna del capezzolo e mantiene la pelle liscia e morbida, facilitando la rimozione della sporcizia;
4. Dopo circa 60-90 secondi dalla disinfezione, pulizia più accurata dei capezzoli, con particolare attenzione all'apice capezzolare. La pulizia dei capezzoli permette di ridurre la carica batterica della mammella e il rischio di mastiti. I materiali più idonei sono tessuti umidi, fazzoletti di carta o salviette imbevute in disinfettanti monouso;
5. Attacco del gruppo di mungitura, evitando il più possibile entrata di aria e fluttuazioni del vuoto. Il gruppo va, poi, posizionato in modo da distribuire equamente il peso sui quattro quarti e favorirne, così, lo svuotamento;
6. A fine mungitura, stacco del gruppo dopo la chiusura del vuoto; da evitare la sovrampungitura, ovvero la mungitura con parziale o assente flusso di latte, operazione che potrebbe provocare lesioni agli sfinteri dei capezzoli e ipercheratosi del tessuto. Casi di sovrampungitura frequenti possono comportare, inoltre, un aumento di cellule somatiche nel latte, parametro, di norma, utilizzato come indicatore di mastite, e una maggior frequenza di casi di infezione mammaria.
7. Post-dipping. Il prodotto di post-dipping va applicato su tutta la superficie del capezzolo, nel più breve tempo possibile dallo stacco del gruppo. I prodotti post-mungitura creano un film protettivo, possono ridurre il numero di batteri sulla cute del capezzolo e, allo stesso tempo,

⁸ Manuale di buone pratiche di mungitura. Realizzato nell'ambito del progetto META - Mungitura: Efficienza, sostenibilità e qualità, con Piano di Sviluppo Rurale della Regione Lombardia 2014-2020.

proteggere l'orifizio stressato dopo la mungitura, impedendo l'ingresso al canale capezzolare a batteri patogeni (Murphy e Boor, 2000).

Da numerosi studi, risulta che le operazioni di mungitura rivestano un ruolo di grande importanza nella prevenzione all'insorgenza di infezioni mammarie delle bovine da latte. Il sistema mungitura, infatti, influenza notevolmente anche la contaminazione batterica del latte (Sandrucci et al., 2010). In particolare, l'associazione di due o più operazioni di mungitura (tra le tre considerate di maggiore importanza, ovvero *forestripping*, *pre-dipping* e *post-dipping*) ha mostrato un effetto positivo sulla qualità microbiologica del latte e sulla conta delle cellule somatiche. Da campionamenti effettuati in 22 aziende di bovini da latte lombarde, emerge che la conta batterica e la conta delle cellule somatiche nel latte erano significativamente più basse (ad eccezione di *E. coli*) negli allevamenti in cui venivano eseguite almeno due operazioni di mungitura, tra le tre principali, rispetto ad allevamenti in cui se ne effettuava solo una o nessuna (Fig. 4.1). Nello stesso studio, la percentuale di vacche valutata come "non pulite" era, inoltre, significativamente più bassa nel gruppo di allevamenti che eseguivano due o più operazioni di mungitura, rispetto agli altri allevamenti (Fig. 4.1) (Zucali et al., 2011), riconfermando l'importanza dell'eliminazione dei primi getti di latte e della disinfezione prima e dopo la mungitura.

Nei trattamenti di disinfezione prima e dopo la mungitura, si utilizzano solitamente principi attivi a base di acidi organici o biocidi per il *pre-dipping*, mentre, per il *post-dipping*, sostanze a base di biocidi.

Figura 4.1 Risultati di uno studio sull'importanza dei trattamenti di pre e post dipping nella mungitura della vacca da latte

	Pre and post milking operations			SEM
	No operation	One operation	Two or more operations	
<i>Observations, n</i>	9	21	36	
<i>Milking operations</i>				
Forestripping	0	3	36	
Pre-dipping	0	3	27	
Post-dipping	0	15	33	
<i>Cow cleanliness</i>				
NCT cows, %	82.4a	72.8a	43.2b	5.730
<i>Bulk tank milk (log₁₀cfu/ml)</i>				
SPC	4.36a	4.34a	3.73b	0.097
PBC	4.21a	3.97a	3.34b	0.160
LPC	2.50a	2.72a	2.23b	0.141
CC	2.46a	2.30a	1.71b	0.191
<i>Escherichia coli</i>	1.16	1.10	1.00	0.087
<i>Bulk tank milk</i>				
LS	4.59a	5.05a	3.77b	0.175
<i>Teat swabs (log₁₀cfu/swab)</i>				
SPC	5.89a	5.60a	5.04b	0.149
Coagulase-positive staphylococci	3.14	3.02	3.04	0.063

† NC cows = non-clean cows; SPC = standard plate count; PBC = psychrotrophic bacterial count; LPC = laboratory pasteurization count; CC = coliform count; LS = linear score

Zucali et al., 2011

Come già anticipato nel capitolo primo, si sono verificati, negli ultimi anni, fenomeni di resistenza nei confronti dei disinfettanti, oltre che degli antibiotici, spesso dovuti ad applicazioni di dosi sub-letali di tali sostanze.

Tra le mancanze più frequenti nel corso della mungitura, c'è proprio l'applicazione frettolosa e solo parziale di questi prodotti sui capezzoli, fattore che può agevolare l'acquisizione di fenomeni di co-resistenza. L'utilizzo di disinfettanti in dosaggio sub-letale può essere dovuto, oltre a errori tecnici da parte degli operatori, ad una inappropriata diluizione del prodotto, o allo smaltimento dell'acqua di risciacquo negli scarichi o nel terreno (Davies e

Wales, 2019). Sempre Davies e Wales (2019) riportano una serie di ricerche discordanti nei confronti di questo fenomeno, ancora sottoposto ad analisi. Risultano, in ogni caso, molto interessanti ricerche e sperimentazioni volte a trovare soluzioni alternative naturali all'uso di queste sostanze.

4.1.1 I prodotti pre-dipping e post-dipping tradizionali

I prodotti applicati prima e dopo la mungitura possono avere diverse composizioni.

Le soluzioni di pre-dipping sono, solitamente, liquide o schiumose e sono a base di detergenti o disinfettanti. Alcuni prodotti di questo tipo contengono una miscela a base di acido citrico e acqua ossigenata per una azione acida e ossidante.

I prodotti di post-dipping, invece, sono, normalmente, gel a base filmante e contengono principi attivi disinfettanti. Le soluzioni possono contenere iodio, clorexina, cloro, acidi organici, oli essenziali.

Di seguito, le immagini di alcuni prodotti di pre e post-dipping attualmente in commercio.

Figura 4.2 Esempi di prodotti pre-dipping in commercio



<https://www.qualitymilk.it/categoria-prodotto/pre-e-post-mungitura/post-mungitura/>

Figura 4.3 Esempi di prodotti post-dipping in commercio



<https://www.qualitymilk.it/categoria-prodotto/pre-e-post-mungitura/post-mungitura/>

4.2 Pulizia e disinfezione nel sistema mungitura

Anche lo stato di igiene della sala di mungitura, delle attrezzature utilizzate, e degli operatori (tute da lavoro sporche, utilizzo o meno di guanti, etc...) si riflette, poi, sulla salute dell'animale e sulla qualità del latte. Secondo Reinemann et al. (2000) la conta dei coliformi nel latte è correlata alla pulizia delle bovine, all'ambiente in cui vivono e all'efficacia della sanificazione delle attrezzature di mungitura.

Particolare attenzione va alla pulizia esterna dei gruppi, ambiente favorevole all'insediamento di batteri, e alla pulizia dei bicchierini del pre e post dipping. Il lavaggio della sala, obbligatorio per legge⁹, e la rimozione delle deiezioni sono di fondamentale importanza ed è necessario, in caso di lavaggio automatico, procedere alla pulizia manuale delle parti non raggiungibili dallo stesso (Zuccolin e del Fabro, 2016). Anche la temperatura dell'acqua utilizzata per il lavaggio principale, di sala e impianto di mungitura, deve essere adeguata, cioè dai 43° ai 77° C (Reinemann et al., 2000), per 15 minuti¹⁰. Dalle analisi in 22 stalle lombarde, è emerso che la temperatura dell'acqua di

⁹ Regolamento CE n. 1662/2006 della Commissione del 6 novembre 2006.

¹⁰ Scheda tecnica "Il lavaggio e la sanificazione dell'impianto di mungitura".

lavaggio utilizzata, con un valore medio di 34,6 °C ($\pm 9,1$), fosse insufficiente a garantire una efficace sanitizzazione dell'ambiente (Sandrucci et al., 2010).

Può essere utile, poi, sfruttare il momento della mungitura per valutare alcuni indicatori dello stato di benessere degli animali e del lavoro svolto in azienda dagli operatori. In questo modo, sarà possibile, sia comprendere e monitorare lo stato di salute degli animali, per esempio, valutando lo stato di cheratosi dei capezzoli, e applicare correzioni e interventi tempestivi, sia divenire consapevoli delle condizioni igieniche e sanitarie delle bovine e della stalla, attraverso, per esempio, la valutazione dello stato di imbrattamento degli animali.

4.3 Teat apex score

Per monitorare la qualità delle operazioni di mungitura, può essere utile valutare le condizioni di salute di mammella e capezzoli, attraverso il Teat apex score. Questa valutazione risulta importante anche dal momento che è stata rilevata una certa correlazione tra mastiti cliniche e callosità dell'apice capezzolare (Neijenhuis et al., 2001). Il Teat apex score, introdotto da Mein et al. (2001), consiste nell'assegnazione di un punteggio da un minimo di 1 (capezzolo sano, privo di anelli di cheratina) a un massimo di 4 (capezzolo molto danneggiato, ipercheratosi avanzata) per singolo capezzolo, o complessivamente, per animale, in seguito all'osservazione degli orifizi capezzolari e dello stato di cheratinizzazione del tessuto mammario all'apice del capezzolo (Fig. 4.2).

Figura 4.2 Apici capezzolari a diversi stadi di cheratosi

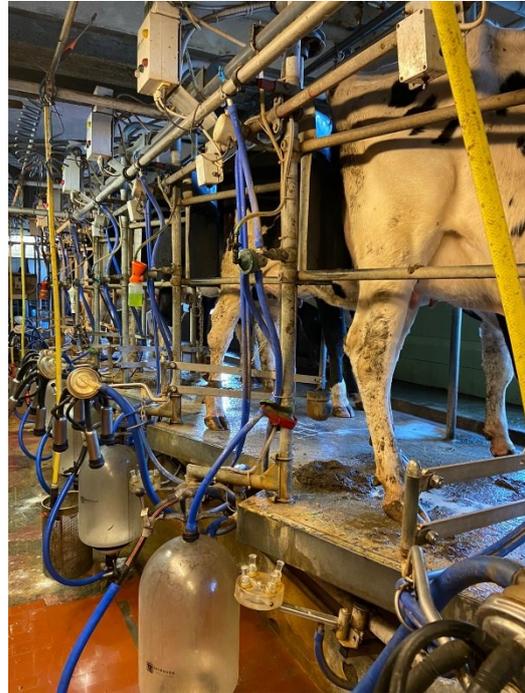
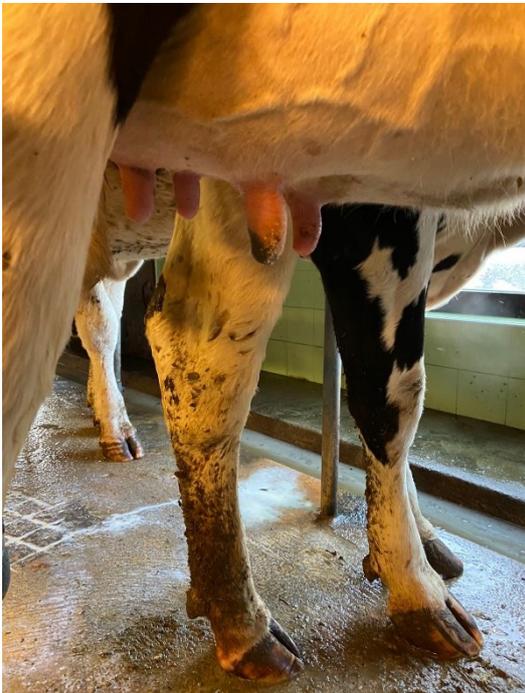


4.4 Hygiene score

La prevenzione all'insorgenza di infezioni e all'uso di antibiotici deve esplicarsi anche attraverso la cura di igiene e pulizia degli animali e dell'ambiente in cui vivono. Esiste infatti una correlazione tra stato di igiene di zampe e mammella delle bovine e insorgenza di mastiti subcliniche (Schreiner e Ruegg, 2003). Da alcuni campionamenti eseguiti in aziende di bovini da latte lombarde, è risultato che il conteggio standard di cellule vitali su piastra, la conta batterica psicrotrofica e il conteggio di batteri coliformi nel latte erano significativamente più elevati nel gruppo di animali con oltre il 50% di bovine valutate come "non pulite", rispetto all'altro gruppo (Zucali et al., 2011).

La valutazione dello stato di igiene delle bovine, definito come Hygiene score, viene eseguita valutando lo stato di imbrattamento di fianchi, zampe e mammella (Fig. 4.3) e assegnando un punteggio da 1 (animale pulito) a 4 (stato di imbrattamento elevato) per ogni area anatomica. Gli animali, una volta valutati, possono essere suddivisi in due gruppi, il primo comprendente animali in buono stato di igiene e pulizia (animali valutati con punteggio tra 1 e 2), il secondo composto da animali in cattivo o pessimo stato di igiene (animali valutati con punteggio tra 3 e 4). È possibile, in questo modo, valutando le percentuali che compongono i due gruppi, comprendere complessivamente lo stato igienico sanitario della propria stalla e intervenire di conseguenza.

Figura 4.3 Dettaglio di mammella, arti posteriori e fianchi di vacche in sala di mungitura



CAPITOLO QUINTO

PRODOTTI ALTERNATIVI IN PREVENZIONE E CURA ALLA MASTITE

Le buone pratiche e procedure descritte nel capitolo quarto, volte a prevenire l'insorgenza di infezioni mammarie e, quindi, la conseguente terapia con sostanze antibiotiche, come già detto, non sono sufficienti. Da diversi anni, si stanno sperimentando strategie di cura e prodotti per la prevenzione all'insorgenza di mastiti alternativi agli antibiotici.

In questo capitolo, si vogliono citare alcune di queste sostanze e, in particolar modo, ci si soffermerà sullo studio delle batteriocine.

5.1 Alternative agli antibiotici contro la mastite bovina

Ad oggi, non esiste ancora una sostanza che possa sostituirsi pienamente agli antibiotici nella cura della mastite bovina; tuttavia, numerose analisi in laboratorio e in campo vengono continuamente svolte per ricercare nuovi prodotti e migliorarne l'efficacia.

Gomes e Henriques (2016) citano diverse ricerche riguardo all'utilizzo di vaccini contro casi di mastite. Si riporta, però, che uno dei principali problemi relativi a questo approccio è il fatto di trovarsi di fronte a una elevatissima gamma di patogeni e di ceppi responsabili di infezioni mammarie, avendo a disposizione un'arma la cui efficacia ha, solitamente, un limitato spettro d'azione. La ricerca per l'ottenimento di risultati applicabili ed efficaci, in questo campo, ha ancora una lunga strada da percorrere.

Altri studi riguardanti una terapia alternativa agli antibiotici riportano l'utilizzo di nanoparticelle e citochine ricombinate (Gomes e Henriques, 2016), l'applicazione di un concentrato piastrinico, l'utilizzo di meccanismi epigenetici per migliorare le risposte immunitarie dell'animale (Krömker e Leimbach, 2017) o composti naturali (diterpeni, estratti etanolic di propoli, monolaurina, estratta dall'olio di cocco, alcuni peptidi antimicrobici vegetali, etc..) che mostrano, in vitro, capacità inibenti contro alcuni patogeni mastidogeni.

Recenti studi hanno, poi, dimostrato l'efficacia di alcuni batteriofagi o dei loro prodotti nell'ostacolare la crescita di streptococchi nel latte (Krömker e Leimbach, 2017), dimostrandosi, quindi, potenzialmente vincenti contro le mastiti cliniche. Tuttavia, l'efficacia di batteriofagi nei confronti di patogeni mastidogeni è accompagnata ancora da numerose limitazioni e necessita di ulteriori studi e approfondimenti (Gomes e Henriques, 2016).

Anche diversi prodotti di origine animale sono stati testati contro alcuni tra i principali agenti patogeni responsabili di mastite, come, per esempio, la lattoferrina (Kutilla et al., 2003), risultata più efficace nei confronti di *S. aureus* in aggiunta a un'altra proteina, la β -lattoglobulina.

