



IL LATTE IN TESTACODA :a cominciare dal prelievo

FNOVI – MEETING
Martedì 10/10/2023

Dr. G. Bolzoni
Ex Centro Referenza Nazionale Qualità Latte Bovino (IZSLER)

INTRODUZIONE



PERCHE' IL PRELIEVO DEL LATTE ?

La modalità di prelievo è il più potente tra i fattori condizionanti l'accuratezza dell'esito analitico (rappresentatività del campione)

Il latte non è una semplice soluzione, è una massa con disomogeneità di tipo ed intensità variabili

Il latte (anche quello che finisce nel campione) è una matrice biologica viva variabile nel tempo ed in funzione della temperatura

Il prelievo non rientra nei normali piani di studi ; i non addetti ai lavori non sanno....

INTRODUZIONE

Non è un caso quindi che :



- Già nel primo Accordo interprofessionale per il pagamento del latte in Base alla qualità (1987) si definissero le modalità di prelievo del latte di massa, le caratteristiche dei prelevatori automatici, la necessità di corsi di formazione per gli addetti
- Che nel corso della mia lunga carriera io abbia fatto alcune decine di «Corsi di Abilitazione» al prelievo destinato ai menalatte e addetti dei caseifici
- Che i Regolamenti Comunitari del pacchetto Igiene e seguenti prevedano che il prelievo sia eseguito da «personale addetto appositamente abilitato»
- Che (in Regione Lombardia) i Corsi siano poi stati trasformati in Corsi di Abilitazione alla Formazione degli addetti al prelievo individuando dei responsabili per ciascun primo acquirente latte

Un Veterinario che si occupa di mastiti deve saper mungere!

Un Veterinario (vigile sanitario) che opera nel settore lattiero caseario deve saper prelevare il latte di massa e verificare l'operato dei prelevatori



INFLUENZA SULL' ACCURATEZZA DELL'ANALISI



MASSA



INDIVIDUALE/QUARTO



Regola Aurea :
se utilizzato in modo corretto maggiore è la
massa migliore è la performance del
prelevatore automatico

PRELIEVO INDIVIDUALE



Per finalità produttive (Proteine, **Grasso**, Caseine) o sanitarie (Cellule Somatiche) è **INDISPENSABILE** il prelievo dall'intera mungitura (Vaso Misuratore o , meglio , Lattometro)

Per controlli metabolici , chimici, (Aflatossine, Ormoni, Minerali, Urea, Inibenti) può essere sufficiente il prelievo con mungitura a mano di una porzione di latte.

La proporzione quantitativa tra i quarti può essere rilevante o meno a seconda del parametro ricercato e della condizione produttiva della mammella (es. mastite cronica) .

G. Bolzoni - 2023

5

PRELIEVO INDIVIDUALE



Se possibile.....

Eeguire il prelievo **PRIMA** di eseguire trattamenti antibiotici

MASTITI CONTAGIOSE

(*Str. agalactiae*, *S. aureus*, *Prototheca*, *Mycoplasma*, casi «particolari» di diffusione di Streptococchi o Staphylococchi (capra e pecora) con comportamento contagioso)

I controlli sono in genere estesi ad elevato numero di animali nella mandria e ripetuti più volte nel tempo **QUINDI** : nel rispetto di basilari norme igieniche è consuetudine (conveniente) il prelievo da mungitura manuale con campioni assemblati dei quattro quarti

Vietato prelevare dal Vaso Misuratore

Rapporto tra precisione dell'analisi e prelievo di singolo quarto o singola mammella . **TEORIA E PRATICA e casi particolari**

G. Bolzoni - 2023

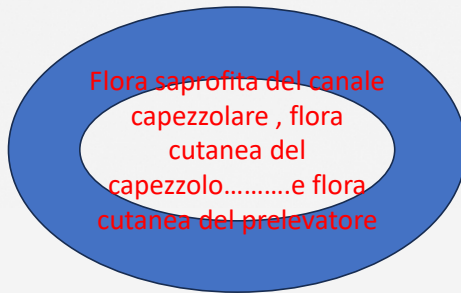
6



MASTITI AMBIENTALI LA DIAGNOSI EZIOLOGICA P.D.

