



Ricerca finanziata dalla Regione Piemonte

Attività di ricerca ed innovazione nell'ambito del monitoraggio della qualità del latte bovino piemontese – LaBoR

Partecipanti:

Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta - Torino

Istituto Nord Ovest Qualità – Moretta (CN)

Associazione Regionale Allevatori del Piemonte - Torino

Il progetto

L'obiettivo principale del progetto è stato quello di promuovere il miglioramento della qualità del latte piemontese, individuando nuovi parametri di valutazione di specifico interesse in funzione della destinazione d'uso, da porre accanto ai parametri classici (cellule somatiche, carica batterica totale, tenori di grasso, proteine, caseina e urea).

Nel corso del programma, sono state effettuate analisi per la ricerca di Aflatossina M1 nel latte crudo mediante due tecniche ELISA a confronto. Inoltre, sono stati ricercati residui di sostanze antimicrobiche nel latte di singole bovine trattate con le principali famiglie di molecole. Le analisi sono state svolte con metodi rapidi di screening diretti verso le molecole maggiormente utilizzate per il trattamento delle bovine da latte e anche con tecnica strumentale per evidenziare e quantificare la specifica molecola. In continuità con la scorsa annualità, è stata effettuata una raccolta di dati sul contenuto di proteine vere del latte di massa di diversi conferenti di vari caseifici, durante differenti momenti dell'anno. L'analisi è stata effettuata utilizzando la strumentazione Milkoscan FOSS; la raccolta dei dati è stata effettuata in diversi periodi dell'anno per monitorare le eventuali variazioni stagionali sul contenuto proteico del latte, in particolare confrontando il contenuto di proteine e proteine vere del latte. Inoltre, sono state effettuate prove di Caratterizzazione del Microbiota negli ambienti di produzione, su latte, cagliata e formaggio di tre tipologie, tra le quali anche il Grana Padano DOP, mediante un approccio genomico, next generation sequencing (NGS), basato sul sequenziamento ad alto rendimento del DNA che codifica per l'RNA 16S; infine sono state implementate le attività relative alle prove interlaboratorio, con l'esecuzione di cinque RT per ricerca di residui di sostanze inibenti e con l'utilizzo di un sistema di carte di controllo per l'analisi di confronto dell'allineamento tra Centro latte IZSPLV e ARAP.



Ricerca di Aflatossina M1 nel latte mediante metodi di screening rapido

L' aflatossina M1 (AFM1) rappresenta una sostanza decisamente pericolosa per la salute umana in quanto è inserita, dall' Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (IARC), nel gruppo 2b, tra gli agenti con possibili effetti cancerogeni sull'uomo.

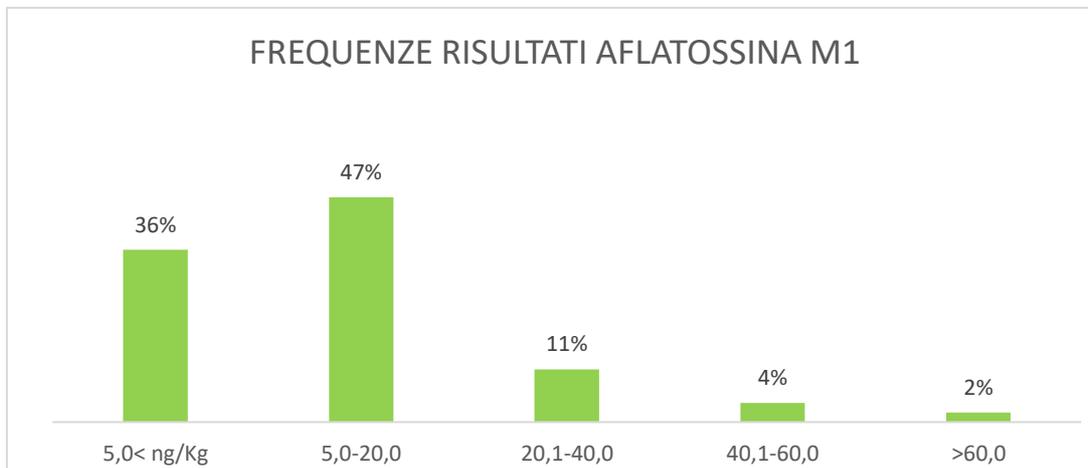
L'AFM1 deriva dall'idrossilazione, a livello epatico, dell'aflatossina B1 contenuta nelle derrate alimentari contaminate. Gli animali che si nutrono di questi alimenti, a seguito dei processi metabolici, eliminano l'AFM1 nelle urine e in parte nel latte, se l'animale è in lattazione.

Nell'ambito di questo progetto sono stati testati per la determinazione dell'AFM1 un totale di 610 campioni di latte crudo bovino mediante metodica ELISA (Enzyme-linked ImmunoSorbent Assay) accreditata, presso il laboratorio S.S. Centro Latte, IZSPLV. Il kit utilizzato è un metodo ELISA competitivo che consente, per ciascun campione, di ottenere una stima della concentrazione di AFM1 (ng/Kg) mediante l'inserimento nella seduta analitica di sette diversi standard a titolo noto e la successiva costruzione di una curva di taratura. I campioni sono stati forniti da diverse aziende del territorio piemontese, conferenti presso i principali caseifici che partecipano al progetto latte qualità. I valori ottenuti mediante analisi con ELISA accreditato sono stati suddivisi in classi e sono state calcolate le rispettive frequenze (Tabella 1 e grafico 1).

Tabella 1. Aflatossina M1: suddivisione dei risultati per classi.

CLASSI (ng/Kg)		N° CAMPIONI	FREQUENZE
< 5	I	217	36%
5,0 – 20,0	II	286	47%
20,1 – 40,0	III	69	11%
40,1 – 60,0	IV	26	4%
> 60.0	V	12	2%
TOT. CAMPIONI ANALIZZATI		610	100%

Grafico 1. Frequenze dei risultati per la ricerca di Aflatossina M1.



Su una parte dei campioni disponibili (n. 354), è stato effettuato un confronto tra i risultati ottenuti con l'analisi mediante metodo ELISA accreditato e un metodo di prova alternativo ELISA più rapido, eseguito presso il laboratorio Centro latte dell'ARAP.