Interessante, poi, lo studio di composti naturali con azione antimicrobica prodotti da batteri. Krömker e Leimbach, (2017) menzionano, nella loro opera di revisione, diversi studi riguardanti l'applicazione di batteri dell'acido lattico (LAB) per inibire la crescita in vitro di agenti mastidogeni, prevenire o competere la formazione di biofilm da parte di questi batteri o ridurre le infezioni intramammarie. I batteri lattici, in particolare *Lactobacillus casei* (Bouchard et al., 2013) e *Weissella confusa* (Serna-Cock et al., 2012), e i loro metaboliti hanno dimostrato una certa attività nei confronti di *Staph. aureus* e, per quanto riguarda *W. confusa*, anche contro *Strep. agalactiae*, due tra i principali batteri contagiosi responsabili di mastite. Soprattutto nei casi di mastite dovuti a *Staph. aureus*, la cura, anche con sostanze antibiotiche, risulta di scarsa efficacia a causa della recidività dell'infezione; *Staph. aureus* è, infatti, in grado di invadere le cellule del tessuto mammario. Tuttavia, i batteri lattici sono in grado di ridurre adesione e invasione cellulare da parte del

batterio e di limitare così la ricorrenza dell'infezione in bovine già trattate e guarite (Bouchard et al., 2013).

Tra le sostanze naturali, ad azione antimicrobica, prodotte dai batteri rientrano anche le batteriocine.

5.2 Le batteriocine

Le batteriocine sono sostanze naturali di origine proteica, composte da un minimo di 30 ad un massimo di 60 residui amminoacidici (Bruno e Montville, 1993). Sono prodotte a livello ribosomiale da alcuni batteri e sono molecole antibiotiche naturali ad elevata attività antibatterica. Queste sostanze possiedono, infatti, la capacità di inibire, anche a basse concentrazioni, la moltiplicazione di altri batteri di ceppi tassonomicamente vicini al batterio che le ha sintetizzate (Ray, 1996); sono, pertanto, molto selettive e specifiche, a differenza dei comuni antibiotici. Oltre a ciò, sono prodotte cento volte più velocemente di questi ultimi e diffondono molto più rapidamente delle grandi molecole (Schirru, 2008).

Le batteriocine sono generalmente termo-resistenti e stabili al calore e a pH acidi, resistono a refrigerazione e congelamento, a numerosi solventi organici deboli, sali ed enzimi; sono solitamente sensibili a enzimi proteolitici (Ray, 1996).

5.2.1 Sintesi delle batteriocine

L'informazione genetica che codifica per la produzione di batteriocine può essere contenuta sia a livello plasmidico (batteri Gram-positivi e Gram-negativi), sia a livello cromosomico (batteri Gram-positivi). Nei Gram-positivi, inoltre, il corredo genetico responsabile della sintesi di batteriocine è più

complesso rispetto a quanto avviene nei batteri Gram-negativi. Insieme ai geni codificanti per queste sostanze sono presenti, normalmente, geni in grado di conferire una immunità specifica nei confronti della sostanza emessa dal batterio, in modo che quest'ultimo sopravviva all'azione antimicrobica.

La molecola batteriocinica, solitamente, viene trasportata nella cellula batterica sotto forma di peptide inattivo (preptide), contenente due porzioni distinte, una definita C-terminale e una chiamata leader N-terminale. Successivamente, al momento dell'emissione all'esterno della cellula, alcune peptidasi specifiche rimuovono il peptide leader N-terminale, attivando, così, la molecola.

Una volta nell'ambiente, la molecola agisce a livello delle membrane cellulari dei batteri ad essa sensibili, determinando rapidamente la morte del microrganismo.

5.2.2 I batteri dell'acido lattico

I batteri lattici (LAB) fanno parte dei Gram-positivi in grado di produrre batteriocine (Alvarez-Sieiro et al., 2016). Sono oggetto di ricerche continue e, spesso, vengono impiegati come additivi alimentari volti a controllare batteri degradativi e/o patogeni negli alimenti. Le batteriocine non sono gli unici metaboliti con attività antimicrobica prodotti dai LAB, ma hanno suscitato grande interesse in quanto riconosciute come sicure (GRAS) dalla Agenzia per gli Alimenti e i Medicinali (FDA), la quale ne ha garantito la salubrità di impiego come bio-conservanti.

Le batteriocine da LAB sono state classificate in tre gruppi da Alvarez-Sieiro et al. (2016), in base ai meccanismi di biosintesi e all'attività biologica della molecola:

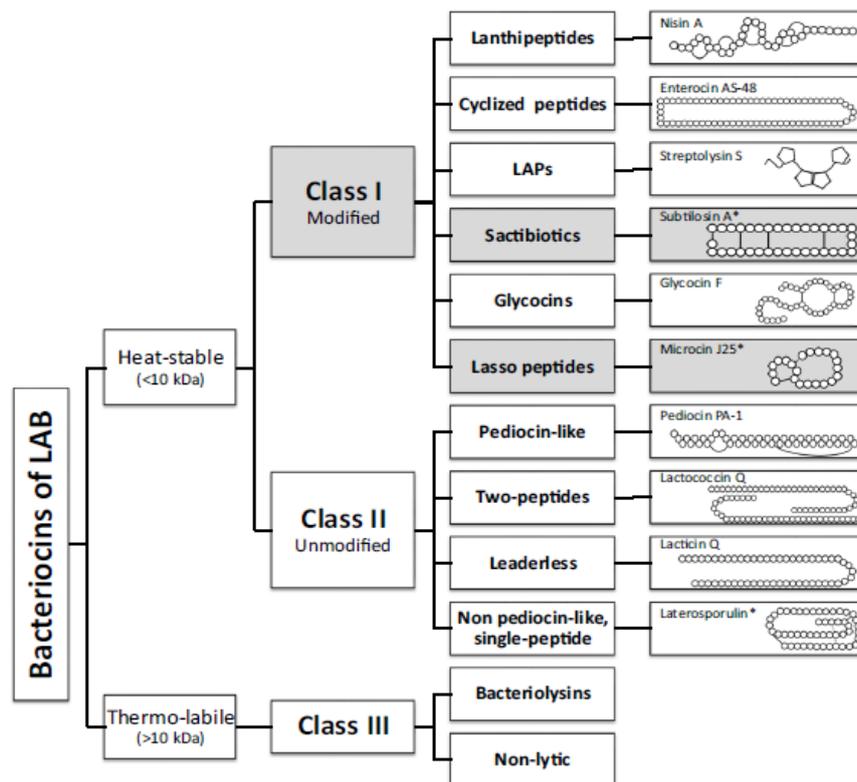
- Classe I - comprende tutte le batteriocine costituite da piccoli peptidi termostabili che, durante la biosintesi, vanno incontro a modificazioni

enzimatiche, tali da conferire alla molecola AA non comuni o strutture che ne modificano le proprietà;

- Classe II - gruppo costituito da batteriocine non modificate, di dimensioni inferiori a 10 kDa, che, oltre a peptidasi leader e/o trasportatori, non richiedono enzimi per la loro maturazione. Sono termostabili;
- Classe III - comprende batteriocine non modificate, di dimensioni superiori a 10 kDa, con meccanismo d'azione batteriolitico o non litico. Sono termolabili.

In fig. 5.1, una suddivisione più dettagliata delle batteriocine, seguendo la classificazione di Alvarez-Sieiro et al. (2016).

Figura 5.1 Suddivisione delle batteriocine da batteri lattici secondo Alvarez-Sieiro et al.



Alvarez-Sieiro et al. (2016)

5.2.2 Le batteriocine nel settore zootecnico

Con l'accrescersi del problema dell'antibiotico-resistenza, le batteriocine sono state prese in esame come possibili sostanze antibatteriche naturali da impiegare in campo medico e veterinario in alternativa ai comuni antibiotici.

Tra le batteriocine da LAB più studiate vi è la nisina, prodotta da *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Alvarez-Sieiro et al., 2016). La sua modalità d'azione antibatterica consiste nella dissipazione del potenziale di membrana delle cellule obiettivo, provocando l'esaurimento della forza motrice protonica (Bruno e Montville, 1993).

Alcune applicazioni in campo veterinario della nisina si sono concretizzate nel suo utilizzo in trattamenti di post dipping. La batteriocina ha comportato, a un minuto dopo l'applicazione, la riduzione di numerosi batteri patogeni presenti sulla cute del capezzolo (carica di *Staph. aureus* ridotta del 61,8%; di *Str. agalactiae* del 98,6 %; di *E. coli* dell'85,5%; di *Str. uberis* del 67,1%; di *Kl. pneumoniae* del 76,5%). Nello stesso tempo, l'irritazione cutanea in seguito ad applicazioni ricorrenti è stata minima (Sears et al., 1992).

Ulteriori studi di campo hanno previsto la somministrazione di batteri lattici vivi, produttori di batteriocine, per il trattamento della mastite. In particolare, nella vacca da latte i LAB sono stati inseriti all'interno del canale del capezzolo.

Klostermann et al. (2008), hanno comparato animali trattati con antibiotico convenzionale e animali a cui era stato somministrato un ceppo vivo di *Lactococcus lactis* DPC3147, produttore di latticina. Lo studio riguardava sia casi di mastite clinica, sia subclinica e, in entrambe le sperimentazioni, nonostante l'efficacia del trattamento dipendesse anche da altri fattori, quali, per esempio, l'età dell'animale e la sua storia clinica, i risultati suggerivano che il trattamento con il LAB potesse essere efficace al pari di un comune antibiotico.

Gli stessi animali vennero sottoposti ad una ulteriore indagine riguardante l'analisi della risposta immunitaria stimolata nella mammella dalla

somministrazione di *Lac. lactis*. Si stabiliva, nello studio, che questo batterio era in grado di stimolare una rapida e sostanziale risposta del sistema immunitario (Crispie et al., 2008), senza conoscere, però, se ciò fosse legato o meno alle batteriocine da esso prodotte. In una pubblicazione successiva venne dimostrato, tuttavia, che il trattamento con questo batterio comportava un importante innalzamento del livello di cellule somatiche nel latte e una risposta infiammatoria acuta nella mammella. Entrambi i valori tornavano alla normalità dopo una settimana circa (Beecher et al., 2009).

In una recente sperimentazione, si è testata l'applicazione di un prodotto post-dipping a base di batteriocine da *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, ottenendo ottimi risultati, sia per quanto riguarda la riduzione dei casi di mastite, sia nel mantenimento di valori di cellule somatiche comparabili a quelli di un gruppo di controllo (Brasca et. al., 2018).

CAPITOLO SESTO

SCOPO

La sperimentazione descritta nei capitoli successivi è parte di un progetto più ampio. In particolare, gli obiettivi prefissati sono: la gestione igienico sanitaria sostenibile degli allevamenti, anche in relazione alle nuove linee guida europee (uso degli antibiotici), e l'adeguamento dei sistemi di allevamento e dei processi produttivi all'esigenza di garantire il benessere degli animali allevati.

La sperimentazione su cui è focalizzato l'elaborato consisteva nell'impiego, durante le fasi di mungitura, di due prodotti (di pre e post dipping) a base di una batteriocina prodotta da un ceppo di *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. Le analisi in laboratorio hanno successivamente verificato gli effetti del trattamento sperimentale, con lo scopo di valutare la sua efficacia nel contrastare batteri patogeni e nella prevenzione all'insorgenza di mastiti, e la reazione immunitaria dell'animale. Importante era anche garantire il mantenimento di una mammella sana, con una conta delle cellule somatiche non elevata.

L'utilizzo di un prodotto alternativo, come quello proposto in questo lavoro, ha la finalità di tutelare la salute non solo dell'animale, ma anche del consumatore. Con la prevenzione contro l'insorgenza di mastite, si ipotizza, infatti, un minor rischio di assumere residui di antibiotici grazie a una riduzione dell'uso di tali sostanze; nello stesso tempo, si garantirebbe un rischio minore di sviluppare ceppi batterici resistenti agli antibiotici.

CAPITOLO SETTIMO

MATERIALI E METODI UTILIZZATI

7.1 I prodotti utilizzati nella sperimentazione

Per la sperimentazione sono stati formulati due prodotti per il trattamento della mammella durante la mungitura. Il primo è un prodotto di pre-dipping, per la pulizia della cute e dei capezzoli prima dell'attacco al gruppo di mungitura, il secondo è un prodotto di post-dipping, per la disinfezione dei capezzoli dopo lo stacco, al termine della mungitura.

I prodotti utilizzati erano entrambi a base di un ceppo di *Lac. lactis* subsp. *cremoris*, isolato da CNR ISPA da un formaggio caprino, produttore di batteriocine. Il principio attivo prodotto dal lactococco agisce sui batteri target bloccando la formazione della parete batterica e provocando pori al suo interno. Queste condizioni determinano la morte del batterio attaccato dalla molecola.

La batteriocina è stata valutata, prima della sperimentazione, considerando la sua influenza sulla popolazione di batteri lattici del latte e sulla popolazione patogena.

L'attività *in vitro* della batteriocina verso i principali batteri mastidogeni è rappresentata in fig. 7.1.

Il batterio è stato precedentemente caratterizzato attraverso una analisi proteomica, fatto crescere in brodo MRS overnight a 37° C e, dopo più di 24 ore, diluito nella soluzione base fornita dall'azienda Allegrini S.p.A. Il fattore di diluizione, calcolato in base all'attività antimicrobica nei confronti dei

principali batteri mastidogeni della vacca da latte (*Staph. aureus*, *Str. agalactiae*, *Str. uberis*, *Str. dysgalactiae*, *E. coli*, *Ent. faecalis*), è di 1/100.

La base dei due prodotti è la stessa utilizzata dall'azienda nelle formulazioni commerciali e contiene acido lattico, nel prodotto di pre-dipping, e sostanze emollienti e filmanti, nel prodotto di post-dipping.

Figura 7.1 Attività in vitro della batteriocina nei confronti dei principali agenti mastidogeni

Specie	Origine	Attività
<i>Staphylococcus aureus</i>	Mastite clinica	0,5
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Mastite subclinica	0,0156
<i>Streptococcus uberis</i>	Mastite clinica	0,125 - 0,0156
<i>Enterococcus faecalis</i>	Mastite subclinica	0,0156
<i>Staphylococcus sp.</i>	Mastite subclinica	0,25
<i>Listeria monocytogenes</i>	Mastite subclinica	0,25

Comunicazione personale Piccinini

7.2 Campionamenti e rilevazioni aziendali

La sperimentazione ha avuto luogo in un'azienda di bovini da latte di razza Frisona, situata nella Pianura Padana. Al momento delle analisi, l'azienda contava circa 120 bovine in lattazione.

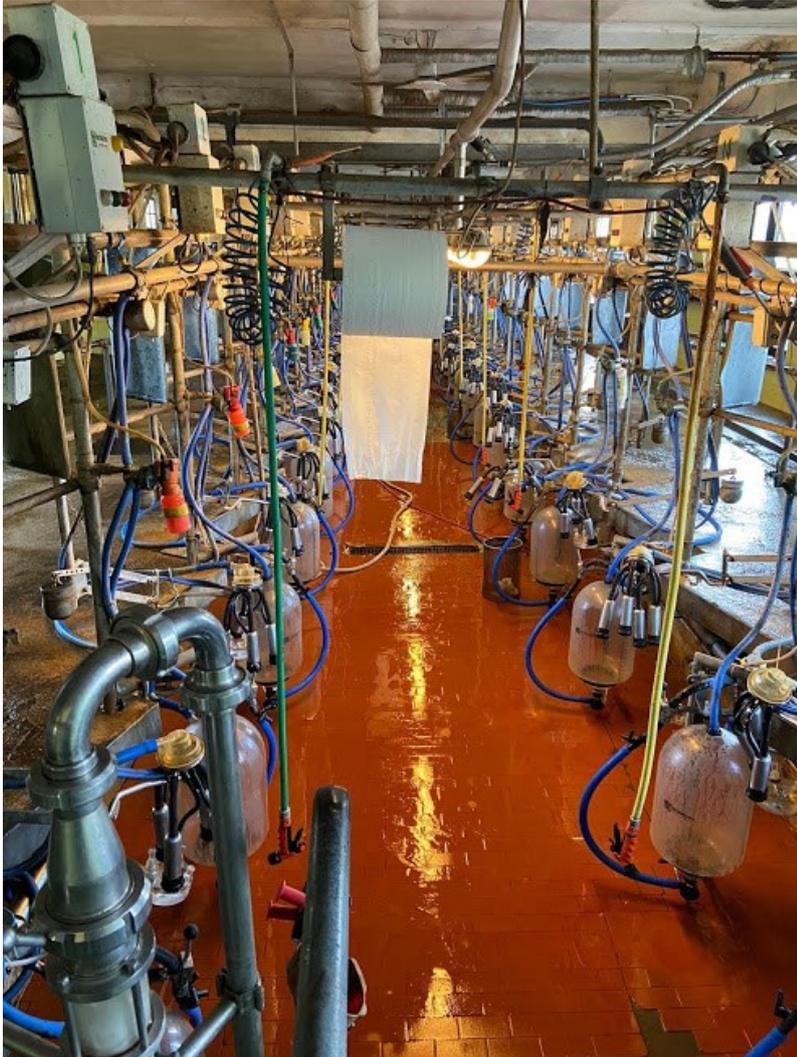
Durante la prova, in totale, sono state effettuate 6 rilevazioni, distanziate di 2 settimane circa (ad eccezione delle ultime, in cui le cadenze delle rilevazioni si sono dilatate ulteriormente) nel periodo compreso tra gennaio e maggio 2020.

Il primo campionamento aveva lo scopo di comprendere la situazione aziendale, individuare lo stato di salute complessivo della stalla e indirizzare la suddivisione delle vacche nei due gruppi, di trattamento (T) e di controllo (C), in modo che fossero il più possibile omogenei; nello stesso giorno, è stato fornito agli operatori responsabili della mungitura il prodotto a base di batteriocine, in modo da poterlo utilizzare sulle vacche del gruppo di sperimentazione già dal giorno successivo. Gli animali del gruppo da trattare sono stati identificati tramite appositi braccialetti colorati applicati su uno degli arti posteriori.