Se possibile..... Eseguire
il prelievo PRIMA di
eseguire trattamenti
antibiotici

- 1- La scelta del capo / quarto
- 2- Il momento del prelievo
- 3- La Modalità di prelievo
- 4 L'Igiene del prelievo



Il significato di un isolamento
batterico ed il significato di un
mancato isolamento

Effetto laboratorio sulla
efficacia della diagnosi

G. Bolzoni - 2023

7



Esame Batteriologico vs PCR



Dal punto di vista delle modalità di prelievo.....cambia poco .
Forse la PCR richiede soltanto..... *un po' meno di attenzione all'igiene*

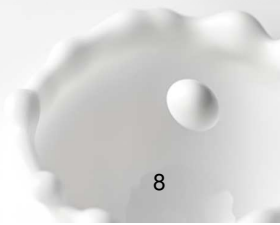
Dal punto di vista del significato dell'esito invece cambia tutto!!!

Non volendo uscire dal seminato mi limito a dire che :
La PCR è uno strumento efficace, innovativo e migliorativo per le
diagnosi delle forme contagiose..... è uno strumento **pericoloso**
invece per le forme di mastite ambientale

70% di esiti
Negativi / Flora
mista è PEGGIO
del 90 % di
positivi ?????

G. Bolzoni - 2023

8



MASTITI AMBIENTALI LA DIAGNOSI EZIOLOGICA P.D.



- *Ecco perché la diagnosi eziologica di mastite ha di fatto (ma entro un certo limite) un significato ed una utilità più come informazione complessiva dello condizione sanitaria di una mandria che sullo stato di malattia di un singolo capo.*
- *Ed ecco perché tale diagnosi ha di fatto (ma entro certi limiti) utilità per la terapia delle future mastiti nella stessa mandria più che di quella in atto*
- **P.S. : refrigerazione dei campioni per diagnosi eziologica di mastite , a differenza dei campionamenti di latte di massa non è un prerequisito essenziale .**
- **SE IL CAMPIONE E' FATTO BENE ED IL TEMPO PRELIEVO-ANALISI E' CONTENUTO LA CONSERVAZIONE A TEMPERATURA AMBIENTE POTREBBE ANCHE AUMENTARE LE PROBABILITA' DI ISOLAMENTO**
- **Nel dubbio comunquein frigorifero !!!!**
- **PP.SS : il congelamento dei campioni non è vietato Di fatto riduce le probabilità di isolamento (tranne nel caso di S. aureus) ma evita nelle conservazioni prolungate la moltiplicazione abnorme di flora batterica di contaminazione e la coagulazione del campione**

G. Bolzoni - 2023

9

PRELIEVO DI MASSA aziendale / cisterna /tank di caseificio



Rilevante DIRETTAMENTE per la rappresentatività dei controlli ufficiali igienico-sanitari sul latte

Rilevante INDIRETTAMENTE per la affidabilità dei piani di autocontrollo ed in particolare per quello realizzato attraverso programmi definiti (es pagamento latte Qualità) che assumono valenza normativa nel momento in cui i risultati sono utilizzati per il controllo ufficiale (sorveglianza, prevenzione, emergenze, idoneità etc. etc)

Da ciò il progressivo cambiamento del ruolo di chi esegue i prelievi , delle finalità e delle «regole» del prelievo .
Da ciò anche l'aggiornamento dei documenti di riferimento (esempio in regione Lombardia) del cosiddetto «corso di abilitazione»



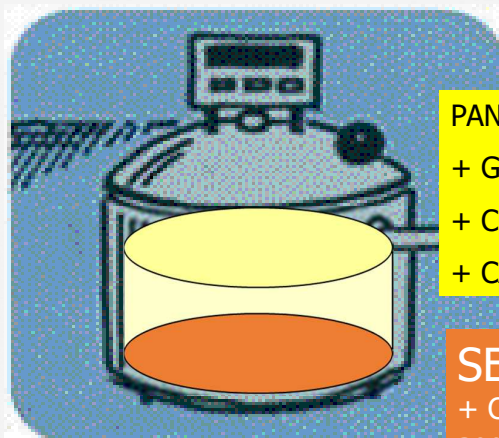
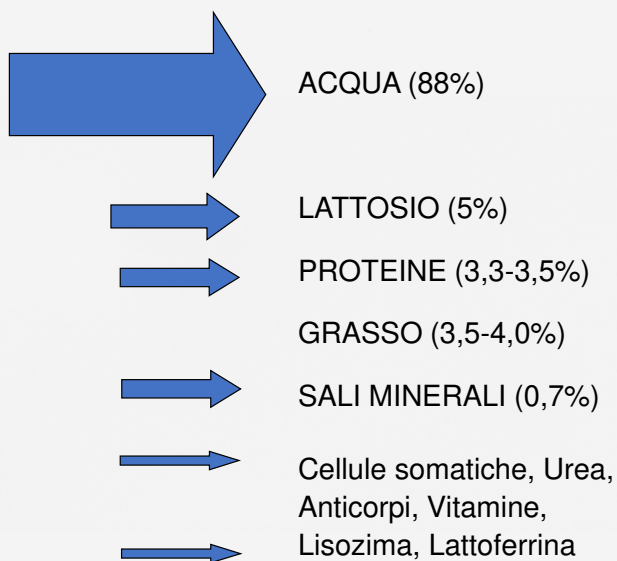
Opuscolo scaricabile in : <http://www.izsler.it>