Di seguito sono riportate alcune valutazioni sul confronto tra i due metodi di prova.

- Per 202 campioni (57%) si sono ottenuti valori di AFM1 <10ng/Kg per entrambi i metodi. In particolare, 103 campioni (29%) sono risultati "non rilevabili" per entrambi i test, ottenendo valori inferiori ai rispettivi limiti di rilevabilità, ossia <5ng/Kg per il metodo ELISA accreditato e <10ng/Kg per il metodo ELISA alternativo; invece 99 campioni (28%) sono risultati per il metodo alternativo <10ng/Kg e per il metodo ELISA con valori compresi tra 5-10ng/Kg.
- 4 campioni (1%) sono risultati <5ng/Kg per metodo ELISA accreditato e con valori compresi tra 10-12ng/Kg per il metodo alternativo.
- 3 campioni (1%) sono risultati >100ng/Kg con il metodo alternativo mentre uno >100ng/Kg e gli altri due rispettivamente 72ng/Kg e 55ng/Kg con il metodo ELISA accreditato.

I risultati di 145 campioni (41%) sono stati elaborati e rappresentati mediante i grafici 2 e 3. Nella rappresentazione grafica 2 sono stati messi a confronto tutti i risultati ottenuti eseguendo un'analisi di regressione, con evidenza della linea di tendenza e corrispondente equazione della retta e R². Nel grafico 3, invece sono state elaborate le concentrazioni dell'analita rispetto alle differenze tra i due metodi mediante grafico Bland-Altman e determinazione del "Bias".

Grafico 2. Analisi di regressione dei dati.

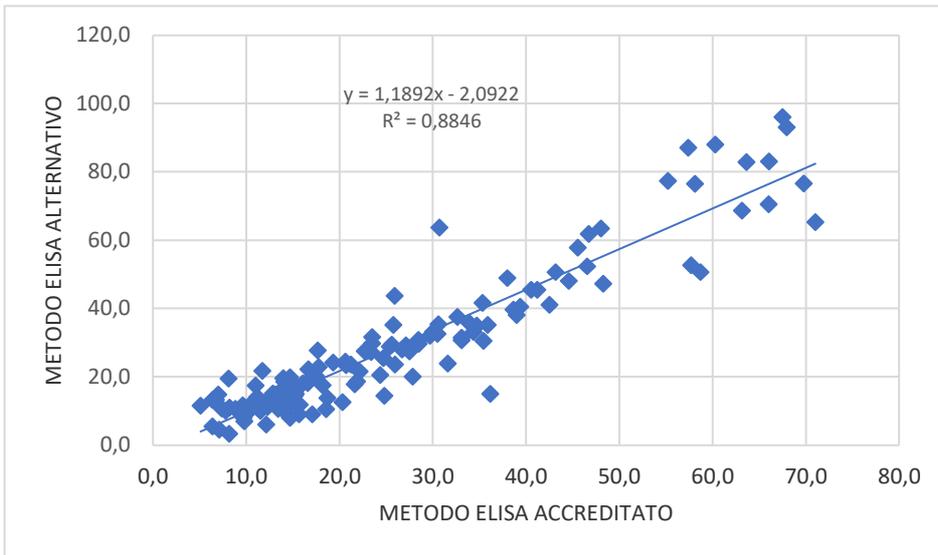
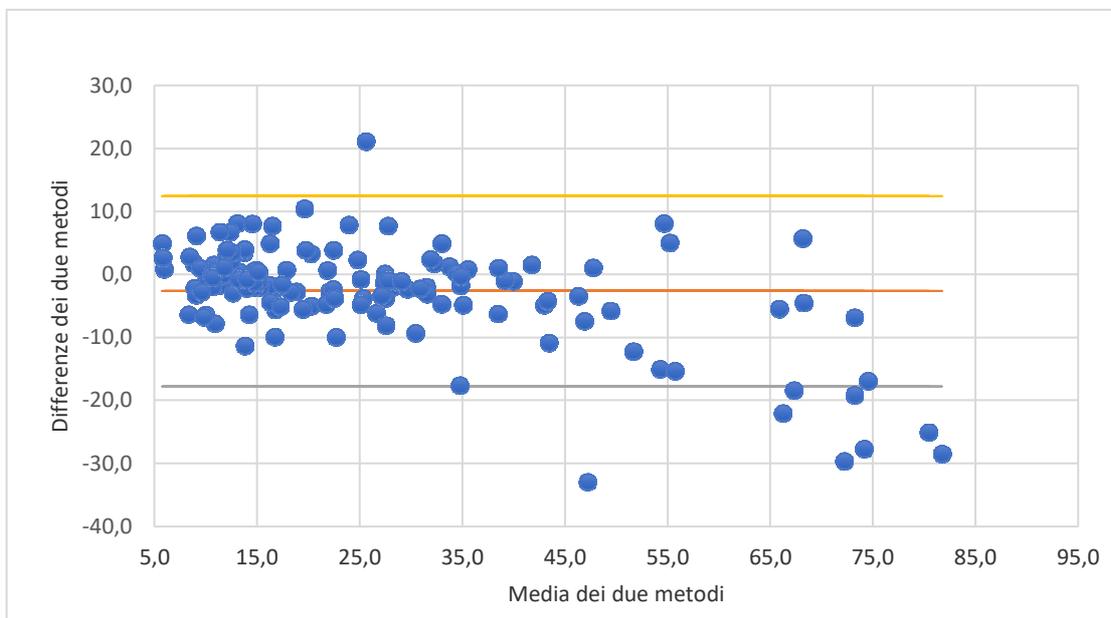


Grafico 3. Blant- Altman e determinazione del Bias.





I risultati ottenuti dal confronto dei due metodi mostrano un completo accordo nell'esprimere la "conformità" o "non conformità" del campione. Si ritiene pertanto che anche il metodo ELISA alternativo qui utilizzato sia un valido strumento per un primo screening.