A partire dalla seconda uscita, lo scopo è stato quello di analizzare e verificare l'efficacia del prodotto. La validità dei prodotti viene determinata osservando il numero di nuove infezioni diagnosticate dalle analisi in laboratorio dei campioni di latte, e dalla conta delle cellule somatiche. Era prevista anche l'analisi della conta differenziale delle cellule somatiche del latte, la quale non è stata riportata nel presente elaborato.

Sempre dalla seconda uscita, le vacche sono state valutate dal punto di vista dell'integrità dei capezzoli e dello stato di imbrattamento di alcune zone anatomiche (fianchi, arti posteriori e mammella), entrambi fattori coinvolti nell'insorgenza di infezioni batteriche della mammella. Tali valutazioni permettono, inoltre, di comprendere meglio i risultati delle analisi in laboratorio e di valutare, indirettamente, lo stato igienico della stalla e qualità delle operazioni di mungitura.

Figura 7.2 Sala di mungitura, luogo delle rilevazioni e dei campionamenti



7.2.1 Il prelievo di latte

Il campionamento consisteva nel prelievo sterile di latte dai 4 quarti di ogni vacca in lattazione, appena dopo l'operazione di pre-dipping e prima dell'attacco ai gruppi di mungitura.

Per il prelievo sterile, ogni operatore, munito di guanti, puliva un capezzolo alla volta con un disinfettante a base di alcol e con della carta. Si procedeva

con il prelievo di una provetta di latte per ogni quarto (per un totale di 4 prelievi per animale), prestando attenzione a non contaminare l'apice capezzolare, il tappo e la provetta stessa.

Le provette erano numerate in modo progressivo; durante la mungitura, un operatore si occupava di riportare il numero identificativo di ogni vacca in ordine di prelevamento, in modo da far coincidere il numero dell'animale con il numero della provetta contenente il suo latte. Le provette dei 4 quarti erano distinte grazie al colore del tappo, bianco per l'anteriore sinistro, blu per l'anteriore destro, rosso per il posteriore destro e verde per il posteriore sinistro (Fig. 7.3).

Le provette venivano successivamente inserite in contenitori di plastica contenenti ghiaccio per il refrigeramento immediato e il trasporto in giornata del latte in laboratorio.

Figura 7.3 Provette utilizzate per il campionamento del latte



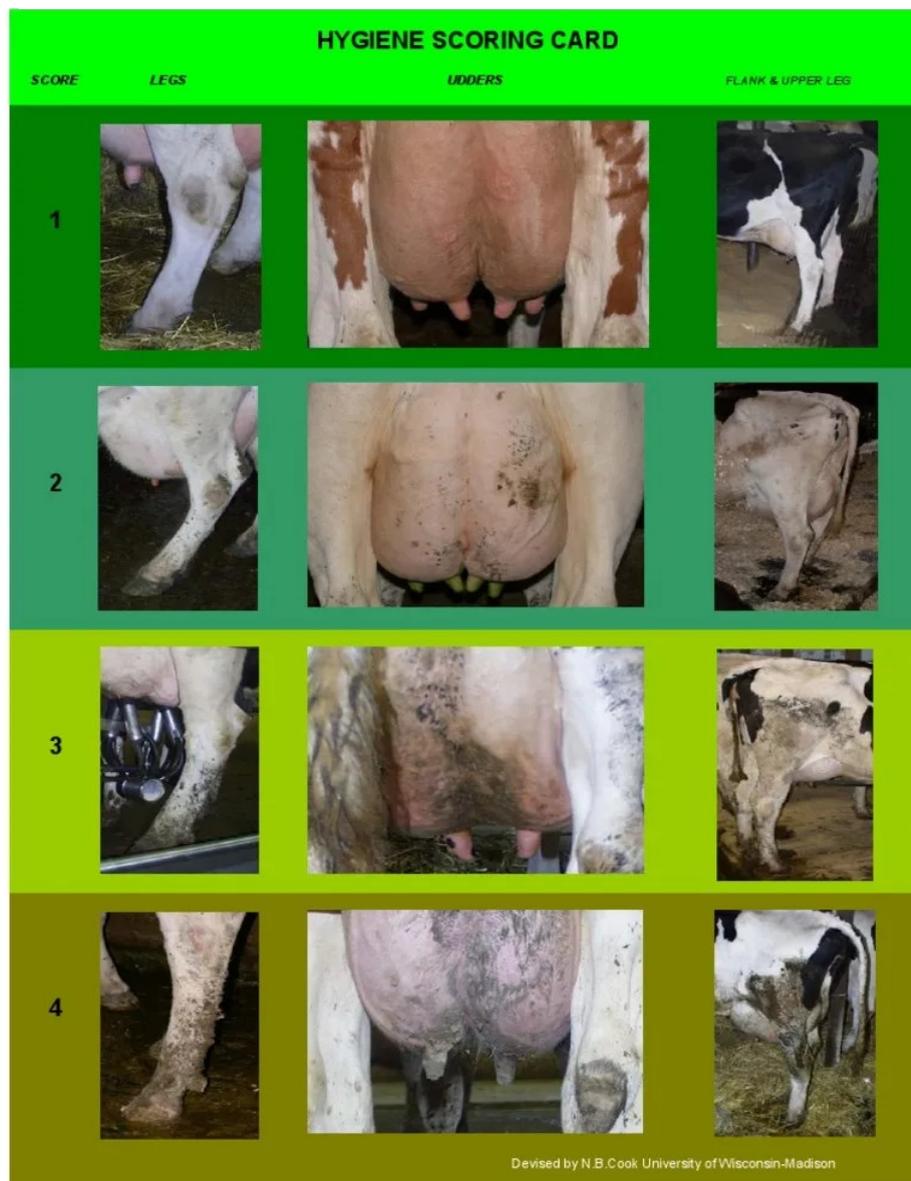
7.2.2 Le valutazioni di igiene e salute degli animali

Durante la mungitura, un operatore rilevava lo stato di igiene degli animali e lo stato di salute dei capezzoli. Queste valutazioni sono state eseguite solo nei primi campionamenti, fino al mese di marzo, per impossibilità di proseguire le rilevazioni anche nelle uscite successive.

Per la prima valutazione è stato utilizzato il modello dell'Hygiene score, proposto da Schreiner e Ruegg (2003). A partire dall'osservazione dello stato di imbrattamento di fianchi, arti posteriori e mammella, è stato dato un punteggio, da un minimo di 1 a un massimo di 4, in modo indipendente per ogni area anatomica. Il punteggio 1 era indice di una quasi totale assenza di imbrattamento, il punteggio 2 indicava una situazione di buona pulizia; punteggi di 3 e 4 erano assegnati a vacche sporche o molto sporche (Fig. 7.4).

Successivamente, è stata calcolata la percentuale di vacche con punteggio superiore o pari a 3.

Figura 7.4 *Hygiene scoring card* utilizzata per la valutazione di igiene degli animali



Schreiner e Ruegg (2003)

Per la valutazione dei capezzoli è stato utilizzato il modello del Teat apex score, proposto da Mein et al. (2001). Anche in questo caso, un operatore, osservando lo stato di cheratosi di ogni apice capezzolare, assegnava un punteggio ad ogni capezzolo da 1 a 4, seguendo lo schema rappresentato in fig. 7.5.

Figura 7.5 Teat apex scoring card utilizzata per la valutazione dello stato di cheratosi dei capezzoli

Score	Description	Illustration
Score 1 (N)	No Ring. The teat-end is smooth with a small, even orifice. This is a typical status for many teats soon after the start of lactation.	
Score 2 (S)	Smooth or Slightly Rough Ring. A raised ring encircles the teat orifice. The surface of the ring is smooth or it may feel slightly rough but no fragments of old keratin are evident.	
Score 3 (R)	Rough Ring. A raised, roughened ring with isolated fragments of old keratin extending a short distance from the teat orifice.	
Score 4 (VR)	Very Rough Ring. A raised ring with rough fragments of old keratin extending out from the teat orifice. The rim of the ring is rough and may be cracked, often giving the teat-end a "flowered" appearance.	
Score 5	Open Lesions or Scabs.	Not pictured.

Mein et al. (2001)

7.3 Le analisi in laboratorio

I campioni di latte, una volta portati in laboratorio, sono stati sottoposti a diverse analisi per osservare la risposta immunitaria dell'animale, verificare l'efficacia del prodotto oggetto della sperimentazione e per confrontare le condizioni del gruppo degli animali trattati con quelle del gruppo di controllo. Le analisi previste erano le seguenti: analisi cito-batterologica, analisi metagenomica del latte, analisi dei marker di infiammazione e del profilo proteico, analisi del microbiota del latte, per caratterizzare i microrganismi della mammella e valutare l'impatto del trattamento su questi ultimi, analisi proteomica del latte, del ceppo batterico utilizzato nel prodotto e dei microrganismi con caratteristiche di minor sensibilità al prodotto.

La sperimentazione descritta in questo elaborato ha riguardato, in modo specifico, l'analisi cito-batterologica del latte.

7.3.1 Analisi cito-batterologica

I campioni di latte prelevati in azienda sono stati sottoposti alla Conta delle Cellule Somatiche (CCS) con lo strumento Bentley Somacount.

Gli stessi campioni sono stati sottoposti ad analisi batteriologica, ovvero osservazione e identificazione di ciò che si sviluppa in seguito alla semina di 10 µl di latte. Per la semina sono state utilizzate piastre di Petri contenenti agar-sangue (Fig. 7.6); il contenuto di ogni provetta era seminato su un quarto di piastra, utilizzando, complessivamente, una piastra per vacca. Il procedimento di semina, da svolgersi in modo asettico per evitare contaminazioni crociate con altri microrganismi, comprendeva l'utilizzo di un becco Bunsen e una ansa sterile (Fig. 7.7).

La semina dei campioni veniva effettuata la mattina successiva al prelievo in stalla. Non appena conclusa l'operazione, le piastre venivano riposte in termostato a 37°C.

La lettura delle piastre veniva effettuata due volte, 24 e 48 ore dopo la semina. Veniva letto ogni quarto, prestando attenzione a possibili batteri contagiosi (in particolare a *Staph. aureus* e *Str. agalactiae*). Le colonie batteriche, ad eccezione dei contagiosi, venivano considerate se in purezza e se numericamente maggiori di 10. Le semine su cui crescevano più tipi di colonie non distinguibili venivano considerate contaminate, e quindi scartate.

Figura 7.6 Piastre Petri contenenti agar-sangue divisi in quattro quarti per la semina dei campioni di latte



Figura 7.7 Materiale utilizzato per la semina su piastra e provette con campioni di latte



Per l'identificazione delle colonie, in primo luogo, si osservavano forma, dimensione, colore, consistenza, presenza o meno di emolisi. In alcuni casi, sono state effettuate osservazioni microscopiche, o altri test (catalasi, coagulasi, Camp test, Mc Conkey), per consentire una più precisa identificazione del batterio.

Una volta identificato il microrganismo cresciuto sulla piastra, si procedeva con il suo isolamento, ne veniva registrato il genere tassonomico e in quale quarto della mammella e in quale animale era stato rilevato.

In Fig. 7.8 alcuni esempi di colture batteriche ottenute 24 ore dopo la semina di latte su agar-sangue.

Figura 7.8 Colture batteriche ottenute dalla semina di campioni di latte su agar-sangue



7.4 Analisi dei dati

L'analisi dei dati è stata effettuata utilizzando il programma Microsoft Excel. Le prime analisi effettuate erano di tipo statistico/descrittivo (Media, Deviazione Standard, Valori Minimi e Valori Massimi); si è, poi, proceduto con l'analisi di varianza per la verifica di alcune ipotesi.

Nei sotto-paragrafi che seguono, si riportano, più nel dettaglio, alcuni dei passaggi svolti durante il processo di analisi e alcune informazioni relative ai dati analizzati, in modo da rendere più chiari i risultati ottenuti nel capitolo 8.

7.4.1 Conta delle cellule somatiche e analisi degli esiti batteriologici

Per l'analisi della Conta delle Cellule Somatiche (CCS) occorre tenere presente che le cellule somatiche nel latte sono costituite, principalmente, dai leucociti provenienti dal sangue e, solo in piccola parte, da cellule di sfaldamento del parenchima mammario. Quando è in corso un'infezione mammaria, la maggior parte delle cellule rilevate è costituita da globuli bianchi (>90%) che, infatti, aumentano notevolmente di numero per far fronte agli agenti patogeni e per riparare i tessuti danneggiati.

Si ritiene, convenzionalmente, che il latte munto da una mammella sana non debba contenere più di 200 000 cellule/ml (Brand et al. 1996). Si tratta, però, di un valore molto discusso, in quanto indicativo solamente di una maggior probabilità di riscontrare casi di mastite: si ritiene infatti che circa il 15% degli animali con valori inferiori alle 200 000 cell/ml sia comunque affetto da mastite e che il 15% degli animali che supera questo valore di cellule somatiche sia, in realtà, sano (Sharma et al., 2011). Distinguere, effettivamente, bovine infette da bovine sane attraverso la sola conta delle cellule somatiche non è semplice; la sensibilità e la specificità della conta cellulare su latte di singolo quarto, come indicatore di infezione intramammaria in almeno un quarto, variano, rispettivamente, tra il 30% e l'89%, e tra il 60% ed il 90% (Jashari et al., 2016). Nello stesso studio di Jashari et al. (2016), si rileva che, con un valore soglia di 200 000 cell/ml, la probabilità di individuare, tramite CCS, una bovina infetta con batteriologico negativo è quasi del 90% e di trovarne una sana del 38,1%, mentre, con batteriologico positivo per patogeni maggiori (*Staph. aureus*, *Strept. agalactiae*, *Strept. dysgalactiae*, *T. pyogenes* e streptococchi esculina-positivi), la probabilità di individuare una vacca infetta è del 40,6% e una sana

del 88,1%. In alcuni studi, la soglia viene, quindi, abbassata a 100 000 cell/ml, specialmente per poter individuare animali infetti da patogeni maggiori o anche per il fatto che, a partire da questo valore soglia, si ritengono quantificabili le perdite in termini di produzione di latte (Sharma et al., 2011).

Poiché non erano questi gli obiettivi della sperimentazione, durante l'analisi dei dati si è considerato un valore soglia di 200 000 cellule per ml di latte: gli animali i cui campioni di latte contenevano un valore pari o superiore a questo erano considerati a rischio di mastite.

Il riferimento alla conta delle cellule somatiche e agli esiti batteriologici ha permesso di suddividere gli animali per stato sanitario della mammella in quattro sottogruppi: animali in cui non si sono rilevate contaminazioni batteriche e con CCS inferiore a 200 000 cell/ml; animali positivi al batteriologico ma con una conta delle cellule somatiche inferiore alle 200 000 cell/ml; animali con cellule alte ma batteriologico negativo; animali con una conta delle cellule somatiche superiore o pari a 200 000 cell/ml e batteriologico positivo. In questo modo, si è potuto fare un confronto tra animali con un analogo stato sanitario della mammella (paragrafo 8.5).

Si ricorda che i valori relativi alla conta delle cellule somatiche sono utilizzati anche per la valutazione della qualità del latte e della sua conformità alla vendita: limite nazionale di 400 000 cell/ml per latte bovino crudo¹¹, e regionale di 300 000 cell/ml per latte di Alta Qualità e per latte crudo destinato alla vendita diretta (IZSLE).

Per le analisi che prevedevano confronti tra contenuto di cellule somatiche, si è utilizzato il Log10 delle stesse. La conversione logaritmica consente di differenziare maggiormente i valori fino a 400-800 mila cellule e appiattare maggiormente quelli superiori.

¹¹ Regolamento CE n. 853/2004.

7.4.2 Analisi di Hygiene Score e Teat Apex Score

Per i dati di Hygiene e Teat Apex Score, si sono considerate, come già anticipato, le percentuali dei punteggi superiori o pari a 3.

Si è, inoltre, voluta verificare la relazione tra Teat Apex Score e i dati citobatteriologici (paragrafo 8.4). In questo caso, si sono calcolate le percentuali in base al numero di capezzoli valutati con punteggio pari o superiore a 3: se l'animale non aveva valutazioni di questo tipo, la percentuale era dello 0%; se l'animale risultava avere un solo capezzolo con tale punteggio, si considerava una percentuale del 25%, se ne aveva due, la percentuale saliva al 50%, e così via. Gli animali erano suddivisi in gruppi di trattamento e di controllo, e all'interno di ogni gruppo sono stati suddivisi a seconda dello stato sanitario della mammella, come descritto nel sotto-paragrafo precedente. Una volta assegnate le percentuali per ogni animale, sono state calcolate le medie delle percentuali per sottogruppo per entrambi i gruppi sperimentali (T e C).

7.4.3 Analisi della varianza

L'analisi della varianza, o ANOVA, è *“una tecnica di analisi che consente di verificare ipotesi relative a differenze tra le medie di due o più popolazioni”* (Barbaranelli, 2007).