Sezione : Centri di Referenza di Referenza/CNRQLB

G. Bolzoni - 2023

10

PRELIEVO DI MASSA - 1 - MISCELAZIONE aziendale / cisterna / tank di caseificio



PANNA AFFIORAMENTO
+ GRASSO
+ CELLULE SOMATICHE
+ CARICA BATTERICA

SEDIMENTO
+ CELLULE +
aggregate proteici

G. Bolzoni - 2023

PRELIEVO DI MASSA - 2 – IGIENE STRUMENTAZIONE aziendale / cisterna / tank di caseificio



Per cominciare :

Mani pulite

Tappo non appoggiato a terra

Contenitore sterile/chiuso

Dopo ogni prelievo:

- lavare con acqua corrente fredda
- protetta dalla sporcizia e dalla polvere

A fine giro:

- lavare con detersivo per mungitrice e scovolino internamente ed esternamente



G. Bolzoni - 2023



Prodotto vivo – I batteri del latte



~~Alta Temperature~~
Refrigerazione Conservante
~~(componenti del latte)~~



Acidificazione, impoverimento costituenti

- Igiene contenitore
- Utilizzo conservante
- Temperatura di conservazione
- Intervallo prelievo -analisi

G. Bolzoni - 2023

13



PRELIEVO DI MASSA - 4 – INIDONEITA' / ANOMALIE aziendale / cisterna /tank di caseificio



Coagulazione e precipitazione proteine
(pessima igiene, acidificazione)

Congelamento
(temperatura troppo bassa , rapporto capacità/contenuto)

Burrificazione
(miscelazione eccessiva, contenuto limitato)

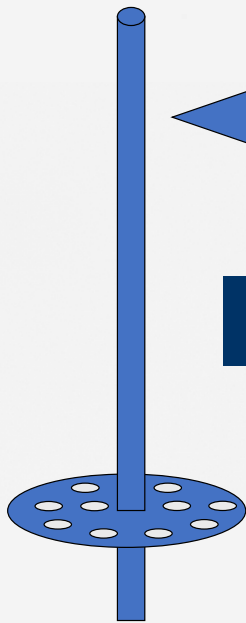


LE DIMENSIONI CONTANO
Lattoprelevatore automatico in linea oppure.....
Rubinetto !

G. Bolzoni - 2023



PRELIEVO DI MASSA - 5 – MANUALITA' aziendale / cisterna /tank di caseificio



Asta cava di acciaio inox
Lunghezza circa 80-100 cm
Diametro interno 5-10 mm
Disco diametro 13-15 cm, con 6-10 fori

DA EVITARE invece attrezzature che eseguano il prelievo solo dalla superficie (mestoli, cucchiai, bicchieri, etc.)



G. Bolzoni - 2023

15

cf0336 www.fotosearch.com



PRELIEVO DI MASSA - 5 – MANUALITA' aziendale / cisterna /tank di caseificio



Accurata miscelazione (bidoni, tank) con la pala miscelatrice
o.....con l'asta (il tempo è il nemico del prelevatore)



Estrarre l'asta dal latte
Immergerla lentamente con foro superiore libero



Otturare il foro con il pollice



Estrarre l'asta e trasferire il latte nel bocchetto

G. Bolzoni - 2023

16





PRECAMPIONI PROPORZIONALI



Miscelazione



500 LITRI



1000 LITRI

G. Bolzoni - 2023



1 PARTE

17



2 PARTI



Diversi modelli in commercio

Caratteristiche minime di funzionalità:

- accordo pagamento latte qualità
- Norma ISO 19743/1999

Per evitare *trascinamento*

- A inizio ciclo: funzione ritardo (disabilitare per piccole quantità)
- A fine ciclo: spurgo, drenaggio e asciugatura del tubo silicone