Per quanto riguarda i 20 campioni (6%) con contenuto di AFM1 > 50 ng/Kg, si può osservare che il metodo ELISA alternativo tende a sovrastimare leggermente rispetto al metodo accreditato. Tale evidenza è in linea con quanto si osserva per i metodi rapidi di screening che per loro natura e per il principio di precauzione devono garantire di non perdere campioni potenzialmente positivi, perdendo talvolta in specificità. Nel sistema di controllo di routine in questi casi è sempre previsto l'utilizzo di un metodo chimico quantitativo di conferma per la verifica dell'effettivo superamento del LMR come da Reg. UE 2023/915.

Residui di sostanze antimicrobiche nel latte

In continuità con le attività e con i risultati ottenuti nel programma dell'annualità precedente (Bovilat 7.0), nel presente programma si è proseguito con i campionamenti e le relative analisi sui campioni di singola bovina cui erano state somministrate molecole note, per verificare l'effetto di tali molecole e dei loro metaboliti su tempi di sospensione, focalizzandosi sulle molecole particolarmente critiche, secondo quanto emerso dall'elaborazione dei dati nel corso dell'annualità precedente. Sono stati analizzati campioni individuali di latte crudo provenienti da 29 bovine, cui erano stati somministrati farmaci a base antibiotica prescritti per la cura della mastite. In totale sono stati analizzati 67 campioni. Su tutti i campioni sono stati eseguiti i tre test rapidi di tipo qualitativo in uso presso la SS Centro latte di IZSPLV, cui è seguito, indipendentemente dal primo esito, l'invio al laboratorio chimico SS Residui di IZSPLV per l'esecuzione del test di screening quantitativo in spettrometria di massa.

I risultati ottenuti dalle analisi condotte sulle bovine in esame, messi a confronto gli LMR indicati sul Regolamento CE 37/2010, mostrano in generale come i tempi di sospensione indicati nel foglietto illustrativo corrispondano ad una effettiva riduzione nel latte dei principi attivi o dei metaboliti, fino a valori ben al di sotto dei LMR. Vi sono tuttavia alcuni casi particolari che meritano alcune segnalazioni e considerazioni. Si segnala il caso di una bovina, trattata con il farmaco Proactive a base di benzilpenicillina: in questo caso è stato rilevato un residuo di penicillina G sia con lo screening qualitativo sia con il quantitativo (5,5 µg/Kg) nel latte prelevato il giorno del termine del tempo di sospensione. Addirittura, il giorno successivo a tale termine,



l'analisi con Delvotest risulta ancora positiva e il metodo quantitativo rileva 4 µg/Kg, corrispondenti proprio al LMR. Si segnalano inoltre tre casi di bovine, trattate con il principio attivo Penetamato, per i quali i sistemi diagnostici utilizzati non sono stati in grado di rilevare alcun residuo. Un'altra segnalazione va fatta in merito ad un campione, nel quale il metodo chimico quantitativo ha riscontrato la Cefalessina in concentrazione pari a 47 µg/Kg, mentre i metodi qualitativi hanno dato esito negativo. Questo risultato si spiega tenendo conto del fatto che il limite di rilevabilità dei rispettivi test è di poco al di sotto della concentrazione rilevata.

In generale si può affermare che l'utilizzo combinato di differenti metodi diagnostici rapidi è auspicabile e resta lo strumento migliore per la rilevazione dei residui di sostanze inibenti.

Analisi del latte Proteine/proteine vere (Azoto totale / proteico)

Il Piemonte ha una vocazione storica per la produzione di formaggi tipici, tra i quali vi sono anche formaggi che possono fregiarsi della Denominazione di Origine Protetta (DOP), e più dell'80% del latte prodotto in regione viene destinato alla trasformazione per tali produzioni. Un ruolo fondamentale nella trasformazione del latte in formaggio lo ricoprono le proteine presenti nel latte, che, attraverso processi chimico-fisici innescati con i processi di caseificazione, precipitano e danno forma alla cagliata che diventerà formaggio. Il tipo di proteine presenti e il loro tenore influiscono direttamente sulla resa casearia, che è uno dei punti cruciali delle voci di guadagno dei caseifici. L'influenza del contenuto delle proteine nel latte sulla resa casearia e quindi sul valore commerciale del latte stesso è ormai consolidata da molti decenni, indirizzando da una parte gli allevatori ad aumentare il tenore di proteine nel latte prodotto attraverso scelte gestionali mirate (selezione genetica e gestione della nutrizione delle bovine da latte in primis) e dall'altra parte i caseifici a valorizzare maggiormente il latte con caratteristiche casearie migliori attraverso la misurazione analitica dei vari parametri compositivi del latte. Nel corso dell'attività annuale di progetto, visto il continuo interesse riscontrato da parte dei maggiori caseifici e da parte dei rappresentanti degli allevatori piemontesi, si è effettuata una raccolta di dati sul contenuto di proteine vere del latte di massa di diversi conferenti di vari caseifici, durante differenti momenti dell'anno. L'analisi è stata effettuata utilizzando la strumentazione Milkoscan FOSS, che si basa sulla spettrometria all'infrarosso, tecnica analitica che consente di abbinare un alto numero di analisi con costi contenuti e in tempi brevi. Per garantire l'affidabilità, la precisione e l'accuratezza analitica della strumentazione in uso per il parametro proteine vere è utilizzato un materiale di riferimento

prodotto da Actalia Cecalait. La raccolta dei dati è stata effettuata in diversi periodi dell'anno per monitorare le eventuali variazioni stagionali sul contenuto proteico del latte, in particolare confrontando il contenuto di proteine e proteine vere del latte. L'attività di ricerca ha consentito la raccolta dei dati del contenuto di proteine vere, insieme agli altri parametri compositivi del latte, su oltre 13000 campioni. La Tabella 1 riassume le caratteristiche descrittive del dataset dei campioni analizzati.