È stata utilizzata, in questo studio, dapprima, per verificare la presenza o meno di differenze tra le medie dei valori relativi alle cellule somatiche (log₁₀) e alla produzione (kg di latte) in primipare e in pluripare (i dati fanno riferimento ai controlli funzionali dell'anno 2019); in secondo luogo, si è applicata l'ANOVA per ricercare differenze tra le medie dei valori relativi alle cellule somatiche (log₁₀ cell/ml) dei due gruppi sperimentali (di trattamento e di controllo).

La stessa analisi è stata fatta con i dati relativi all'evolversi, nel corso della sperimentazione, dell'andamento delle cellule somatiche, in modo distinto nei

due gruppi. Quest'ultimo passaggio ha voluto verificare se ci fossero altri fattori, in aggiunta al trattamento con il prodotto sperimentale, che potessero determinare variazioni significative dell'andamento delle cellule somatiche (\log_{10}) durante i campionamenti.

Si è, inoltre, eseguita un'analisi di varianza a due fattori per verificare l'interazione tra il fattore "gruppo sperimentale (T o C)" e tra il fattore "numero progressivo di campionamento".

Si è scelto un livello di probabilità (α) dello 0,05. Ciò significa che, rifiutando o accettando l'ipotesi zero, a seconda dei risultati ottenuti dall'ANOVA, si avrà la probabilità di commettere un errore pari allo 0,05%.

CAPITOLO OTTAVO

RISULTATI E DISCUSSIONE

8.1 La situazione aziendale nel 2019

Prima di analizzare i dati raccolti, si sono presi in considerazione il livello produttivo e la qualità del latte degli animali nell'anno precedente ai campionamenti. Per fare ciò, sono stati esaminati i controlli funzionali dell'anno 2019, da gennaio a novembre, esclusi i controlli del mese di giugno e di settembre. È stato possibile, in questo modo, verificare produttività e qualità del latte a livello aziendale, calcolare la media delle cellule somatiche, analizzare produzione e cellule somatiche distinguendo vacche primipare da pluripare, e rilevare la presenza di differenze tra i due gruppi formati l'anno successivo per la sperimentazione (gruppo di trattamento e gruppo di controllo).

Con queste informazioni, sarà più semplice comprendere e contestualizzare i dati ottenuti successivamente dalle rilevazioni e dai campionamenti.

8.1.1 Dati produttivi dell'anno 2019

In tabella 8.1 si riportano i dati produttivi medi aziendali dell'anno 2019.

Tabella 8.1 Dati produttivi medi aziendali del 2019

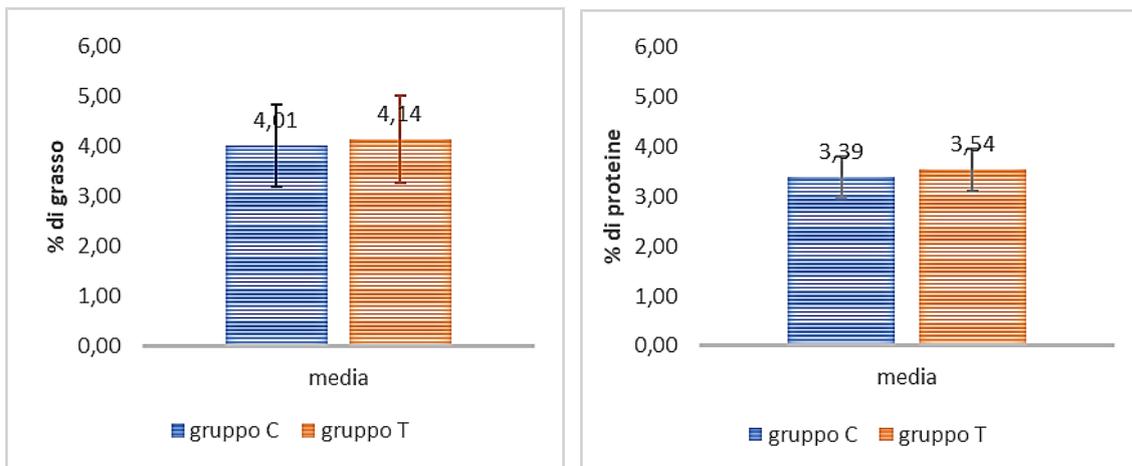
	Produzione (kg/d)	Grasso (%)	Proteine (%)
Media	30,6	4,1	3,5

DV	8,0	0,8	0,4
Min	11,0	0,0	0,0
Max	55,0	7,7	5,4

Per avere un'idea generale della produttività aziendale, si riportano i valori di produttività regionali della razza Frisona (sito ANAFI) riferiti all'anno 2019; dal confronto, risulta che la produzione media aziendale sia superiore al dato medio lombardo (pari a circa 28,7 kg/d), come anche la percentuale media di grasso e proteine (grasso al 3,83%, proteine al 3,37%).

Per rilevare eventuali differenze tra i gruppi che si sarebbero formati l'anno successivo, si riportano i grafici sottostanti (figura 8.2), rappresentanti i valori medi relativi al contenuto percentuale in proteine e in grasso del latte.

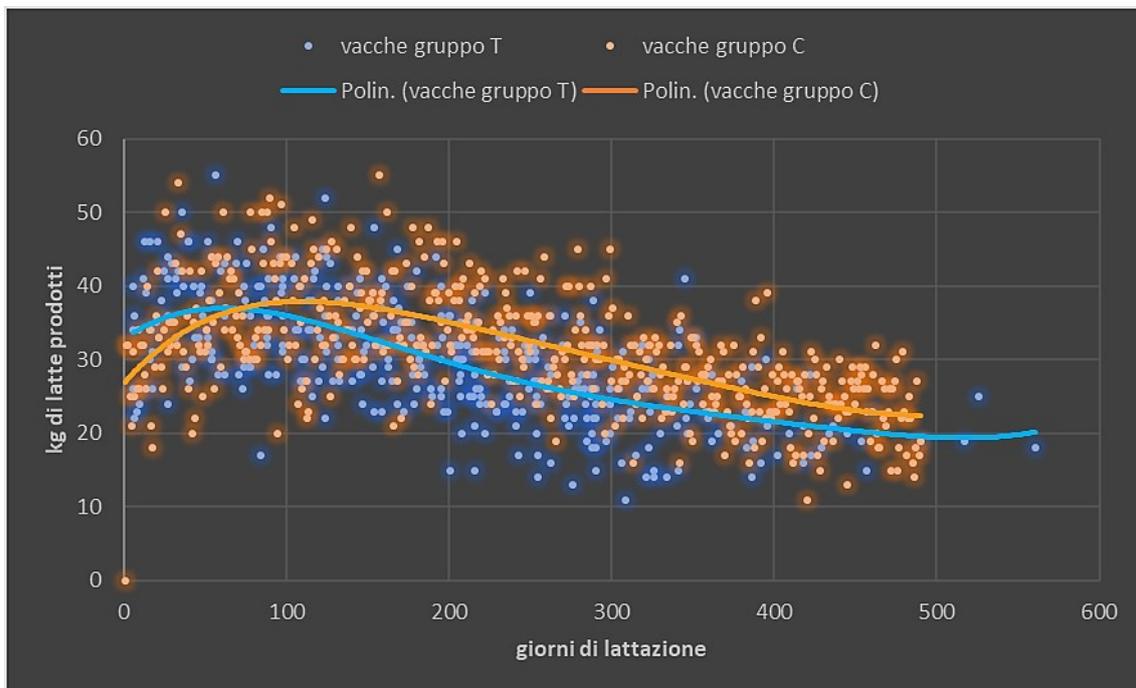
Figura 8.2 Contenuto percentuale di grasso e proteine per gruppo (CF 2019)



Da questa suddivisione, emerge che i valori medi percentuali, sia di grasso, sia di proteine, sono maggiori per le vacche del gruppo che sarebbe stato poi destinato al trattamento con i prodotti sperimentali.

Nel grafico 8.3 sono rappresentate le curve di lattazione delle vacche in produzione nell'anno 2019, sempre distinguendo gli animali per gruppo (di trattamento o di controllo).

Grafico 8.3 Curve di lattazione per gruppo T e C (CF 2019)



Il picco produttivo, definito come la massima produzione di latte durante la lattazione, solitamente avviene tra le 4 e le 6 settimane dopo il parto, anche se, in esemplari di razza Frisona, si possono osservare picchi medi più tardivi, intorno agli 80 giorni. Dopodiché, la curva scende in modo più o meno progressivo.

In questo grafico si può osservare come, per le vacche del gruppo di controllo, il picco sia molto ritardato (si aggira intorno alla quattordicesima settimana) rispetto al gruppo di trattamento, il quale è, invece, più coerente con i dati solitamente osservati. Il fatto di avere un picco nella curva di lattazione più o meno anticipato può dipendere dalla diversa composizione del gruppo: la percentuale di animali primipari nei due gruppi è, infatti, diversa: nel gruppo T le vacche primipare costituiscono il 34%, mentre, nel gruppo C, il 48%. Questo aspetto relativo all'influenza che la composizione del gruppo ha sui risultati è stato approfondito nel sotto-paragrafo 8.1.3.

Nonostante il ritardo nel picco, la persistenza produttiva è migliore nel gruppo C, mantenendosi elevata per tutta la durata della lattazione. Una buona persistenza è indice di un migliore bilancio energetico, maggiore salute degli animali e quindi di una migliore gestione sanitaria, manageriale, ambientale e nutrizionale delle prime settimane di lattazione (Fantini, 2012).

Osservando i giorni di lattazione medi per gruppo, i quali potrebbero influenzare la produzione di latte dei due gruppi, si rileva una media di 168,4 \pm 111,4 giorni per le vacche del gruppo C e di 199,3 \pm 116,1 per le vacche del gruppo T, valori non eccessivamente distanti tra loro.

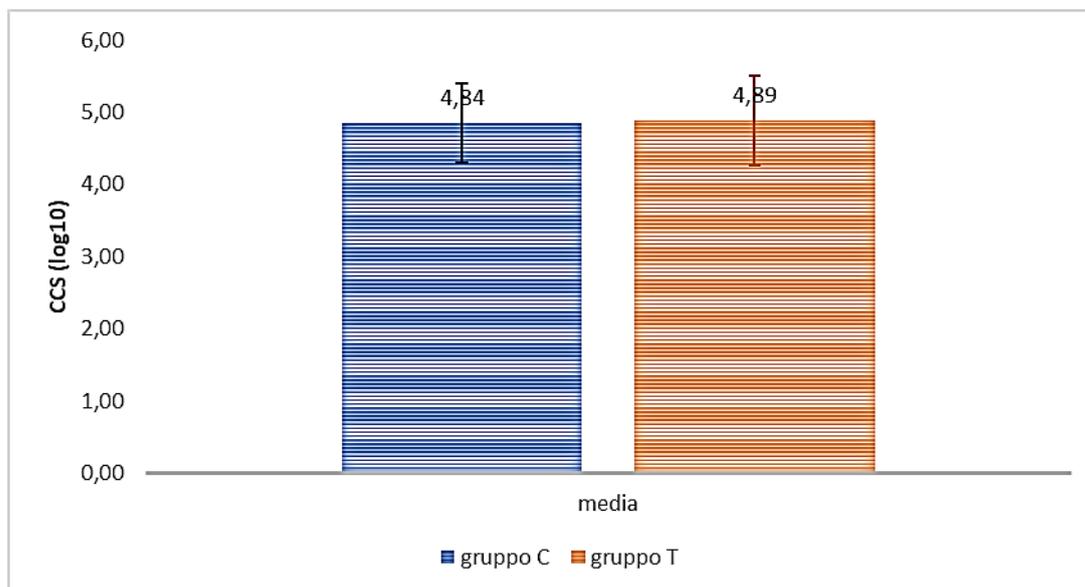
Dai risultati ottenuti, si può supporre che gli animali destinati al gruppo di controllo abbiano prodotto mediamente più degli altri; mentre, sembrerebbe che le vacche del gruppo di trattamento abbiano fatto, in media, una lattazione più produttiva nei primi giorni, calata, però, più rapidamente dal centesimo giorno in poi.

8.1.2 Cellule somatiche nell'anno 2019

Dai controlli funzionali eseguiti nel periodo tra gennaio e novembre 2019 è stato possibile analizzare, a livello aziendale, i dati relativi alla conta delle cellule somatiche (CCS) nel latte. Si rileva una media di CCS pari a 4,86 \pm 0,58, non particolarmente elevata. Un valore logaritmico decimale delle cellule somatiche corrisponde all'incirca a una media di 75 000 cell/ml.

Ciò che interessa maggiormente, però, è come il dato relativo alla CCS sia distribuito all'interno dei due gruppi (T o C). I risultati dell'analisi sono riportati nel grafico 8.4. I valori in tabella si riferiscono al logaritmo decimale dei valori relativi alla conta delle cellule somatiche.

Grafico 8.4 Medie delle cellule somatiche (log10) distinte per gruppo T e C (CF 2019)



Anche in questo caso, come per i dati produttivi, è possibile rilevare una differenza, anche se molto lieve, nelle medie di animali appartenenti a gruppi diversi. In particolare, nelle vacche che sarebbero state successivamente inserite nel gruppo di trattamento, si rilevano valori di poco superiori rispetto ai valori riferiti al gruppo di controllo.

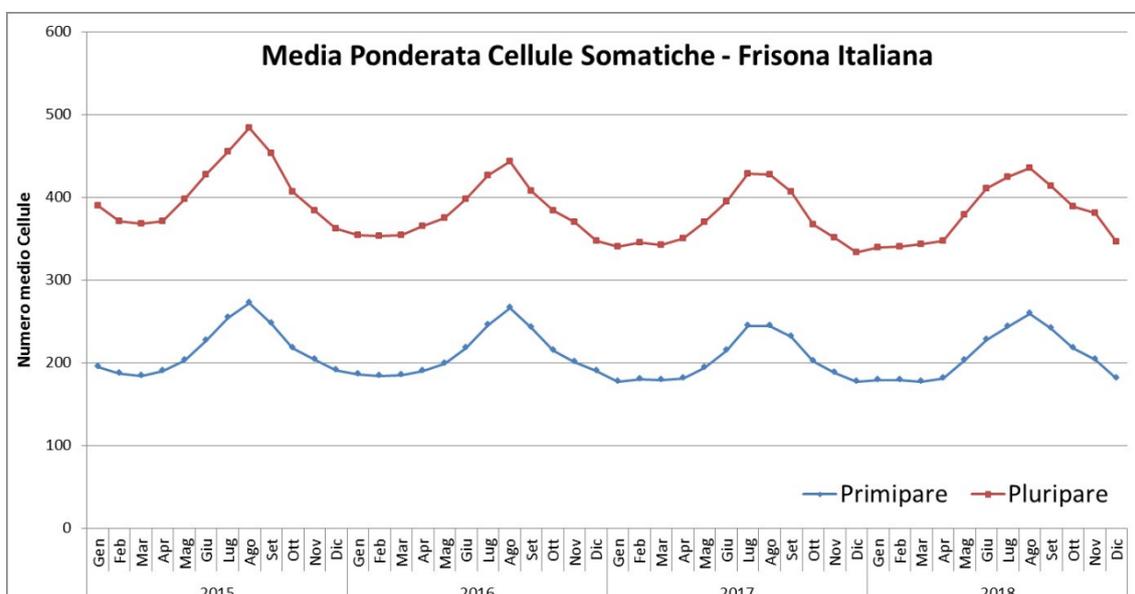
8.1.3 Effetto del numero di parto sui parametri analizzati

All'interno dei gruppi trattato e controllo, le differenze nei valori produttivi e nella conta delle cellule somatiche potrebbero essere, in parte, riconducibili a differenze nella composizione interna dei gruppi: la presenza di un maggior numero di vacche primipare può infatti comportare differenze nelle curve di lattazione e nella CCS.

Il picco produttivo delle primipare è solitamente l'80% di quello delle secondipare e il 75% del picco di vacche a più di due parti. La persistenza delle vacche primipare, inoltre, è solitamente più elevata (Fantini, 2012).

Per quanto riguarda la conta delle cellule somatiche, si hanno normalmente valori maggiori nelle vacche con un maggior numero di lattazioni. Si riporta, di seguito, un grafico rappresentante la media ponderata (sui kg di latte prodotto) delle cellule somatiche di bovine di razza Frisona calcolata a partire dai controlli funzionali eseguiti a livello nazionale tra il 2015 e il 2018. Gli animali sono stati suddivisi tra primipare e pluripare e la differenza nella CCS tra animali con diverso ordine di parto è molto marcata.

Grafico 8.5 Media di CCS per Frisone italiane primipare e pluripare tra il 2015 e il 2018 (Controlli Funzionali nazionali)



Tondo, 2019

Per verificare se, nel concreto, ci fossero differenze tra medie di animali primipari e medie di vacche pluripare, si è effettuata una analisi della varianza relativa sia alla produzione di latte (kg/gg), sia alla conta delle cellule somatiche (log10). I due gruppi sperimentali sono stati sottoposti a questa analisi in modo indipendente.

Si riportano in tabella i dati riguardanti l'ANOVA della produzione di latte in primipare e pluripare per il gruppo C (Tabella 8.6) e per il gruppo T (Tabella 8.7).