PRELIEVO DI MASSA - 6 – LATTOPRELEVATORE AUTOMATICO aziendale / cisterna / tank di caseificio



PARAMETRI FISSI PRE-IMPOSTATI:

- Portata della pompa (litri/minuto)
- Volume campione (100-150 ml)



DA IMPOSTARE AD OGNI PRELIEVO:

- Volume latte da prelevare (latte fermo)

Se il campione risulta troppo pieno
o troppo vuoto modificare la
portata della pompa



- impostare il timer del miscelatore in modo che l'agitazione termini appena prima del ritiro (evitare schiuma)
- in assenza di temporizzatore, attivare manualmente la pala per 5-10' prima di effettuare il prelievo, aiutando il distacco del grasso dalle pareti con l'agitatore manuale

G. Bolzoni - 2023 19



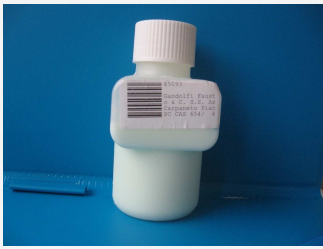
PRELIEVO DI MASSA - 6 – LATTOPRELEVATORE AUTOMATICO aziendale / cisterna / tank di caseificio



- Collegare il tubo di raccolta alla bocchetta normalizzata del tank (non immergerlo dall'alto)
- Controllare il funzionamento del lattoprelevatore durante il carico
- Fare attenzioni alle strozzature (prelievo anomalo)
- Interrompere il vuoto non appena termina lo svuotamento del tank



PRELIEVO DI MASSA - 7 – IL CAMPIONE FINO AL LABORATORIO aziendale / cisterna /tank di caseificio



sistemi chiari e durevoli di identificazione dei campioni in particolare nei campionamenti multipli (l'interpretazione di lettere o numeri non è un compito o una responsabilità del laboratorista



La refrigerazione (2-6 °C x 24-48 h) è un prerequisito essenziale ; anche se influisce in modo diverso a seconda dei parametri analitici ricercati (es. cellule somatiche)

Evitare il contatto diretto con le piastre refrigeranti (congelamento campioni alterazione dei parametri)

...il frigorifero portatile termostato con campione sentinelle E' MEGLIO della borsa termica con siberini congelati ...*ca va sans dire*.....



La quantità di latte



- Per alcune analisi è necessaria una quantità minima al di sotto della quale non si possono eseguire; in particolare ciò è vero per le richieste di analisi multiple su uno stesso campione anche se, in generale, si utilizzano microporzioni del campione
- Per le analisi di composizione è indispensabile consentire la «omogenizzazione» del campione e va quindi rispettato il rapporto contenitore/contenuto
- E' difficile considerare rappresentativo un campione di 0,5 ml di latte sia esso di singolo animale che di massa....anche se teoricamente è possibile



Conservante



1 – attraverso l'azione batteriostatico/battericida permettono di ridurre le modificazioni chimico-fisiche del latte campionato prolungando il tempo disponibile tra prelievo ed analisi

2- esistono diverse sostanze idonee all'uso con effetti conservanti e sulla fattibilità delle analisi ovviamente variabile (etidio bromuro, acido citrico, bromopol, azidiol, sodio azoturo, bicromato di potassio)

3- L'utilizzo di una sostanza conservante nel campione quindi va sempre «concordata» con il laboratorio prima del campionamento, in funzione delle analisi che si richiederanno e dei tempi di consegna dei campioni

4- uno stesso conservante può risultare idoneo o non idoneo alla stessa analisi eseguita con tecnica / metodo di prova diverso

5- La presenza di conservante NON ESCLUDE la necessità di refrigerazione del campione

6- L'utilizzo dei conservanti per le analisi di diagnosi della mastite è un controsenso....