Tabella 1. Caratteristiche descrittive dei campioni analizzati

	<i>Proteine vere</i>	<i>Grasso</i>	<i>Proteine</i>	<i>Lattosio</i>	<i>Caseina</i>	<i>Urea</i>	<i>Cell. Som.</i>
	g/100g	g/100g	g/100g	g/100g	g/100g	g/100g	*1000/ml
Media	3,28	3,98	3,41	4,71	2,70	23,31	280
Mediana	3,28	3,99	3,41	4,73	2,71	23,36	247
Deviazione standard	0,19	0,31	0,18	0,11	0,17	6,52	157
Minimo	2,25	2,47	2,41	3,67	1,74	6,57	18
Massimo	4,09	5,14	4,19	5,02	3,41	62,38	3297
Numero campioni analizzati	13672	13672	13672	13672	13672	13672	13672

Il contenuto medio di proteine vere rilevato è stato di 3,28 g/100g rispetto ad un contenuto medio di proteine di 3,41 g/100g. Le proteine vere mediamente rappresentano il 96,18% delle proteine. La restante parte è costituita da componenti azotate (urea, peptidi, amminoacidi, ecc.) che non possono essere valorizzati durante la caseificazione del latte.

Se confrontiamo i vari parametri analitici misurati sui campioni analizzati durante l'attività di ricerca emerge che le proteine vere sono fortemente e positivamente correlate con il contenuto di proteine (Figura 1) e di caseine del latte, mentre hanno una bassa correlazione con il contenuto di urea, il principale costituente azotato non proteico presente nel latte (Tabella 2). Inoltre, le proteine vere sono correlate positivamente con il contenuto di grasso, mentre la correlazione è nulla tra proteine vere e lattosio e cellule somatiche.

Tabella 2. Correlazione tra i principali componenti analitici del latte misurati

	<i>Grasso</i>	<i>Proteine</i>	<i>Lattosio</i>	<i>Cell. Som.</i>	<i>Caseina</i>	<i>Urea</i>	<i>Proteine vere</i>
Grasso	1,000						
Proteine	0,590	1,000					
Lattosio	-0,003	0,203	1,000				
Cell. Som.	0,006	-0,014	-0,264	1,000			
Punto Cong.	0,070	0,101	0,145	-0,014			
Caseina	0,619	0,991	0,265	-0,033	1,000		
Urea	0,057	0,136	-0,031	-0,049	0,060	1,000	
Proteine vere	0,605	0,996	0,189	-0,008	0,991	0,088	1,000

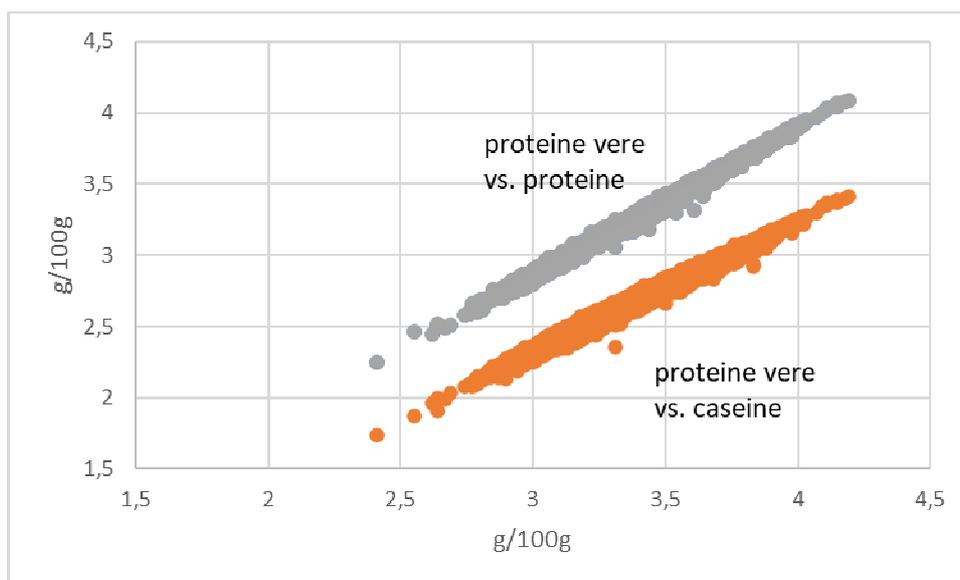


Figura 1. Relazione tra proteine vere e il contenuto di proteine e caseine del latte

L'attività di ricerca ha previsto la raccolta dei dati per 12 mesi a partire da luglio 2023 fino a giugno 2024.

Questo ha permesso di verificare anche l'andamento stagionale del contenuto di proteine vere durante l'arco dell'anno (Figura 2). Tale andamento è sovrapponibile a quello delle proteine totali, con contenuti maggiori durante i mesi di novembre e dicembre, con valori medi di circa 3,41 g/100g di latte. Durante i mesi estivi invece si sono registrati i contenuti più bassi di proteine vere, con un minimo di 3,15 g/100g di latte rilevati a luglio 2023.

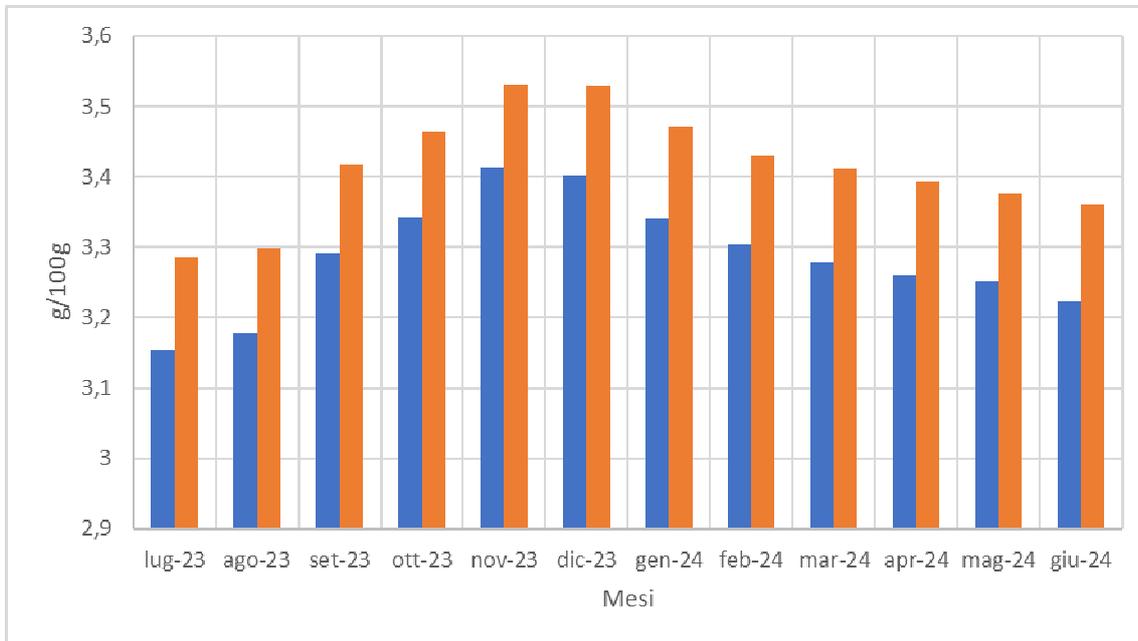


Figura 2. Andamento del contenuto medio di proteine vere di proteine del latte piemontese nei differenti mesi dell'anno