Tabella 8.6 ANOVA tra primipare e pluripare - Produzione latte (kg/gg) - Gruppo C

RIEPILOGO

<i>Gruppi</i>	<i>Conteggio</i>	<i>Somma</i>	<i>Media</i>	<i>Varianza</i>
PRIMIPARE	234	6904	29,5	37,0
PLURIPARE	255	8312	32,6	82,0

ANALISI
VARIANZA

<i>Origine della variazione</i>	<i>SQ</i>	<i>gdl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>Valore di significatività</i>	<i>F crit</i>
			1166,46			
Tra gruppi	1166,5	1	4	19,3	1,37643E-05	3,86
In gruppi	29443,9	487	60,460			
Totale	30610,4	488				

Come si può notare in tabella 8.6, la F ottenuta dall'analisi di varianza è maggiore del valore di F critico; la significatività è alta (il valore di significatività è infatti inferiore a 0,05). Se ne deduce che sia necessario rifiutare l'ipotesi nulla, secondo la quale tra le medie dei due gruppi (primipare e pluripare) non ci sarebbero differenze. Si accetta, dunque, l'ipotesi di avere delle differenze tra le medie produttive di vacche primipare e di vacche pluripare nel gruppo C.

Tabella 8.7 ANOVA tra primipare e pluripare - Produzione latte (kg/gg) - Gruppo T

RIEPILOGO

<i>Gruppi</i>	<i>Conteggio</i>	<i>Somma</i>	<i>Media</i>	<i>Varianza</i>
Primipare	131	3542	27,0	34,3
Pluripare	249	7803	31,3	74,6

ANALISI
VARIANZA

<i>Origine della variazione</i>	<i>SQ</i>	<i>gdl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>Valore di significatività</i>	<i>F crit</i>
Tra gruppi	1586,6	1	1586,6	26,1	5,0771E-07	3,87
In gruppi	22950,5	378	60,7			
Totale	24537,0	379				

Anche per il gruppo T l'analisi della varianza ha portato alla necessità di rifiutare l'ipotesi nulla, secondo la quale tra le medie produttive di vacche primipare e di vacche pluripare non esiste alcuna differenza significativa.

Se ne deduce, quindi, che, sia nel gruppo di controllo, sia nel gruppo trattato, esistono differenze nelle medie dei due gruppi (gruppo primipare e gruppo pluripare) riferite ai kg di latte prodotti al giorno per vacca. Si tratta di un risultato prevedibile: l'ordine di parto è considerato infatti un fattore normalmente influente le performance produttive (Fantini, 2012; Fantini, 2020).

Nelle tabelle 8.8 e 8.9 si riporta l'ANOVA della conta delle cellule somatiche in primipare e pluripare rispettivamente del gruppo C e del gruppo T.

Tabella 8.8 ANOVA tra primipare e pluripare - CCS (log10 cell/ml) - Gruppo C

RIEPILOGO

<i>Gruppi</i>	<i>Conteggio</i>	<i>Somma</i>	<i>Media</i>	<i>Varianza</i>
Primipare	234	1119,3	4,78	0,27
Pluripare	255	1249,2	4,90	0,32

**ANALISI
VARIANZA**

<i>Origine della variazione</i>	<i>SQ</i>	<i>gdl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>Valore di significatività</i>	<i>F crit</i>
Tra gruppi	1,62	1	1,62	5,50	0,019464155	3,86
In gruppi	144,0	487	0,30			
Totale	145,6	488				

Nell'analisi di varianza riportata in tabella 8.8 si è ottenuta una F maggiore del valore critico e con un valore di significatività inferiore a 0,05; anche per quanto riguarda questa analisi, si deve rifiutare l'ipotesi nulla.

Tra le medie dei due gruppi (primipare e pluripare), ottenute valutando la conta delle cellule somatiche, si sono riscontrate differenze. Si tratta, anche in questo caso, di risultati attesi: solitamente, infatti, una vacca alla prima lattazione ha una conta di cellule somatiche mediamente inferiore rispetto a una vacca pluripara (Jashari et al., 2016; Tondo, 2019; Zecconi et al, 2019).

Lo stesso ragionamento si può applicare all'ANOVA effettuata sul gruppo T (tabella 8.9).

Tabella 8.9 ANOVA tra primipare e pluripare - CCS (log10 cell/ml) - Gruppo T

RIEPILOGO

<i>Gruppi</i>	<i>Conteggio</i>	<i>Somma</i>	<i>Media</i>	<i>Varianza</i>
Primipare	131	614,8	4,69	0,20
Pluripare	249	1241,6	4,99	0,44

ANALISI VARIANZA

<i>Origine della variazione</i>	<i>SQ</i>	<i>gdl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>Valore di significatività</i>	<i>F crit</i>
Tra gruppi	7,40	1	7,40	20,5	7,85E-06	3,87
In gruppi	136,2	378	0,36			
Totale	143,6	379				

Anche per quanto riguarda la conta delle cellule somatiche si conferma che i valori medi del gruppo delle primipare sono differenti dai valori medi del gruppo delle pluripare, in coerenza con quanto riportato da Tondo (2019); il risultato vale sia per il gruppo C, sia per il gruppo T.

Il fatto che i gruppi siano costituiti da una diversa percentuale di primipare (34% nel T e 48% nel C) potrebbe, quindi, spiegare la curva di lattazione del gruppo C, più persistente rispetto a quella registrata nel gruppo T (grafico 8.3).

In quest'ultimo gruppo, inoltre, il picco di lattazione si presenta in modo anticipato e più definito rispetto a quanto avviene nel gruppo T, caratteristica tipica di vacche pluripare.

Allo stesso modo, si può ipotizzare che il valore relativo alla conta delle cellule somatiche, superiore per il gruppo T, sia dovuto al fatto che il numero di primipare in quel gruppo sia percentualmente inferiore.

Per verificare queste ipotesi, si sono analizzati i dati produttivi (curve di lattazione) nei due gruppi, trattato e di controllo, distinguendo, quindi, vacche pluripare da vacche primipare.

I dati relativi alla produzione degli animali sono riportati nel grafico 8.10 (gruppo Controllo) e nel grafico 8.11 (gruppo Trattato).

Grafico 8.10 Curve di lattazione del gruppo C di vacche primipare e pluripare (CF 2019)

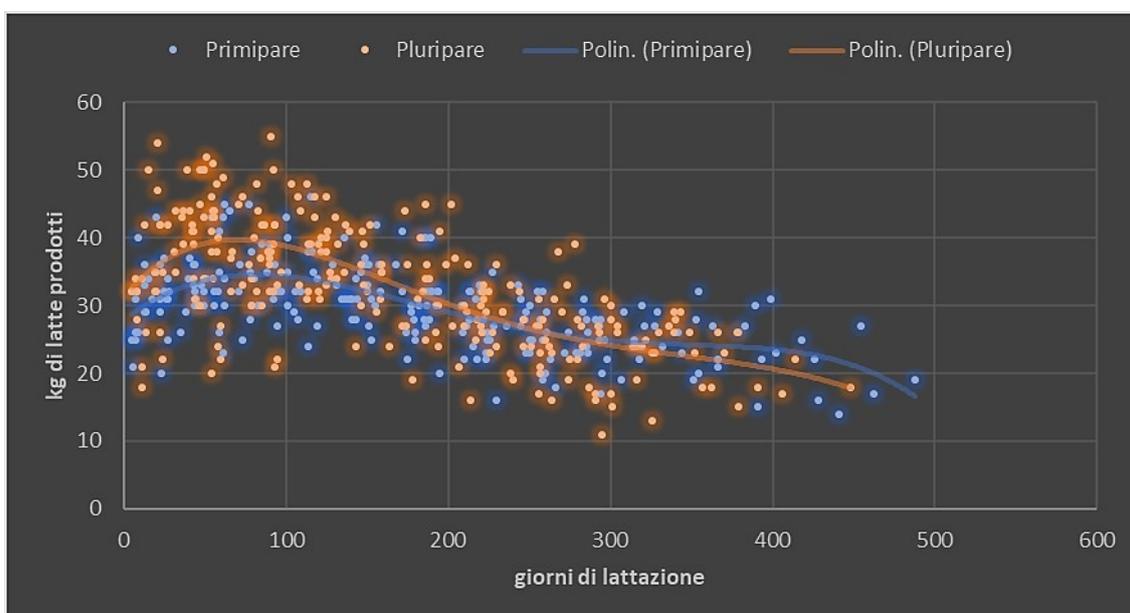
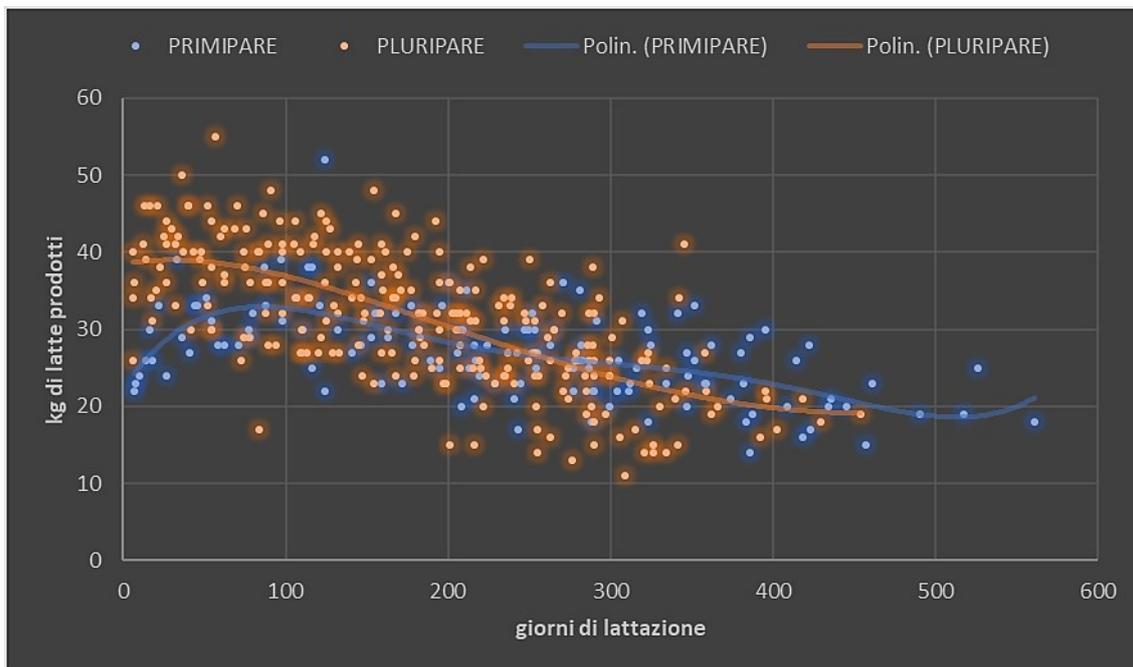


Grafico 8.11 Curve di lattazione del gruppo T di vacche primipare e pluripare (CF 2019)



Dai grafici si può notare la differenza nelle curve di lattazione di primipare e pluripare. Nelle prime, infatti, si hanno produzioni inferiori, picchi produttivi leggermente ritardati e persistenza maggiore. Le differenze produttive tra vacche a diverso ordine di parto sono in coerenza con quanto riportato da Fantini (2012).

8.2 La situazione aziendale nel 2020

Per l'analisi della situazione aziendale al momento della sperimentazione sono stati presi in considerazione i dati del controllo funzionale effettuato nel mese di gennaio 2020. Il controllo funzionale è stato eseguito l'8 gennaio, una settimana prima dell'inizio della sperimentazione.

Si riportano di seguito i dati produttivi aziendali, considerando separatamente gli animali del gruppo trattato dagli animali del gruppo controllo.

Tabella 8.12 Dati produttivi aziendali - gruppo C (CF gen. 2020)

Gruppo C	Produzione (kg/d)	Grasso (%)	Proteine (%)
Media	27,1	4,40	3,57
DS	5,43	0,52	0,41
Min	15,0	2,40	2,60
Max	42,0	5,70	4,80

Tabella 8.13 Dati produttivi aziendali - gruppo T (CF gen. 2020)

Gruppo T	Produzione (kg/d)	Grasso (%)	Proteine (%)
Media	35,0	4,11	3,13
DS	9,82	0,86	0,51
Min	0,00	0,00	0,00
Max	55,0	5,80	4,00

In media, le vacche del gruppo C risultano essere meno produttive dal punto di vista quantitativo (kg di latte prodotto al giorno); il latte di questo gruppo, però, risulta qualitativamente migliore (% di grasso e % proteine più alte).

In relazione al commento dei dati produttivi, si riportano i valori medi dei giorni di lattazione per gruppo. In funzione del giorno di lattazione varia, infatti, la produzione di latte dell'animale; si hanno solitamente produzioni di latte crescenti fino alla quarta/sesta settimana di lattazione, quando viene raggiunto il picco produttivo, a cui segue una decrescita produttiva meno repentina, interrotta con la messa in asciutta dell'animale. Per il gruppo C la media dei giorni di lattazione è pari a $207,7 \pm 99,8$, ed è quindi più comprensibile il livello produttivo inferiore di questo gruppo di animali rispetto al gruppo T, dove, invece, si riscontra un valore medio di $41,2 \pm 27,3$ giorni di lattazione.

Per quanto riguarda la conta delle cellule somatiche, gli animali del gruppo di controllo, con un valore medio di $4,92 \pm 0,59$ log₁₀ cell/ml, risultano essere mediamente peggiori rispetto a quelli del gruppo trattato, in cui si è invece rilevato un valore medio di $4,69 \pm 0,50$ log₁₀ cell/ml.

Si ricorda, però, che i dati soprariportati, a differenza dei dati riferiti all'anno 2019, rappresentano il controllo funzionale del solo mese di gennaio. Danno un'idea della situazione aziendale di partenza al momento della sperimentazione ma non possono essere confrontati con i dati dell'anno precedente.

Si sono poi considerate le percentuali di vacche primipare nei due gruppi, in modo da comprendere meglio le eventuali differenze tra animali trattati e animali di controllo nei risultati che si sarebbero poi raccolti. La percentuale di vacche primipare nel gruppo T e nel gruppo C, però, è risultato un fattore poco influente sulle differenze tra gruppi, in quanto si è rilevata la stessa identica percentuale di animali (41%) in entrambe le suddivisioni.

Si è potuto, quindi, escludere il fattore legato all'ordine di parto che avrebbe potuto avere un'influenza sui dati rilevati, come era accaduto per quelli raccolti durante i controlli funzionali dell'anno 2019.

Nel paragrafo successivo si riportano i risultati relativi alle analisi cito-batterologiche ottenuti durante la sperimentazione.

8.3 Risultati cito-batterologici

Si riportano, dapprima, i valori medi aziendali relativi alle cellule somatiche, suddivisi per quarto (anteriore sinistro AS, anteriore destro AD, posteriore destro PD e posteriore sinistro PS). Si può notare che i punteggi medi per anteriori e posteriori non presentano valori dissimili.

Tabella 8.14 Valori medi aziendali relativi alle cellule somatiche (log₁₀ cell/ml), suddivisi per quarto

	AS	AD	PD	PS
<i>MEDIA</i>	3,76	3,79	3,88	3,81
<i>DS</i>	0,91	0,96	0,98	0,92
<i>MIN</i>	3,00	3,00	3,00	3,00
<i>MAX</i>	6,77	6,88	6,93	6,87

Dai risultati cito-batterologici si è poi potuta calcolare la percentuale di rilievi positivi al batteriologico e con cellule somatiche pari o superiori a 200 000 cell/ml; le percentuali sono state calcolate su tutta la mandria, in modo complessivo, e separatamente per gruppo di trattamento (C o T) (Grafico 8.15).

Come obiettivo, la prevalenza di animali con una conta di cellule somatiche pari o superiore alle 200 000 dovrebbe essere inferiore al 30%¹². Di fatto, è ciò che si riscontra in questa azienda, in cui la percentuale di rilievi che riportano valori pari o superiori a questo è del 24%.

Anche la percentuale di animali con batteriologico positivo non è elevatissima (23%) se si considera, per esempio, che in un'indagine sul latte di massa di 114 aziende nella provincia di Piacenza si è riscontrata una percentuale di animali sani pari solo al 46% (Dati IZS Piacenza¹³).

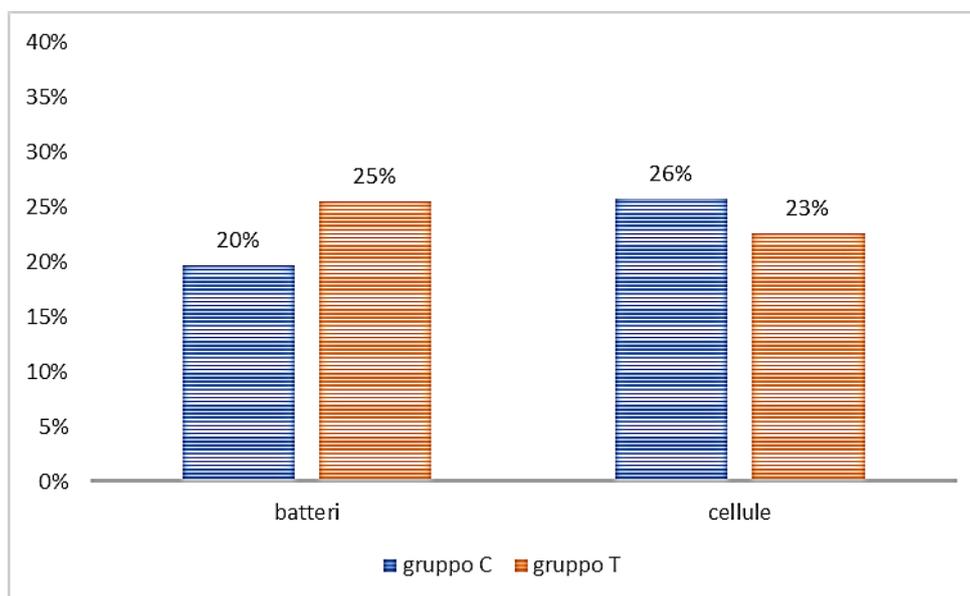
Gli obiettivi, sia per la contaminazione batterica, sia per la conta di cellule somatiche, dovrebbero essere, in ogni caso, definiti a livello aziendale e aggiornati periodicamente, così da muoversi verso un continuo miglioramento delle condizioni sanitarie degli animali. L'obiettivo ultimo è la massima riduzione di contaminazioni batteriche e di cellule somatiche¹⁴.