A TITOLO DI ESEMPIO SI RIPORTANO ALCUNE INDICAZIONI RELATIVE AL «SOLO» LABORATORIO IZSLER NELL'UTILIZZO DI SODIA AZIDE ALLA CONCENTRAZIONE DI

G. Bolzoni - 2023

ANALISI /MP	TEMPI TEMP	CONSERV	CONG.	QUANT. MINIMO	Note
CELLULE SOM. FTIR	3 gg fino a 5 gg conserv	SI	NO	50 ml	Sul congelato sottostima imprevedibile
CARICA BATTERICA Optofluor.	24-36 h ; 3 (5) gg conserv	SI	NO	50 ml	Solo per latte crudo
GPL, CAS, UREA, RSM , Ac Gras, Cloruri FTIR	48 h fino a 5 gg. Conserv	SI	NO	120 ml	Urea solo latte bovino carpino
INIBENTI	24 h; 36 cons; mese Cong	SI**	SI	5 ml	Conservante (solo S.A. non Bronopol) in concentrazione predefinita e costante concordata; NO x Asino e Pecora falsi positivi
Punto Congelamento FTIR	24-48 h ; 5 gg Cong	SI**	SI	120 ml	Solo Latte bovino caprino
Punto Congelamento termistore	24-48 h ; 5 gg Cong	NO	SI	50 ml	Metodo di Riferimento
SPORIGENI ANAEROBI MPN	24-36 h	NO	NO	120 ml	Conservante tollerato per analisi routine sottostima
FOSFATASI LATTE	24-48 h ; Scadenza Past Uht	SI	NO*	50 ml	Specificare Specie Animale e se Crudo /Trattato No Yogurt
FOSFATASI FORMAGGIO	Fino a scadenza	\\	SI	250 gr	Forma intera se piccolo ; Prelievo Formaggio grana predefinito ; No Mozzarella No Erborinati
ACIDITA' °SH	24-36 h	NO	SI***	50 ml	
AF M1 ELISA	24-48 h	SI	SI	50 ml/G	
LDG Attitudine	24 -36 h	NO	NO	120 ml	Solo latte Bovino
PEROSSIDASI	24-36 H ; Scadenza	NO	SI	50 ml	Specificare il trattamento termico presunto
LIPIDI Gerber	48 h	NO	NO	120 ml/g	Panna indicare titolo presunto; siero specificare tipologia
Urea ph-metria	48 h	SI	SI	50 ml	Necessario per pecora e bufala
PESO SPECIFICO	48 h	SI	SI	120 ml	Solo Latte e siero

G. Bolzoni - 2023

SODIO AZIDE PASTIGLIA E SWABS

- Tossico (evitare il contatto); consente l'analisi fino a 36-48 ore in realtà fino a 72 h sperimentalmente
- Non conservare a T superiori a quelle prescritte (0-6 °C)
- Interferisce con alcune analisi ;
- Crioscopia Termistore/ Ftir; Inibenti ; Sporigeni

E' NECESSARIO agitare lentamente il contenitore per capovolgimento subito dopo il prelievo per consentire la diffusione del conservante



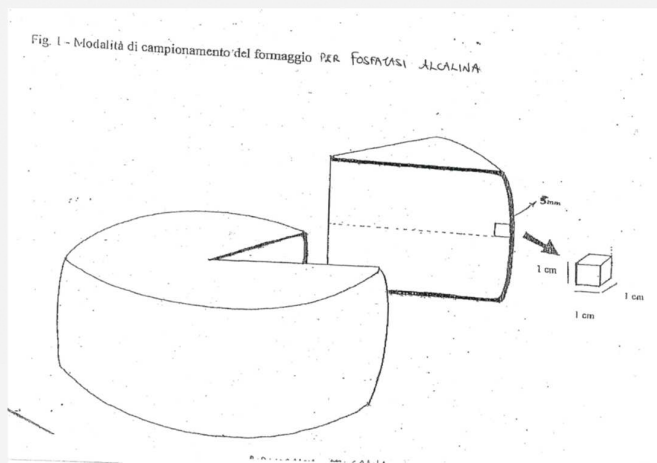
Prelievi speciali

1 -Fosfatasi Alcalina nel latte post-trattamento e nei formaggi

1- Nel campione post-pasteurizzazione evitare assolutamente contaminazioni batteriche esterne (attivazione fosfatasi) utile un confronto tra latte crudo pretrattamento e latte trattato post

1B – Per evitare contaminazioni esterne ANCHE nei prelievi sul formaggio preferire (quando commercialmente sostenibile) la forma intera . Nel caso di porzionatura evitare la contaminazione esterna (compresa per quanto possibile quella della crosta)

2- Lo strano caso del formaggio Grana



2 – Il controllo in questo caso è finalizzato a verificare che **NON CI SIA STATO UN TRATTAMENTO TERMICO di «risanamento» (pastorizzazione o termizzazione)** ma che la riduzione dell' ALP sia attribuibile unicamente al riscaldamento caseario (fasi di riscaldamento e cottura durante la cagliata fino a 52-54 °C) .