La stagione dell'anno ha un effetto anche sulla percentuale di proteine vere rispetto alle proteine totali (Figura 3). Mediamente, nel periodo autunno-invernale, il contenuto di proteine vere, espresso in percentuale rispetto al contenuto di proteine totali, ha fatto registrare i valori più elevati. Durante il mese di giugno, invece, si sono registrati i valori più bassi.

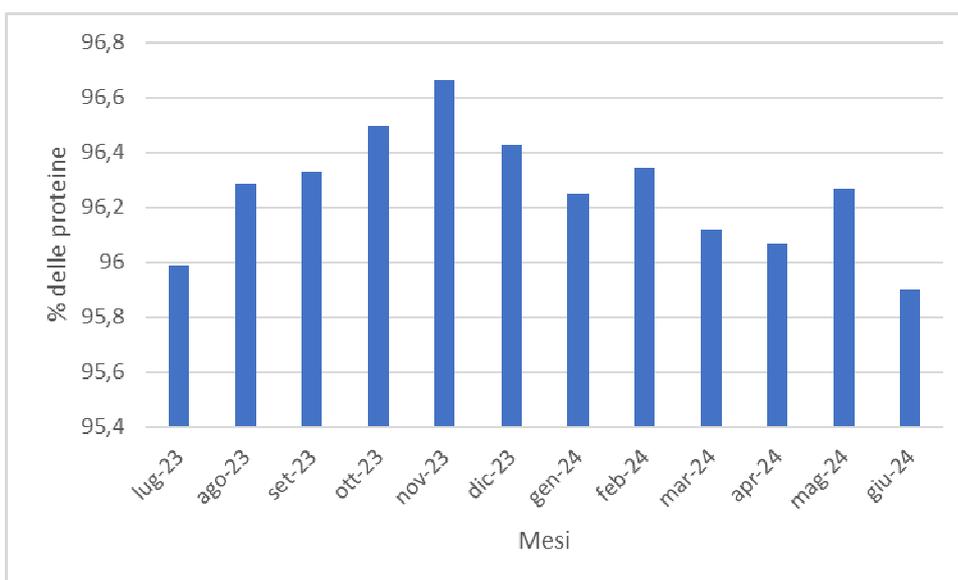


Figura 3. Andamento del rapporto medio delle proteine vere rispetto alle proteine del latte nei differenti mesi dell'anno.



In conclusione, la raccolta dei dati effettuata durante i 12 mesi di ricerca, ha mostrato che il contenuto proteico del latte, con maggior attenzione sul contenuto di proteine vere, è variato durante i diversi periodi stagionali. Un fattore che potrebbe condizionare queste variazioni stagionali potrebbe essere il regime alimentare a cui sono sottoposte le bovine. Infatti, durante le stagioni varia, in primis, l'offerta delle risorse foraggere aziendali con conseguente modifica delle razioni alimentari per soddisfare sempre interamente le esigenze produttive (quantità e qualità del latte) delle bovine da latte. Queste variazioni nutrizionali potrebbero influenzare la componente proteica del latte prodotto, sia in termini quantitativi che qualitativi.

Caratterizzazione del Microbiota in latte, cagliata e formaggio

Le strutture e le dinamiche del microbiota nei prodotti lattiero-caseari possono avere un impatto sulla qualità e sulla sicurezza di questi alimenti: approfondire la conoscenza del microbiota, che potenzialmente può includere agenti patogeni di origine alimentare, è di fondamentale importanza per affrontare e prevenire potenziali problemi di sicurezza alimentare. L'ecologia microbica del formaggio è composta da una ricca e complessa interazione tra fermenti lattici starter e fermenti lattici non starter provenienti principalmente dal latte crudo e/o dall'ambiente di lavorazione che possono contribuire alle caratteristiche finali del formaggio. Nel presente programma sono state analizzate le variazioni della struttura del microbiota durante la trasformazione da materia prima (latte), prodotto intermedio (cagliata) fino ad arrivare al prodotto finale (formaggio). È stato utilizzato un approccio genomico, next generation sequencing (NGS), basato sul sequenziamento ad alto rendimento del DNA che codifica per l'rRNA 16S e sono state analizzate tre diverse produzioni casearie raccolte da caseifici selezionati del territorio regionale, per comprendere a fondo quali sono le differenze ma anche i punti in comune tra le diverse linee produttive.

Sono stati utilizzati campioni derivanti da due aziende del territorio seguiti per la produzione di una caciotta fresca (Caseificio A) e un Maccagno (Caseificio B) ed un'azienda che produce formaggio Grana Padano D.O.P. (Caseificio C).

Si è proceduto con il campionamento in punti consecutivi del processo produttivo, in particolare sono stati raccolti e processati: il latte crudo, la cagliata, formaggio a metà e a fine stagionatura oltre che i tamponi ambientali relativi alle vasche del latte, alla caldaia e alle assi di stagionatura.

Una volta raccolti, i campioni sono stati trasportati presso il laboratorio in condizioni di temperatura controllata e processati per l'estrazione e purificazione del DNA totale mediante l'utilizzo del kit commerciale "EXTRACTME DNA KIT" (BLIRT). Una volta estratto, il DNA totale è stato conservato a -20°C fino al momento della preparazione per il sequenziamento.