¹² Nuovi concetti di gestione per il miglioramento della qualità del latte (2013)

¹³ Corso di aggiornamento "Parametri igienico-sanitari del latte bovino: problematiche connesse con il controllo e l'autocontrollo in azienda" Reggio Emilia, 21-22 aprile 2010

¹⁴ *Ibidem*.

Grafico 8.15 Percentuale di campioni positivi al batteriologico e CCS $\geq 200\ 000$ cell/ml, per gruppo sperimentale



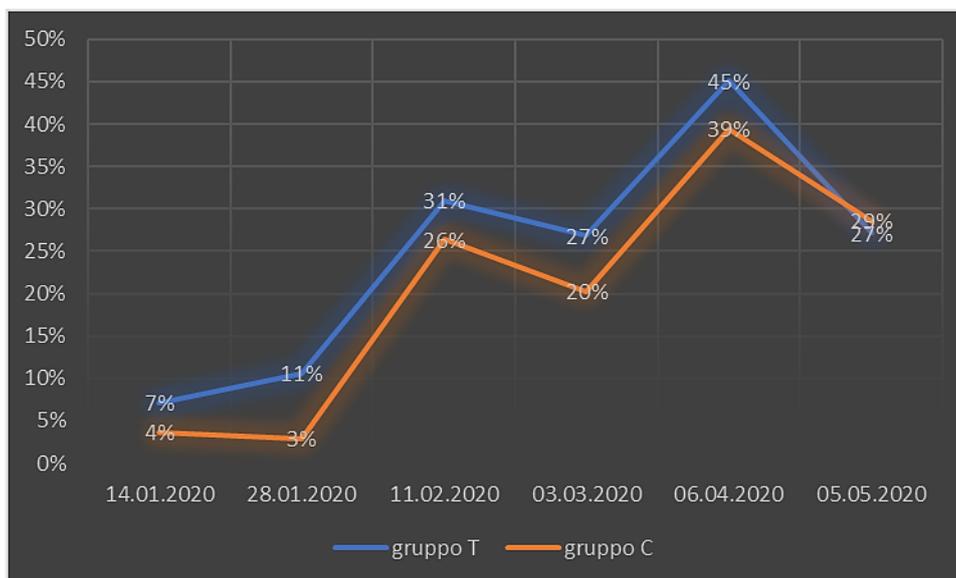
Nel grafico 8.15 si osserva che, nel gruppo C, la percentuale di animali positivi al batteriologico è inferiore rispetto alla percentuale di animali con cellule alte nel latte. Viceversa, per il gruppo T. La conta delle cellule somatiche, come già anticipato, è solo un indicatore della probabilità che ci sia in atto una mastite, ma non è un indicatore diretto della presenza di infezione.

Se si confrontano i valori di batteri e cellule dei due gruppi (T e C), non si notano grandi differenze. Inoltre, si tratta di percentuali complessive e sommatorie di tutto il periodo del campionamento: sono, infatti, compresi anche i primi mesi della sperimentazione, in cui ancora non si potevano probabilmente evidenziare differenze tra gruppi dovute all'utilizzo o meno del prodotto.

Pertanto, si sono presi in analisi gli stessi dati relativi a cellule e batteri distribuendo le percentuali per data di prelievo, in modo da osservare l'andamento di questi due indicatori a livello aziendale, nel tempo. Si sono valutati separatamente i due gruppi sperimentali, così da cogliere differenze imputabili all'impiego o meno del prodotto a base di batteriocine.

Nel grafico 8.16 si riporta la percentuale di campioni positivi al batteriologico per data di rilevamento e distinguendo i due gruppi sperimentali.

Grafico 8.16 Percentuale di campioni positivi al batteriologico dei due gruppi sperimentali, per data di rilevamento

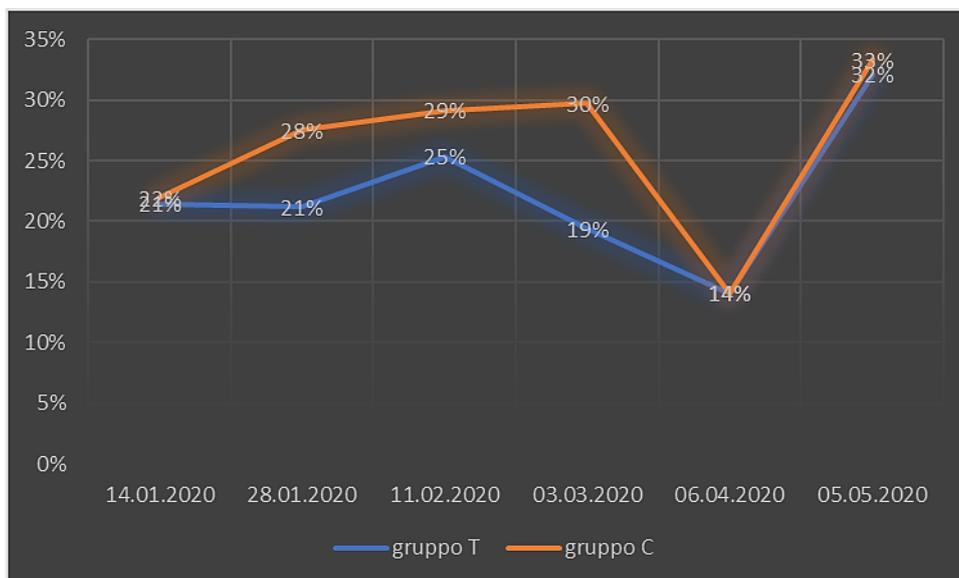


La percentuale di campioni positivi al batteriologico, già prima dell'applicazione del prodotto sperimentale, risultava essere maggiore nel gruppo destinato al trattamento (7% T, 4% C). Nei due gruppi la percentuale di animali infetti ha andamento sovrapponibile, ad eccezione dell'ultimo rilevamento: in data 5 maggio la percentuale di animali con batteriologico positivo del gruppo di controllo supera la percentuale del gruppo trattato, evento mai rilevato nei mesi precedenti. I dati relativi all'ultimo rilevamento potrebbero, potenzialmente, essere legati a eventi casuali e non all'utilizzo del prodotto sperimentale. Tra marzo e aprile, però, si rilevano già lievi differenze tra gruppi: il numero di animali positivi al batteriologico nel gruppo di controllo è cresciuto percentualmente più che nel gruppo trattato (19 punti percentuali in più per il gruppo C contro i 18 in più per il gruppo T), per poi decrescere in modo più marcato tra aprile e maggio (-18% per il gruppo trattato e -10% per il gruppo del controllo).

Da parte dei prodotti a base di batteriocine sperimentali si ipotizza, quindi, una possibile influenza positiva e paragonabile al prodotto tradizionale sulla frequenza batterica nel latte, come era risultato anche dallo studio sperimentale eseguito da Brasca et al. (2018).

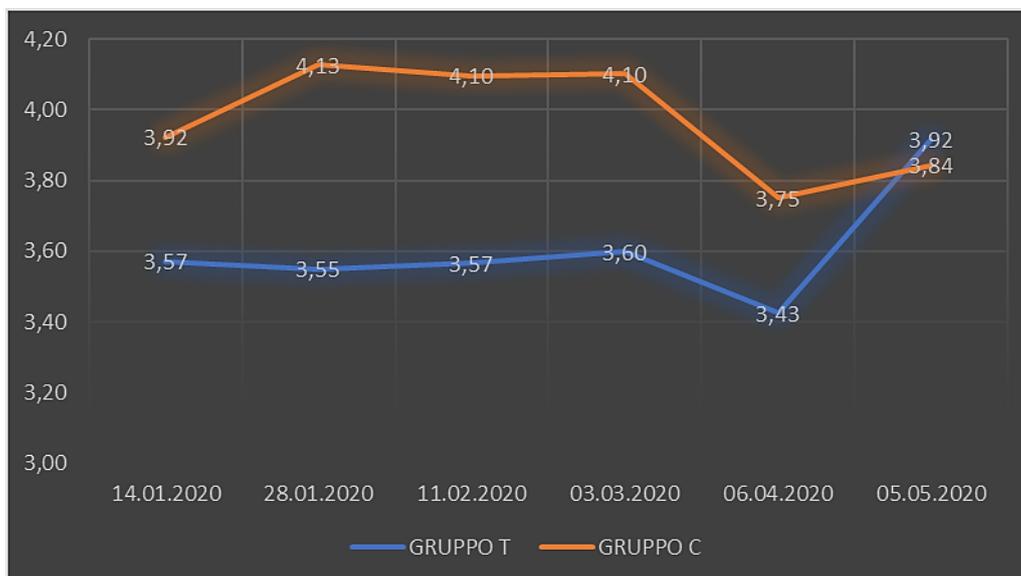
Per quanto riguarda la conta delle cellule somatiche, nel grafico 8.17 si riportano le percentuali di rilievi con un livello di cellule pari o superiore alle 200 000 cell/ml. Le percentuali sono state calcolate distintamente per gruppo e per data di rilevamento. I valori riportati per il gruppo di trattamento sembrano essere inferiori o sovrapponibili a quelli registrati per gli animali del gruppo di controllo.

Grafico 8.17 Percentuale di rilievi con cellule somatiche $\geq 200\ 000$ cell/ml dei due gruppi sperimentali, per data di rilevamento



Per valutare più precisamente i valori relativi alla conta delle cellule somatiche sono stati presi in considerazione i valori logaritmici decimali medi ottenuti nel corso delle rilevazioni; i risultati sono riportati nel grafico 8.18.

Grafico 8.18 CCS (log10 cell/ml) nel latte dei due gruppi sperimentali, per data di rilevamento



Dai grafici riguardanti la conta delle cellule somatiche risulta che i conteggi più elevati siano stati rilevati in percentuale maggiore per il gruppo di controllo, per quasi tutta la durata della sperimentazione. Se si confrontano i risultati con i dati dei controlli funzionali dell'anno precedente, risulta che, invece, il gruppo con la media maggiore di CCS era il gruppo di vacche poi destinate al trattamento. Si ricorda, però, che nel 2019 i due gruppi non contavano la stessa percentuale di primipare, come è stato, invece, nel 2020; si è dimostrato, infatti, la probabile influenza che un numero maggiore o inferiore di vacche al primo parto potrebbe avere sui risultati relativi alla CCS. Prima dell'inizio della sperimentazione, dall'analisi dei controlli funzionali di gennaio 2020 risultava, infatti, per il gruppo di controllo, una percentuale maggiore relativa a questo dato.

Tra il mese di aprile e maggio, però, l'andamento differente tra i due gruppi si inverte. Occorrerebbe ricercare se questo evento sia legato alla casualità, all'utilizzo persistente del prodotto sperimentale, o ad un fattore terzo. Se si fossero eseguiti dei campionamenti successivi al 5 maggio, probabilmente si sarebbe potuto individuare se l'inversione all'interno dei due gruppi fosse stato o meno un evento isolato.

Complessivamente, si può solo affermare che, ad eccezione dell'ultima rilevazione, il livello di cellule somatiche nel gruppo delle vacche trattate si è mantenuto relativamente costante; in tale gruppo, inoltre, le variazioni riguardanti questo dato sono inferiori rispetto al gruppo di controllo, fatto che lascia ben sperare riguardo alla buona efficacia del prodotto sperimentale.

Il prodotto sperimentale, ad eccezione dell'ultimo rilevamento, non sembra aver influito negativamente sulle CCS dei campioni di latte, come invece era avvenuto in altri casi (Beecher et al., 2009).

Occorre verificare se, effettivamente, le differenze riscontrate nei gruppi per quanto riguarda i dati relativi alla conta delle cellule somatiche possano ritenersi significative. È stata fatta, quindi, una analisi della varianza (tabella 8.19); per l'analisi delle cellule somatiche sono stati trasformati i valori delle cellule somatiche dei quattro quarti in forma logaritmica, per poi calcolare la media di cellule per vacca.

Tabella 8.19 ANOVA tra gruppo C e gruppo T - CCS (log10 cell/ml)

RIEPILOGO

<i>Gruppi</i>	<i>Conteggio</i>	<i>Somma</i>	<i>Media</i>	<i>Varianza</i>
gruppo C	432	1717,4	3,98	0,54
gruppo T	412	1489,0	3,61	0,44

ANALISI VARIANZA

<i>Origine della variazione</i>	<i>SQ</i>	<i>gdl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>Valore di significatività</i>	<i>F crit</i>
Tra gruppi	27,6	1	27,6	55,9	1,92E-13	3,85
In gruppi	415,2	842	0,49			

Totale	442,8	843
--------	-------	-----

Dalla tabella 8.19 si deduce che l'analisi della varianza abbia portato al rifiuto dell'ipotesi nulla, secondo cui le medie rilevate tra gruppi non risultano essere significativamente differenti. Infatti, la F ottenuta è di molto superiore alla F critica e la significatività è molto alta, essendo notevolmente inferiore al valore di alfa scelto (pari a 0,05). Se ne deduce che tra i due gruppi ci siano delle differenze significative.

L'analisi della varianza ha permesso di capire se le differenze rilevate tra gruppo trattato e gruppo controllo fossero significative. Queste differenze tra gruppi, però, potrebbero essere dovute all'utilizzo di prodotti di mungitura differenti o ad altri fattori esterni. Si è, quindi, eseguita una analisi della varianza a due fattori per verificare se all'interno dei due gruppi esistessero differenze tra le medie dei valori relativi alla conta delle cellule somatiche dei sei campionamenti. La suddivisione in sei colonne corrisponde alle 6 date dei rilevamenti, dall'1 al 6 rispettivamente 14 gennaio, 28 gennaio, 11 febbraio, 3 marzo, 6 aprile e 5 maggio.

Tabella 8.20 ANOVA a due fattori: gruppo sperimentale (T e C) e data di rilevamento per il parametro CCS (log₁₀ cell/ml)

RIEPILOGO	1	2	3	4	5	6	Totale
C							
Conteggio	56	56	56	56	56	56	336
Somma	222,6	231,1	228,3	231,4	206,5	211,4	1331,2
Media	4,0	4,1	4,1	4,1	3,7	3,8	4,0
Varianza	0,54	0,57	0,57	0,60	0,32	0,56	0,55

T

Conteggio	56	56	56	56	56	56	336
Somma	200,0	192,1	195,4	194,7	186,3	211,8	1180,3
Media	3,57	3,43	3,49	3,48	3,33	3,78	3,51
Varianza	0,36	0,24	0,41	0,22	0,16	0,49	0,33

Totale

Conteggio	112	112	112	112	112	112
Somma	422,6	423,1	423,7	426,1	392,8	423,2
Media	3,77	3,78	3,78	3,80	3,51	3,78
Varianza	0,48	0,52	0,58	0,51	0,27	0,52

ANALISI VARIANZA

<i>Origine della variazione</i>	<i>SQ</i>	<i>gdl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>Valore di significatività</i>	<i>F crit</i>
Campione	33,9	1	33,9	80,9	2,54E-18	3,86
Colonne	7,19	5	1,44	3,43	0,004519	2,23
Interazione	9,49	5	1,90	4,53	0,000455	2,23
In	276,5	660	0,42			
Totale	327,0	671				

Dai risultati di questa analisi si rileva che tra le medie dei due gruppi e tra le medie dei sei campionamenti esistono delle differenze significative (valore di significatività <0,05).

Come visto nel grafico 8.18, eseguendo campionamenti in date differenti si influenzava diversamente l'andamento della conta di cellule somatiche all'interno dei gruppi C e T. Effettivamente, quindi, dei fattori esterni potrebbero aver influenzato le medie dei due gruppi e aver agito in modo differente nel tempo.

In seguito, poi, ad un'analisi della varianza volta a indagare in modo indipendente le differenze tra medie di CCS nei sei campionamenti, si è scoperto che le differenze nelle medie dei campionamenti erano significative per entrambi i gruppi. Questo dato porta a supporre che le differenze rilevate tra medie dei gruppi T e C (tabella 8.19) siano dovute a fattori esterni comuni ai gruppi.

Si è potuto evidenziare, però, che la significatività dell'analisi fosse di molto maggiore nel gruppo T (valore di significatività pari a 0,0001), rispetto al gruppo di controllo (valore di significatività pari a 0,006). Non si può, in ogni caso, affermare che le differenze riscontrate per il gruppo sottoposto a trattamento siano esclusivamente dovute all'utilizzo del prodotto sperimentale.