Differenza tra latte crudo (> 500.000 UI/g e latte termizzato < 200.000 UI/g e pastorizzato < 350 UI/g).

Nel formaggio di grande dimensioni inoltre l' ALP presenta un gradiente termico (il cuore della forma è rimasto a temperature elevate per più tempo).

Norma ISO 11816-2 / IDF 155-2 del 2003 Determinazione della ALP nel formaggio specifica (in modo decisamente particolareggiato) la modalità di prelievo per i formaggi a latte crudo di grandi dimensioni per la determinazione dell' ALP.

ANEDDOTO CURIOSO : LA VOLATILIZZAZIONE DELLA AFLATOSSINA M1 DAL LATTE ...



Rientro da NC per AFM1 realizzato in 12-24 ore invece che nei normali 3-5 gg dopo riduzione o sostituzione foraggi sospetti.

Malgrado l'apparente semplicità con cui si possono affrontare i casi di non conformità e monitorare gli effetti dei cambiamenti introdotti, il cambio drastico ed improvviso della razione alimentare non è privo di conseguenze negative sia di natura economica per l'allevatore che sanitaria per le bovine. Non è quindi strano che si cerchi di limitare l'entità dei cambiamenti (ad esempio con acquisto di nuove partite di farine) o di velocizzare il rientro nei limiti (riducendo così lo scarto di latte prodotto).

IL LABORATORISTA ATTENTO ASSOCIO' QUESTI CASI AD ALCUNE OCCASIONALI EVIDENZE DI CAMPIONI «STRANI» NELLA FASE DI PREPARAZIONE CAMPIONI PER ELISA AFM1



Dopo la centrifugazione (sgrassatura) l'anello di grasso in superficie appare normalmente abbastanza costante in dimensioni (titolo in grasso) , consistenza (velocità centrifuga, tipo di acidi grassi) e colore (alimentazione) . Fa eccezione il colore in mandrie al pascolo

G. Bolzoni - 2023



Saltuariamente ci è capitato di osservare :

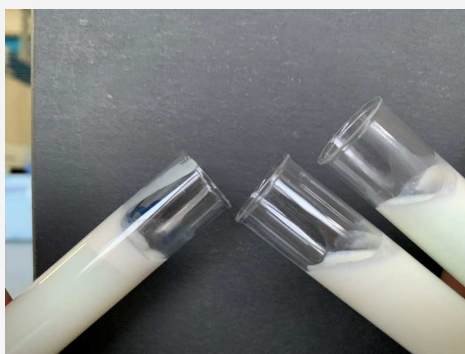
- Campioni senza alcuno strato di grasso separato o con uno strato sottilissimo che assumeva il colorante del conservante in modo quasi identico al resto del latte



- Campioni con anello di grasso molto sottile di colore uniforme e di minor consistenza (ultimi due a destra nella foto).



- Più facilmente apprezzabile ad occhio nudo che in foto



VOLATILIZZAZIONE DELLA AFLATOSSINA M1 DAL LATTE ANEDDOTO CURIOSO



- Questi campioni sottoposti all'analisi della Fosfatasi (< 350 UI/ml) risultavano evidentemente costituiti di Latte pastorizzato con titolo in grasso e proteine tipici del latte alimentare (intero o parzialmente scremato). L'anello di grasso risultava anormale in quanto composto dal grasso già omogenizzato in fase di produzione
- In un caso il conferimento di 7 differenti campioni di latte di massa, le anormali reazioni di cui sopra sono state osservate in 2 differenti campioni (apparentemente riguardanti due allevamenti diversi). In questo ultimo caso è stato facile apprezzare che la composizione degli stessi risultava identica in termini di grasso, proteine, lattosio, urea, cellule somatiche, caseine (quindi, in breve, la stessa confezione di latte trattato termicamente del commercio era stato utilizzato per ben 2 campioni di allevamenti diversi).

G. Bolzoni - 2023



Senza voler aprire discussioni infinite sulla affidabilità dei sistemi di autocontrollo (la cui verifica rientra comunque nei compiti del Servizio Veterinario)

Concludiamo ricordando che la competenza tecnica e la professionalità attiva in chi esegue o controlla l'esecuzione dei prelievi (ed anche di chi lavora in laboratorio) può aiutare a chiarire certe «eccezioni alla regola» o magari evidenziare veri e propri imbrogli.