Il protocollo utilizzato per la caratterizzazione del Microbiota ha come target di amplificazione e sequenziamento le regioni ipervariabili V3-V4 del gene ribosomiale 16S. Il primo step prevede l'amplificazione mediante PCR con i primer previsti dal protocollo Illumina "16SMetagenomic Sequencing Library Preparation":

- 16SAmpliconPCR Forward Primer:

TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG

- 16SAmpliconPCR Reverse Primer

GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATC

La miscela PCR, per ciascun campione, è costituita da quanto riportato in Tabella 1.

	Volume
Microbial DNA (5 ng/μl)	2.5 μl
Amplicon PCR Forward Primer 1 μM	5 μl
Amplicon PCR Reverse Primer 1 μM	5 μl
2x KAPA HiFi HotStart ReadyMix	12.5 μl
Total	25 μl

Tabella 1: composizione miscela PCR

La reazione di amplificazione è eseguita secondo il seguente profilo termico:

- 95°C per 3 minuti
- 25 cicli di:
 - 95°C per 30 secondi
 - 55°C per 30 secondi
 - 72°C per 30 secondi
- 72°C per 5 minuti
- Mantenimento a 4°C

Una volta amplificata la regione di interesse, i campioni sono sottoposti a purificazione mediante l'utilizzo delle biglie magnetiche (NucleoMag® NGS Clean-up Size Select), per procedere con la Index PCR necessaria per l'aggiunta degli adattatori e degli indici, per procedere con il successivo

sequenziamento su piattaforma Illumina. La miscela PCR, per ciascun campione, è costituita da quanto riportato in Tabella 2:

	Volume
DNA	5 μ l
Nextera XT Index Primer 1 (N7xx)	5 μ l
Nextera XT Index Primer 2 (S5xx)	5 μ l
2x KAPA HiFi HotStart ReadyMix	25 μ l
PCR Grade water	10 μ l
Total	50 μ l

Tabella 2: composizione miscela PCR

La reazione di amplificazione è eseguita secondo il seguente profilo termico:

- 95°C per 3 minuti
- 8 cicli di:
 - 95°C per 30 secondi
 - 55°C per 30 secondi
 - 72°C per 30 secondi
- 72°C per 5 minuti
- Mantenimento a 4°C

La libreria preparata per ciascun campione è stata quantificata con fluorimetro Qubit utilizzando il kit “Qubit dsDNA HS (High Sensitivity)”. I campioni sono stati miscelati in un unico pool equimolare di sequenziamento dopo essere stati diluiti tutti alla medesima concentrazione di 4nM e il pool finale è stato verificato per la distribuzione attesa mediante elettroforesi capillare su sistema Agilent Bioanalyzer 2100 con il kit “Bioanalyzer High Sensitivity DNA”.

Il pool di sequenziamento è stato caricato su strumento Miseq Illumina utilizzando il kit “MiSeq V3 Reagen kit” impostando una corsa di 2x300 cicli.

Dopo che i campioni sono caricati, il sistema MiSeq fornisce un'analisi secondaria utilizzando il software MiSeq Reporter (MSR) e il flusso di lavoro “Metagenomics”, specifico per l'analisi dei dati prodotti con il protocollo 16S. La pipeline Metagenomics classifica gli organismi in base alle sequenze dell'amplicone V3 e V4 utilizzando un database di dati 16SrRNA. La classificazione si basa sul database Greengenes (<http://greengenes.lbl.gov/>). L'output di questo flusso di lavoro è una



classificazione di letture a diversi livelli tassonomici: regno, phylum, classe, ordine, famiglia, genere e specie.

Il microbioma della filiera lattiero-casearia ospita una complessa comunità microbica che è influenzata da molteplici fattori e che può essere originata dall'ambiente, dalle stagioni e dalle qualità delle materie prime utilizzate. Il monitoraggio della filiera produttiva è stato effettuato anche andando a caratterizzare la composizione del microbiota dell'ambiente caseario, in particolare caldaia, utensili e assi di stagionatura, attraverso l'utilizzo di sponge nelle tre differenti realtà produttive.

Considerando i campioni di latte di massa analizzati, a prescindere dalla loro origine, si osserva una maggioranza di generi quali *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, ma nello specifico andando a scorporare le componenti riferibili a singoli conferenti si evidenzia come alcuni generi emergano, in particolare: *Lactococcus* e *Lactobacillus* per i conferenti del caseificio C e *Streptococcus* per un conferente del caseificio A.

Al momento della cagliata, invece si evidenzia una maggior differenziazione: per l'Azienda A il genere più abbondante è *Lactococcus* ma sono presenti anche, in ordine di abbondanza, *Streptococcus*, *Acinetobacter* e *Pseudomonas*. Nell'Azienda B il genere più abbondante è *Streptococcus* ma sono presenti anche *Acinetobacter*, *Pseudomonas* e *Lactococcus*. Nel Caseificio C si registra subito il prevalere di *Lactobacillus*, quasi l'87% delle sequenze prodotte appartiene a questo genere, evidenziando come in questa primissima fase prenda il sopravvento all'interno della popolazione microbica.

Infine, per quel che riguarda il microbiota del formaggio, per il prodotto finale dell'Azienda A si osservano i generi *Streptococcus* e *Lactobacillus*, con una piccola percentuale di *Staphylococcus*. Il prodotto dell'Azienda B, riporta come generi più rappresentati sono *Streptococcus*, *Leuconostoc* e *Lactobacillus* e si osserva nella produzione campionata a maggio la comparsa del genere *Fructobacillus* non presente in nessun altro campionamento.