Altri fattori esterni indagabili in questo studio sono le condizioni di igiene degli animali e di salute del capezzolo, analizzati nel paragrafo successivo.

8.4 Igiene score e Teat apex score

Per l'analisi delle valutazioni di igiene dell'animale e di stato di salute dei capezzoli si sono considerati i punteggi medi assegnati nel corso della sperimentazione (uscite del 28 gennaio, febbraio e marzo). Si riportano, nella tabella 8.21, i valori medi dei punteggi totali (valutazioni delle tre uscite) e la percentuale delle valutazioni superiori o pari a 3. In questo modo, è possibile avere un'idea della situazione igienica e sanitaria aziendale. I punteggi sono distinti per zone anatomiche (fianchi, arti posteriori, mammella), per quanto

riguarda l'Hygiene Score (HS) e per capezzolo (anteriori/posteriori, destro/sinistro), per quanto concerne il Teat Apex Score (TAS).

Tabella 8.21 HS e TAS medi aziendali e percentuale di valutazioni ≥ 3

Punteggi	HS fianchi	HS arti posteriori	HS mammella	TAS AD	TAS AS	TAS PD	TAS PS
Media	1,92	2,34	1,96	1,91	1,95	1,79	1,78
DS	0,97	0,69	0,75	0,73	0,78	0,61	0,60
% \geq di 3	25%	33%	21%	18%	22%	10%	8%

Solitamente, la percentuale di valutazioni pari a 3 e 4 nell'Hygiene score con valori compresi tra il 5 e il 10% per la mammella, tra il 24 e il 54% per gli arti e tra il 6 e il 17% per i fianchi è considerata ancora accettabile. Se si superano queste percentuali, occorre intervenire adeguatamente per ridurre lo stato di imbrattamento degli animali e, quindi, il rischio di infezioni mastitiche¹⁵.

Dai risultati ottenuti si rilevano valori non accettabili per quanto riguarda l'area della mammella (21% di valutazioni pari o superiori a 3) e l'area dei fianchi (25% di valutazioni pari o superiori a 3); l'area degli arti posteriori, con una percentuale di valutazioni pari o superiori a 3 del 33%, rientra ancora in valori accettabili. Le condizioni ambientali che influenzano questi valori, come, per esempio, la tipologia di cuccette in azienda o il livello di pulizia della zona di riposo e della sala di attesa, devono quindi migliorare, se l'obiettivo è quello di ridurre l'incidenza di infezioni mammarie e migliorare lo stato sanitario degli animali.

Si riporta, nella tabella 8.22, la percentuale dei punteggi superiori o pari a 3 per Teat Apex Score, considerando, dapprima, tutte le valutazioni in modo complessivo e, poi, suddividendole tra capezzoli anteriori e posteriori.

¹⁵ Nuovi concetti di gestione per il miglioramento della qualità del latte (2013)

Tabella 8.22 Percentuali di TAS ≥ 3

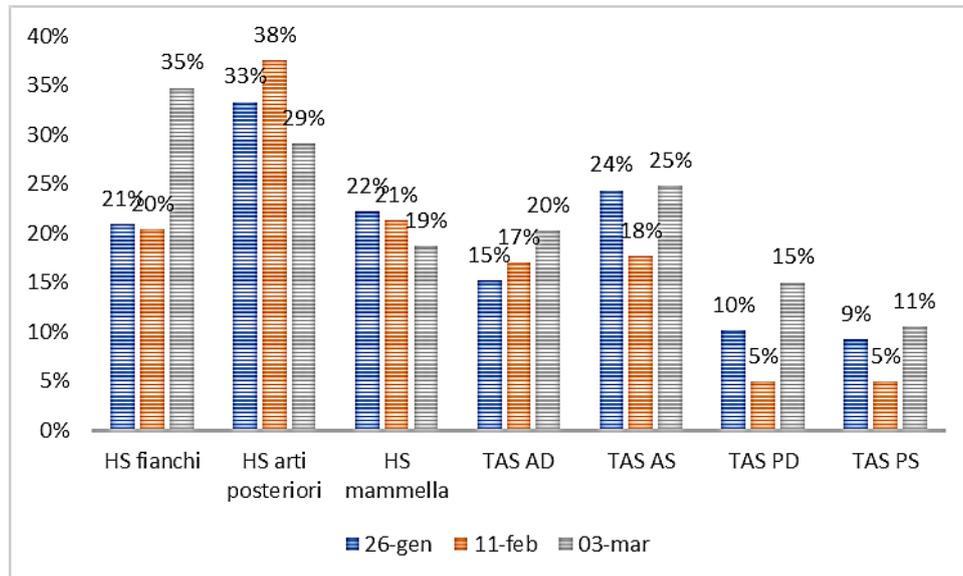
TEAT APEX SCORE ≥ 3	14%
C. ANTERIORI	20%
C. POSTERIORI	9%

Per quanto riguarda il Teat apex score, si rendono necessari interventi se la percentuale di valutazioni di 3 e 4 supera il 20% (Mein et al., 2001).

In questo caso, quindi, la situazione aziendale ricade ancora in valori accettabili, ad eccezione della media riportata per i capezzoli anteriori sinistri, la quale supera di poco il 20%. Si può ipotizzare che una maggior percentuale di valutazioni negative per i capezzoli anteriori, rispetto ai posteriori, sia dovuta al fatto che solitamente i quarti anteriori secernono meno latte (40% anteriori, 60% posteriori) e che quindi, terminando prima la secrezione di latte, vengano sovra-munti con più frequenza. I gruppi di mungitura dell'azienda, infatti, sono provvisti di stacco automatico che, solitamente, va a ridurre la possibilità di generare ipercheratosi all'apice capezzolare (Wieland et al., 2020), ma il livello di flusso a cui è tarato lo stacco automatico si riferisce al flusso mammario e non al flusso del singolo quarto.

I punteggi assegnati a igiene e capezzoli sono stati analizzati distintamente per data di rilevazione, osservando così l'evoluzione complessiva delle condizioni igienico-sanitarie della stalla nei primi 3 mesi di rilevazione. Nel Grafico 8.23 si riportano le percentuali dei punteggi superiori o pari a 3 di Igiene e Teat apex score.

Grafico 8.23 Percentuali di valutazioni di HS e TAS ≥ 3 distinte per data



Importante è rilevare che lo stato igienico della mammella, area la cui pulizia influenza maggiormente l'insorgenza di infezioni mammarie (Schreiner e Ruegg, 2003), è complessivamente migliorato nel tempo. La percentuale di valutazioni maggiori o pari a 3 resta, in ogni caso, mediamente alta.

Lo stato di cheratinizzazione degli apici capezzolari, a risultare dal punteggio registrato nel tempo, è invece peggiorato. La tecnica di mungitura adottata in azienda sembrerebbe avere ancora un ampio margine di miglioramento.

8.4.1 Effetto dell'igiene degli animali e dello stato dei capezzoli sui parametri registrati

Per comprendere se le condizioni igieniche degli animali e lo stato di cheratinizzazione dei capezzoli possano aver influito sulle differenze rilevate tra gruppi, sono stati presi in considerazione i punteggi assegnati nell'Hygiene Score e nel Teat Apex Score, valutando in contemporanea i dati riguardanti la conta delle cellule somatiche e la contaminazione batterica del latte. In questo modo, si è ricercata la relazione esistente tra condizioni igienico sanitarie

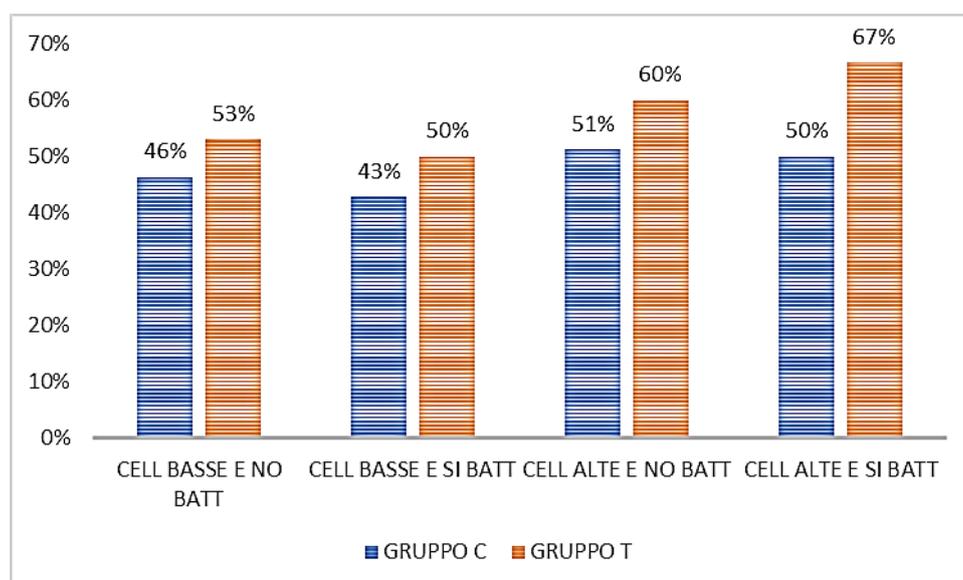
dell'animale (imbrattamento e sanità della mammella) con i principali indicatori di mastite (CCS $\geq 200\ 000$ cell/ml e batteriologico positivo).

Esistono diversi studi, come già anticipato, riguardanti la relazione esistente tra stato igienico-sanitario delle vacche e insorgenza di mastiti (Neijenhuis et al., 2001; Schreiner e Ruegg, 2003; Zucali et al., 2011; Guarin et al., 2017).

Si ricorda che, in questa analisi, non sono stati considerati tutti i campioni di latte raccolti durante la sperimentazione, ma soltanto quelli prelevati nelle uscite di gennaio (28/01), febbraio e marzo, durante le quali si sono effettuate, infatti, le valutazioni relative a HS e TAS.

Nella valutazione dei punteggi di igiene gli animali sono stati suddivisi in gruppi (T e C); in ogni gruppo sono state calcolate le percentuali di vacche che avevano ottenuto una valutazione superiore o pari a 3 in almeno un'area anatomica. Si riportano, nelle tabelle sottostanti, le percentuali ottenute in relazione alla conta delle cellule somatiche e alla positività del batteriologico.

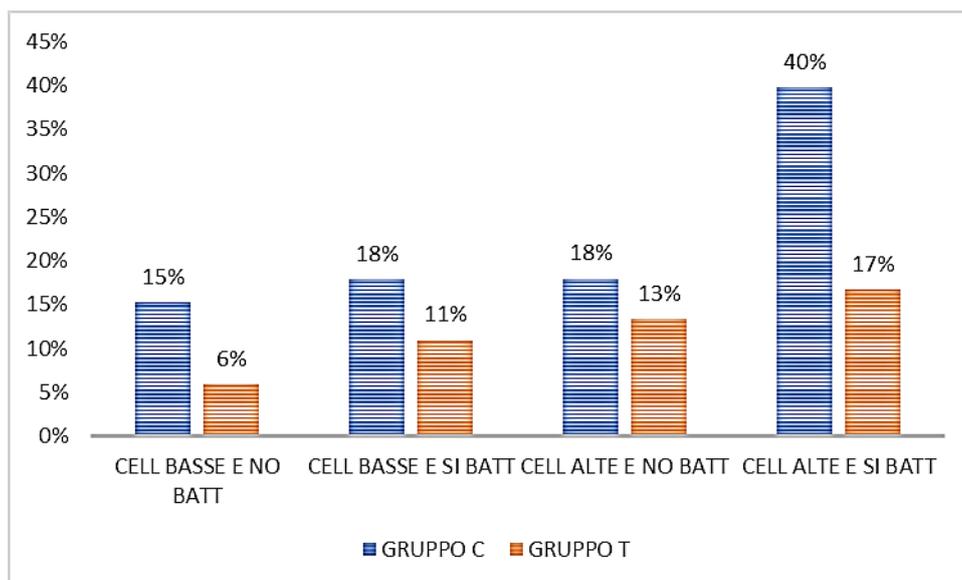
Grafico 8.24 Percentuale di valutazioni di HS ≥ 3 distinte per gruppo sperimentale e stato sanitario della mammella



Le percentuali di valutazioni con punteggi pari o superiori a 3 aumentano in animali con un conteggio di cellule somatiche alte e, all'interno di questa suddivisione, la percentuale aumenta in animali il cui l'esame batteriologico ha avuto esito positivo.

Lo stesso avviene nel grafico 8.25, in cui si riportano le percentuali di punteggi maggiori o pari a 3 nel Teat apex score: la percentuale di capezzoli danneggiati o gravemente danneggiati aumenta notevolmente se gli animali risultano avere una conta di cellule somatiche alta o un esito batteriologico positivo, ancora di più in animali in cui entrambi i fattori sono critici.

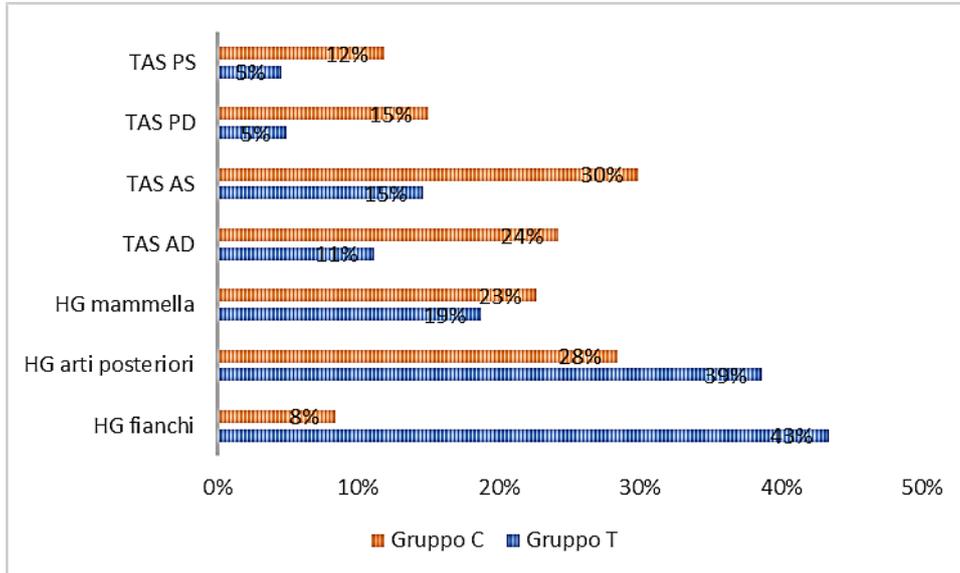
Grafico 8.25 Percentuale di valutazioni di TAS ≥ 3 distinte per gruppo sperimentale e per stato sanitario della mammella



8.4.2 Evoluzione di Hygiene score e Teat Apex score nei due gruppi sperimentali

Si riportano di seguito le percentuali di valutazioni maggiori o pari a 3 per Hygiene Score e Teat Apex Score, distinguendo gli animali tra gruppo trattato e gruppo di controllo (grafico 8.26).

Grafico 8.26 Percentuale di valutazioni di HG e TAS ≥ 3 per gruppo sperimentale



Tra i due, il gruppo di animali sottoposto a trattamento sembra risultare migliore per stato di salute dei capezzoli, rispetto al Controllo: le percentuali di punteggi di 3 e 4 risultano rientrare in valori non critici. Le migliori condizioni capezzolari degli animali del gruppo T potrebbero essere dovute ad una media di giorni di lattazione di molto inferiore rispetto a quella rilevata per gli animali del gruppo C (dati riportati nel paragrafo 8.2).

Per quanto riguarda i punteggi relativi allo stato di igiene, si hanno risultati discordanti: solo per l'area della mammella il gruppo di trattamento ha ottenuto una percentuale migliore. Per quanto riguarda le aree di arti posteriori e, soprattutto, di fianchi, le vacche del gruppo T risultano notevolmente più sporche.

Si potrebbe ipotizzare che una così marcata differenza nello stato di imbrattamento tra due gruppi di animali della stessa stalla sia dovuta al fatto che i due gruppi erano stabulati in due ambienti differenti dal punto di vista della pulizia; gli animali, in effetti, entravano in sala di mungitura in due

momenti distinti ed erano fisicamente separati. Questo aspetto, però, non è stato approfondito, pertanto l'ipotesi non può essere confermata.

In generale, comunque, per le percentuali di punteggi pari o superiori a 3 nella valutazione dell'igiene dell'animale si sono registrati peggioramenti, sia nel gruppo T (da gennaio a marzo, si passa da un 42% a un 50%), sia nel gruppo C (si registra un 54% nel mese di gennaio e un 61% nel mese di marzo). Visti gli effetti che le condizioni di igiene possono avere su conta cellulare e batterica, risulta positivo il fatto che non si siano registrati particolari peggioramenti nelle analisi cito-batterologiche del gruppo T.

Per analizzare in modo più preciso l'andamento delle condizioni dei capezzoli nei due gruppi e nel tempo, si è osservato il peggioramento o meno delle valutazioni di TAS nei due gruppi, in modo da comprendere meglio se l'utilizzo del prodotto sperimentale possa favorire o meno la cheratinizzazione del capezzolo.

In effetti, osservando l'evoluzione dei punteggi percentuali di valutazioni di teat apex pari o superiori a 3 del periodo tra gennaio e marzo, si possono notare delle differenze tra i due gruppi: nel gruppo trattato gli animali hanno ottenuto, dopo tre mesi, valutazioni mediamente migliori: si passa da un 21% nel mese di gennaio a un 14% nel mese di marzo per i capezzoli anteriori sinistri (mentre nel gruppo C la percentuale da un 29% sale a un 36%); per i posteriori destri si passa da un 8% a un 3% e per i sinistri da un 8% a un 5% (mentre per il gruppo C, rispettivamente, la percentuale sale da 13% a 27% e da 11% a 16%). Per gli anteriori destri si osserva un peggioramento in entrambi i gruppi, comunque più evidente nel gruppo C, in cui si passa, infatti, da un 21% nel mese di gennaio a un 27% nel mese di marzo, mentre nel gruppo T si passa da un 10% a un 14%.

Per confermare questa ipotesi, però, andrebbero eseguite altre sperimentazioni simili e per periodi di tempo più lunghi; l'evoluzione delle condizioni capezzolari non è, infatti, immediata e potrebbe trattarsi, in questo caso, di un risultato legato alla casualità.

CAPITOLO NONO

CONCLUSIONI

Dai risultati ottenuti, si può concludere che le differenze riscontrate tra le medie dei gruppi (trattato e controllo), per quanto riguarda le analisi batteriologiche e la conta delle cellule somatiche, possano dipendere da fattori esterni agenti sui due gruppi.

Avendo escluso alcuni di questi fattori, quali, per esempio, la composizione dei gruppi (in termini di percentuale di vacche al primo parto) o lo stato di imbrattamento degli animali (Hygiene score), resta comunque ipotizzabile il fatto che, effettivamente, l'applicazione del prodotto sperimentale abbia comportato differenze significative sulla frequenza batterica e sulla conta delle cellule somatiche, fattori correlati all'insorgenza di infiammazioni mammarie.

Per quanto riguarda, nello specifico, la frequenza batterica nel latte, si rileva, da parte del prodotto a base di batteriocine, un'influenza positiva o comunque paragonabile al prodotto applicato alle vacche del gruppo di controllo.

Per quanto riguarda il livello medio delle cellule somatiche, si può dire che, nel gruppo delle vacche sottoposte a trattamento sperimentale, tale livello si sia mantenuto relativamente costante; e che le variazioni riguardanti questo dato, nel gruppo trattato, siano inferiori rispetto al gruppo di controllo.

L'utilizzo del prodotto sperimentale non sembra aver influito negativamente sulle cellule somatiche dei campioni di latte.

Nonostante i buoni risultati ottenuti dalla sperimentazione, si ritengono necessarie ulteriori prove e analisi riguardanti l'applicazione di questo prodotto sperimentale. Interessante sarebbe, inoltre, analizzare i risultati di una sperimentazione simile con la possibilità di escludere ulteriori fattori influenti

solitamente la conta delle cellule somatiche e la frequenza batterica, non indagati in questo studio.

BIBLIOGRAFIA

Alvarez-Sieiro P., Montalban-Lopez M., Mu D., Kuipers O.P. (2016), Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 100, no. 7: 2939-2951

Antimicrobial Resistance (AMR) (2019) - Tackling the Burden in the European Union, p.12. OECD

Arrigoni N. (2010), Aggiornamento sulle principali cause di mastite infettiva, Corso di aggiornamento "Parametri igienico-sanitari del latte bovino: problematiche connesse con il controllo e l'autocontrollo in azienda", IZS

Barbaranelli C. (2007), L'analisi della varianza, in: *Analisi dei dati*, Ed. Universitarie di Lettere Economia Diritto, Milano, p. 206, ISBN: 9788879163385

Bava L., Daprà V., Piccinini R., Sandrucci A., Tamburini A., Tonni M., Zanini L., Zecconi A., Zucali M. (2008), Le corrette procedure ed i punti critici di controllo della mungitura di bovine da latte ad alta produzione. *Quaderni della ricerca*, n. 82

Beecher C., Daly M., Berry D.P., Klostermann K., Flynn J., Meaney W., Hill C., McCarthy T.V., Ross R.P., Giblin L. (2009), Administration of a live culture of *Lactococcus lactis* DPC 3147 into the bovine mammary gland stimulates the local host immune response, particularly *IL-1β* and *IL-8* gene expression. *J. Dairy Research*, vol. 76: 340-348

Booman H.G. (1995), Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annual Reviews Immunol.*, Vol. 13: 61-92

Bouchard D.S., Rault L., Berkova N., Le Loir Y., Even S. (2013), Inhibition of *Staphylococcus aureus* invasion into bovine mammary epithelial cells by contact with live *Lactobacillus casei*. *Appl Environ Microbiol* 79(3):877-885

Brand A., Noordhuizen J.P.T.M., Schukken Y. H. (1996), Herd health and production management. *J. Agricultural Science*, Vol. 129: 367-369

Brasca M., Rebolini M., Bava L., Zucali M., Albano C., Beretta D., Piccinini R. (2018), Risultati preliminari dell'applicazione di un prodotto post-dippin a base di batteriocine da *Lac. Lactis subsp. cremoris*. LXXII congresso SISVet, Torino 20 - 22 giugno 2018

Bruno M.E.C., Montville T.J. (1993), Common Mechanistic Action of Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 59, no. 9, p. 3003-3010

Call D.R., Davis M.A., Sawant A.A. (2008), Antimicrobial resistance in beef and dairy cattle production. *Animal Health Research Reviews*, Vol. 9: 159-167

Cassini A., Högberg L.D., Plachouras D., Quattrocchi A., Hoxha A., Simonsen G.S., Colomb-Cotinat M., Kretzschmar M.E., Devleeschauwer B., Cecchini M., Ouakrim D.A., Oliveira T.C., Struelens M.J., Suetens C., Monnet D.M., Burden of AMR Collaborative Group (2019), Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. *Lancet Infect Dis*, 19(1): 56-66

Comunicazione della commissione al consiglio e al parlamento europeo, Piano d'azione europeo "One Health" contro la resistenza antimicrobica, Bruxelles, 29.6.2017 COM (2017) 339 final

Comunicazione della commissione al Parlamento europeo e al Consiglio, Piano d'azione di lotta ai crescenti rischi di resistenza antimicrobica (AMR). Bruxelles, 15.11.2011, COM (2011) 748 definitivo

Comunicazione della commissione, Linee guida sull'uso prudente degli antimicrobici in medicina umana (2017). Gazzetta ufficiale dell'Unione europea C 212

Crispie F., Alonso-Gomez M., O'Loughlin C., Klostermann K., Flynn J., Arkins S., Meaney W., Ross R.P., Hill C. (2008), Intramammary infusion of a live culture for treatment of bovine mastitis: effect of live lactococci on the mammary immune response. *Journal of Dairy Research*, Vol. 75: 374-384

Daprà V., Piccinini R., Zecconi A. (2006), Le mastiti costano molto all'allevatore. *Informatore Agrario*, vol. 2, p. 59-62

Dati di vendita dei medicinali veterinari contenenti agenti antimicrobici, Trend in Italia, anno 2016. Ministero della salute, direzione generale della sanità animale e dei farmaci veterinari

Davies R., Wales A. (2019), Antimicrobial resistance on farms: a review including biosecurity and the potential role of disinfectants in resistance selection. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, Vol. 18

De Jong A., El Garch F., Simjee S., Moyaert H., Rose M., Youala M., Siegwart E. (2018), Monitoring of antimicrobial susceptibility of udder pathogens recovered from cases of clinical mastitis in dairy cows across Europe: VetPath results. *Veterinary Microbiology*, Vol. 213: 73-81

Decisione di esecuzione della commissione del 12 novembre 2013 relativa al monitoraggio e alle relazioni riguardanti la resistenza agli antimicrobici dei batteri zoonotici e commensali (2013/652/UE). Gazzetta ufficiale dell'Unione europea L 303

Decreto Legislativo n.193/2006, Attuazione della direttiva 2004/28/CE recante codice comunitario dei medicinali veterinari

Fantini A. (2012), Importante l'analisi della curva di lattazione. *Informatore Agrario*, vol.39: 34-36

Fantini A. (2020), Le prestazioni prevedibili della Frisona italiana. *Ruminantia*, 3 gennaio 2020

Giudice A., Chiavassa E., Mannelli A. (2002), Analisi epidemiologiche dei conteggi delle cellule somatiche nel latte nell'ambito dell'assistenza veterinaria all'allevamento bovino. *Large Animal Review*, anno 8, no. 5, p.35-40

Gomes F., Henriques M. (2016), Control of bovine mastitis: Old and recent therapeutic approaches. *Current Microbiology*, 72(4): 377-382

Guarín J.F., Baumberger C., Ruegg P.L. (2017), Anatomical characteristics of teats and pre-milking bacterial counts of teat skin swabs of primiparous cows exposed to different types of bedding. *Journal of Dairy Science*, Vol. 100: 1436-1444

Jashari R., Piepers S., De Vliegher S. (2016), Evaluation of the composite milk somatic cell count as a predictor of intramammary infection in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, Vol. 99: 9271-9286

Klostermann K., Crispie F., Flynn J., Ross R.P., Hill C., Meaney W. (2008), Intramammary infusion of a live culture of *Lactococcus lactis* for treatment of bovine mastitis: comparison with antibiotic treatment in field trials. *Journal of Dairy Research*, Vol. 75(3): 365-373

Krömker V., S. (2017), Mastitis treatment—Reduction in antibiotic usage in dairy cows, DOI: 10.1111/rda.13032

Kuipers A., Koops W.J., Wemmenhove H. (2016), Antibiotic use in dairy herds in the Netherlands from 2005 to 2012. *Journal of Dairy Science*, Vol. 99 (2): 1632-1648

Kutila T., Pyörälä S., Kaartinen L., Isomäki R., Vahtola K., Myllykoski L., Saloniemi H. (2003), Lactoferrin and citrate concentrations at drying-off and during early mammary involution of dairy cows. *J. Vet. Med. A* 50: 350-353

Lanza G., Faccini F., Valdonio M., Arrigoni N., Pattarini P., Grilli B., Cabrini E., Boccellino M., Delledonne M. (2015), Consumo e modalità d'impiego degli antibatterici nell'allevamento di bovine da latte della provincia di Piacenza. *Large Animal Review*, Vol. 21: 51-60

Linee guida per l'uso prudente degli antimicrobici negli allevamenti zootecnici per la prevenzione dell'antimicrobico-resistenza e proposte alternative, Sezione per la Farmacosorveglianza sui Medicinali Veterinari, Ministero della Salute, Direzione generale della sanità animale e dei farmaci veterinari

Macrì S. (2017), "Incremento delle produzioni zootecniche e patologia degli animali da reddito", Manuale "Biosicurezza e uso corretto e razionale degli antibiotici in zootecnia", dottorato di ricerca, Università degli studi di Perugia, Italia

Manuale di buone pratiche di mungitura (2020), realizzato nell'ambito del progetto META - Mungitura: Efficienza, sostenibilità e qualità, con Piano di Sviluppo Rurale della Regione Lombardia 2014-2020

Mein G.A., Neijenhuis F., Morgan W.F., Reinemann D.J., Hillerton J.E., Baines J.R., Ohnstand I., Rasmussen M.D., Timms L., Britt J.S., Farnsworth R., Cook N., Hemling T. (2001), Evaluation of bovine teat condition in commercial dairy herds: 1. Non-infectious factors. Proceedings of the 2nd International Symposium on Mastitis and Milk Quality, p 347-351

Moretti S., Cruciani G., Romanelli S., Rossi R., Saluti G., Galarini R. (2016), Multiclass method for the determination of 62 antibiotics in milk. Journal of Mass Spectrometry, 51(9): 792-804

Murphy S.C., Boor K.J. (2000), Source and causes of high bacteria counts in raw milk: an abbreviated review. Dairy Food Environ Sanit, 20(8): 1-4

Neijenhuis F., Barkema H.W., Hogeveen H., Noordhuizen J.P.T.M. (2001), Relationship between teat-end callosity and occurrence of clinical mastitis. J. Dairy Sci., 84:2664-2672

Nuovi concetti di gestione per il miglioramento della qualità del latte (2013), Misura 124 - Cooperazione per lo sviluppo di nuovi prodotti, processi e tecnologie nei settori agricolo e alimentare, e in quello forestale

Piano Nazionale di Contrasto dell'Antimicrobico-Resistenza (PNCAR) 2017-2020 (2017)

Randall L.P., Cooles S.W., Coldham N.G., Penuela E.G., Mott A.C., Woodward M.J., Piddock L.J.V., Webber M.A. (2007), Commonly used farm disinfectants can select for mutant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium with decreased susceptibility to biocides and antibiotics without compromising virulence. J. antimicrobial Chemotherapy, 60:1273-1280

Ray B. (1996), Fundamental Food Microbiology, CRC-Press

REGOLAMENTO (CE) n. 1831/2003 del Parlamento europeo e del Consiglio. Gazzetta ufficiale dell'Unione europea, L 268/29

REGOLAMENTO (CE) n. 853/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio. Gazzetta ufficiale dell'Unione europea, L 139

REGOLAMENTO (CE) n. 1662/2006 del Parlamento europeo e del Consiglio. Gazzetta ufficiale dell'Unione europea, L 320

REGOLAMENTO (UE) n. 6/2019 del Parlamento europeo e del Consiglio. Gazzetta ufficiale dell'Unione europea, L 4

Reinemann D.J., Wolters G.M.V.H., Rasmussen M.D. (2000), Review of practices for cleaning and sanitation of milking machines. Pacific Dairy Congress, Nagano Japan, 14 Novembre 2000

Sandrucci A., Bava L., Brasca M., Laurenti M., Lodi R., Piccinini R., Roveda P., Sanna M., Tamburini A., Vanoni L., Zanini L., Zecconi A., Zucali M. (2010), Igiene e sicurezza del latte bovino alla stalla: sistema integrato di diagnosi. Quaderni della Ricerca, n° 119

Scheda tecnica “Il lavaggio e la sanificazione dell'impianto di mungitura”

Schirru S. (2008), Batteriocine da enterococchi isolati da latte di capra, Tesi di laurea, Università degli studi di Sassari, Italia

Schreiner D.A., Ruegg P.L. (2003), Relationship between udder and leg hygiene scores and subclinical mastitis. Journal of Dairy Science, Vol. 86: 3460-3465

Sears P.M., Smith W.K., Stewart R.N., Gonzalez S.D., Rubino S.A., Gusik E.S., Kulisek S.J., Projan P., Blackburn P. (1992), Evaluation of a nisin-based

germicidal formulation on teat skin of live cows. J. Dairy Sci., vol. 75: 3185-3190

Serna-Cock L., Enríquez-Valencia C.E., Jiménez-Obando E.M., Campos-Gaona R. (2012), Effects of fermentation substrates and conservation methods on the viability and antimicrobial activity of *Weissella confusa* and its metabolites. Electronic J. Biotechnology, Vol. 5, no. 3

Sharma N., Singh N.K., Bhadwal M.S. (2011), Relationship of somatic cell count and mastitis: an overview. Asian-Aust. Journal of Animal Science, Vol.24, no.3: 429-438

Special Eurobarometer 445 Report, (2016), Antimicrobial Resistance

Surveillance of antimicrobial resistance in Europe (2018). Annual report of the European Antimicrobial, Resistance Surveillance Network (EARS-Net)

Tondo A. (2019), Cellule somatiche individuali, un importante aiuto per gli allevatori. Ruminantia, 3-2019

Wieland M., Nydam D.V., Heuwieser W., Morrill K.M., Ferlito L., Watters R.D., Wirkler P.D. (2020), A randomized trial to study the effect of automatic cluster remover settings on milking performance, teat condition, and udder health. Journal of Dairy Science, Vol. 103: 3668-3682

Zecconi A., Sesana G., Vairani D., Cipolla M., Rizzi N., Zanini L. (2019), Somatic cell count as a decision tool for selective dry cow therapy in Italy. Italian Journal of Animal Science, 18:1, 435-440

Zucali M., Bava L., Tamburini A., Brasca M., Vanoni L., Sandrucci A. (2011), Effects of season, milking routine and cow cleanliness on bacterial and somatic cell counts of bulk tank milk. Journal of Dairy Science, Vol. 78: 436-441

Zuccolin E., Del Fabbro A. (2016), Mungitura, i vantaggi di una attenta routine. Informatore Zootecnico n. 14/2016

SITOGRAFIA

OECD.org, <http://www.oecd.org/health/stemming-the-superbug-tide-9789264307599-en.htm>, visitato in aprile 2020

Quality Milk.it, <https://www.qualitymilk.it/categoria-prodotto/pre-e-post-mungitura/post-mungitura/>, visitato in luglio 2020

Sito Associazione Nazionale Allevatori della Razza Frisona e Jersey Italiana (ANAFI). <http://www.anafi.it/>, visitato in giugno 2020

Sito European Medicines Agency, European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption (ESVAC). <https://www.ema.europa.eu/en/veterinary-regulatory/overview/antimicrobial-resistance/european-surveillance-veterinary-antimicrobial-consumption-esvac>, visitato in aprile 2020

Sito Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna.
https://www.izsler.it/pls/izs_bs/v3_s2ew_consultazione.mostra_pagina?id_pagina=524, visitato in giugno 2020