Per il Caseificio C, invece, oltre l'80% della sequenza risulta assegnato al genere *Lactobacillus* e tutti i generi restanti si attestano intorno all'1%. Analizzando la composizione a livello di specie si osserva come *Lactobacillus ultunensis* (circa il 40%), *Lactobacillus fermentum* (circa il 15%) e *Lactobacillus helveticus* (circa 8%) siano le specie prevalenti nel campionamento a 10 mesi (Figura 1); ma poi, nel campionamento a 11 mesi, si osserva una variazione di questa composizione:

Lactobacillus fermentum (circa il 16%), *Lactobacillus rhamnosus* (circa il 14%), *Lactobacillus ultunensis* (circa 8%) e *Lactobacillus equicursoris* (circa 8%). (Figura 2)

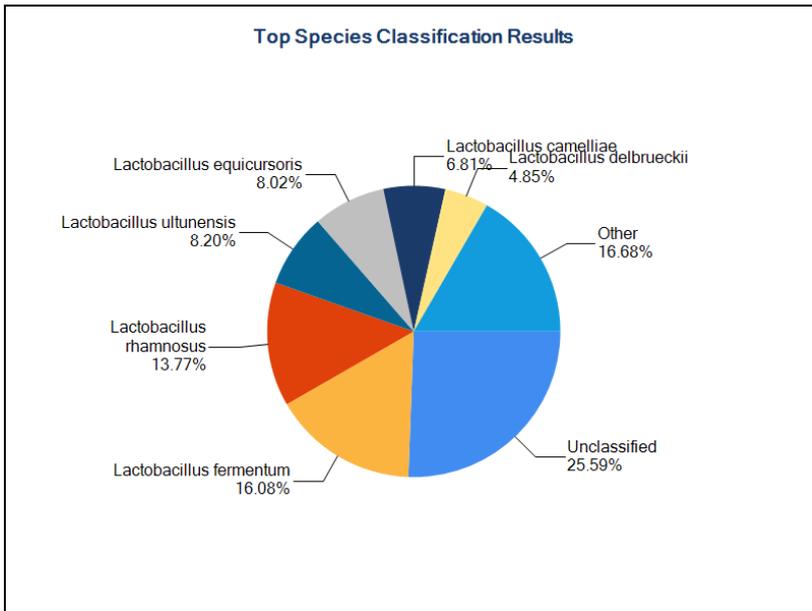


Figura 1: Campionamento 10 mesi

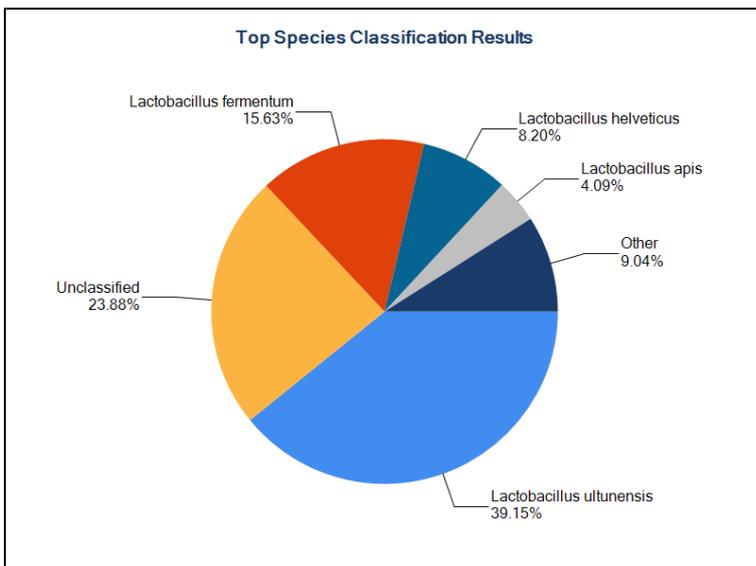


Figura 2: Campionamento 11 mesi

Analizzando il microbiota ambientale, si evidenzia come a livello di caldaia delle Aziende A e B siano presenti principalmente i generi *Streptococcus*, *Pseudomonas* e *Acinetobacter* mentre



nell'azienda C compaiono anche generi che non si ritrovano nelle altre due realtà, quali: *Psychrobacter*, *Staphylococcus* e *Listeria*.

Un'altra potenziale fonte di influenza del microbiota dei prodotti lattiero caseari deriva dagli utensili utilizzati durante la lavorazione e dalle assi di stagionatura. Nel caso degli utensili osserviamo come per i caseifici A e B siano prevalenti i generi *Streptococcus* e *Lactobacillus* mentre per il caseificio C compaiono generi non osservati nelle altre realtà quali: *Chryseobacterium*, *Macrococcus*, *Enhydrobacter*, *Kocuria*, *Novosphingobium*, *Enhydrobacter*, che però non vengono rilevati nel prodotto finale. A livello di assi di stagionatura, osserviamo poi una maggior eterogeneità, infatti nei caseifici A e B si osservano i generi *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Psychrobacter*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Brachybacterium* e *Halomonas*; mentre nel caseificio C *Staphylococcus*, *Kocuria*, *Corynebacterium*, *Streptomyces*, *Brevibacterium*, *Bacillus* e *Citricoccus*.

Lattobacilli, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus* e *Streptococcus* rappresentano il microbiota principale della maggior parte dei prodotti lattiero-caseari, seguiti poi però da diverse popolazioni minori, inclusi microrganismi che possono derivare dallo stato di salute dell'animale (ad esempio mastite), dell'ambiente (stagione, azienda agricola e temperatura) e operatori. Queste variabili conferiscono ad ogni singola produzione un particolare microbiota.

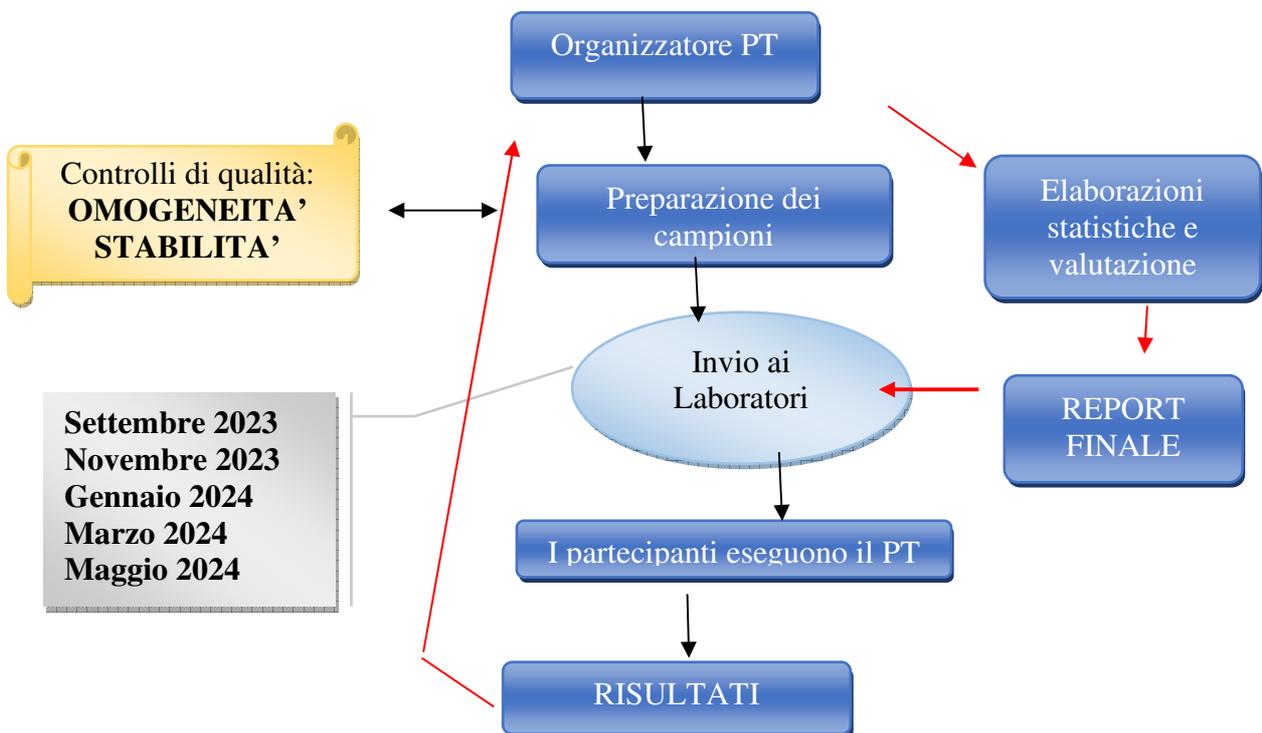
I Caseifici A e B presentano una comunità microbica più diversificata in tutte le matrici analizzate, probabilmente come conseguenza delle pratiche casearie tradizionali. Questi caseifici erano stati coinvolti nello studio del microbioma nel progetto della precedente annualità, mostrando risultati in linea con quelli descritti nella presente relazione. Il Caseificio C invece mostra da subito una predominanza di *Lactobacillus* fin dalle prime fase di produzione, con una modulazione delle specie con l'avanzare del periodo di stagionatura, evidenziando come questo tipo di produzione sia probabilmente molto più standardizzata e ripetibile rispetto ad aziende dove siano in essere pratiche casearie più tradizionali.

Implementazione delle prove interlaboratorio

a- Allestimento di prove interlaboratorio per la rilevazione di sostanze inibenti nel latte.

Allo scopo di integrare le prove interlaboratorio previste nell'ambito del "Ring test Piemonte", come già nelle tre precedenti annualità del progetto, nel corso del presente programma sono state effettuate le prove interlaboratorio per la verifica delle performances analitiche dei metodi di

screening per la ricerca di sostanze inibenti nel latte, in uso presso i diversi laboratori. Infatti, nell'anno di attività del progetto sono state allestite cinque prove interlaboratorio, seguendo le modalità e gli schemi di preparazione definiti dalla ISO 17043 e descritti nel diagramma di flusso sottostante.



Il capofila ha preparato cinque set di campioni di latte crudo, sperimentalmente contaminati con sostanze inibenti delle principali famiglie. Tali campioni, suddivisi in aliquote omogenee, sono stati congelati e distribuiti a tutti i laboratori partecipanti. I risultati dei RT sono stati elaborati dal capofila e forniti in maniera anonima ai partecipanti.

b- Prove interlaboratorio per la verifica dell'allineamento dei laboratori IZS e ARAP.

Al fine di verificare l'allineamento strumentale analitico dei laboratori Centro latte di IZS e ARAP, sono stati integrati nell'elaborazione tutti i parametri previsti nell'ambito dei RT effettuati. Inoltre, è stata costruita una carta di controllo per ciascun parametro analizzato per poter eseguire una valutazione nel tempo delle prove di confronto effettuate.



Parametri tradizionali per la qualità del latte

Le analisi per la valutazione dei parametri tradizionali per la qualità del latte, sono state svolte presso il Laboratorio Centro Latte (ARAP).

I risultati delle analisi sono stati inseriti sul portale dedicato (<http://bovilat.arapiemonte.it>) che consente ai vari interlocutori (Allevamenti, Caseifici, ASL) di visualizzare nell'arco di 24 ore i dati di analisi e tutte le elaborazioni ad essi associate. L'elaborazione finale dei dati relativi all'intera campagna è stata condotta dall'IZS PLV tenendo in considerazione l'ubicazione altimetrica degli allevamenti, la loro dimensione e la destinazione del latte (conferimento a trasformatori o vendita diretta), e confrontando l'andamento dei parametri di qualità del latte rispetto ai dati storici riferiti alla realtà piemontese degli ultimi anni.

L'IZS PLV ha supervisionato l'intera attività analitica dei laboratori, nonché l'affidabilità e la coerenza dei dati. Nello specifico ha operato nell'ambito della verifica mensile della taratura e della precisione delle attrezzature analitiche dei laboratori, tramite valutazione ed elaborazione dei risultati analitici eseguiti sugli standard dell'AIA (grasso, proteine, caseina e cellule somatiche) e ha verificato mensilmente l'allineamento dei laboratori sulla determinazione della carica batterica tramite prove interlaboratorio. Inoltre sono state organizzate diverse prove interlaboratorio a cui hanno partecipato i laboratori piemontesi del settore lattiero-caseario aderenti al progetto. Queste prove hanno avuto lo scopo di verificare l'allineamento sulla determinazione dei parametri grasso, proteine e cellule somatiche.

La corretta gestione delle attività di prelievo, trasporto e analisi dei campioni dell'intero progetto, è stata assicurata dall'attività ispettiva in capo all'Istituto Nord Ovest Qualità che ha provveduto a elaborare mensilmente i rapporti delle verifiche mensili legate all'attività ispettiva.

Lo stato avanzamento delle attività previste nel progetto è stato monitorato durante le riunioni della Commissione Tecnica monitoraggio qualità latte bovino.