

INDAGINE PRELIMINARE SULLE CARATTERISTICHE MICROBIOLOGICHE DEL LATTE D'ASINA

MICROBIAL STATUS OF DONKEY'S MILK: FIRST RESULTS

Alberghini L., Catellani P., Norbiato M.A., Giaccone V.

Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata e Igiene Veterinaria Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Padova, Legnaro (PD).

SUMMARY

For its chemical and nutritional composition donkey milk is an excellent substitute for human breast milk. In fact, woman's milk and donkey one are quite similar for their composition and for certain intrinsic properties. Based on these considerations, we performed a study on the microbiological characteristics of 86 jannet's milk in 10 farms. Special attention was given to the aspects of health quality of the milk samples examined, referring to the analysis of total microbial count and pH, the possible presence of potentially pathogenic microorganisms, especially by seeking the bacteria *Escherichia coli* O157, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* and *Campylobacter* spp. The samples of milk were picked up from January to March 2010. Our research showed a situation quite positive in terms of sanitation, finding levels of total microbial count (on average $1,8 \cdot 10^4$ cfu/ml) and pH (mean 7,02) entirely in line with data found in previous investigations of other Authors and with values reassuring in terms of healthiness of the product. Regarding the detection of potentially pathogenic microorganisms, only a milk sample of 86 tested was positive for *E. coli* O157; in an other sample low charges of *Campylobacter* spp. have been measured. *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* were not found in all samples. Total microbial count confirm the good quality of the donkey milk. However, occasional isolation of *E. coli* O157 and *Campylobacter* spp. suggests careful attention is to be done to the correct procedures of milking hygiene.

KEYWORDS

donkey milk, microbiology, food hygiene.

INTRODUZIONE

Il consumo del latte d'asina nell'alimentazione umana, con particolare riferimento al periodo neonatale di soggetti allergici o intolleranti alle proteine del latte delle principali specie lattifere o che presentano intolleranza multipla, suscita crescente interesse in campo medico e scientifico (1). Il latte d'asina per la composizione chimico-nutrizionale rappresenta anche un ottimo sostituto del latte materno nel caso in cui l'allattamento al seno non si renda possibile o per gli infanti che sono intolleranti alle caseina vaccine. Il latte di donna e di asina infatti, sono simili relativamente alla composizione e ad alcune proprietà intrinseche. Le virtù salutistiche e terapeutiche di questo prodotto sono note fin dai tempi antichi; ciò nondimeno, fino a oggi sono state condotte poche indagini su questa spe-

cifica matrice alimentare (2,3). La mancanza di una normativa specifica nei riguardi della produzione primaria e della commercializzazione del latte d'asina, rende questo latte un prodotto alimentare poco diffuso (4). Attualmente il Regolamento (CE) n. 1662/2006, riferendosi alla produzione di latte crudo di "altre specie", definisce i criteri di sanità animale e di controllo igienico-sanitario limitatamente alla carica microbica totale, senza alcun riferimento preciso su quali agenti potenzialmente patogeni è necessario porre attenzione per salvaguardare la salute del consumatore (4). Sulla base di questi fatti e con l'aspettativa di poter dare un ulteriore contributo alla conoscenza di questo prodotto, si è voluto intraprendere uno studio sull'analisi delle caratteristiche microbiologiche del latte di asina.

MATERIALI E METODI

I campioni per le analisi sono stati raccolti tra Gennaio e Marzo 2010, da un totale complessivo di 10 aziende, delle quali 5 (A, B, C, D, E) situate in Veneto nelle province di Padova e Vicenza, una (F) in Friuli Venezia Giulia (Udine), una (G) in Basilicata (Potenza), 2 (H e I) nel Lazio (Roma) e una (L) in Abruzzo (L'Aquila). Le aziende A, B, C, D, E ed F sono tutte aziende amatoriali di piccole dimensioni e con un numero di animali inferiore ai 10 capi in lattazione, mentre le aziende G, H, I e L sono aziende dedite all'allevamento degli asini e finalizzate soprattutto alla produzione di latte d'asina per uso alimentare, cosmetico e medico. Sono stati raccolti, in totale, 86 campioni di latte, ognuno corrispondente a una lattifera, clinicamente sana, mediante mungitura manuale previa separazione del puledro dalla fattrice almeno tre ore prima della mungitura. Gli animali avevano un'età compresa tra i 3 e i 18 anni; la maggior parte delle asine erano meticcie, le razze che sono risultate essere più frequenti, nella popolazione presa in esame, erano la razza Martina Franca, Ragusana, Catalana e Amiata. Le analisi prevedevano la determinazione di: Carica Microbica Totale (Plate count agar a 30°C per 72 ore), *Salmonella* spp. (ISO 6579-2002), *Listeria monocytogenes* (ISO 11290-1:1996), *E. coli* O157 (ISO 16654:2001). Sui ceppi di *E. coli* O157 è stata condotta una reazione mediante *Polymerase Chain Reaction* (PCR) per l'amplificazione delle sequenze specifiche dei geni responsabili delle tossine VT1 e VT2 con l'impiego dei primers universali Mk1 e Mk2 (5). La numerazione di *Campylobacter* termotolleranti è stata condotta in parallelo secondo le modalità operative riportate nella norma ISO/EN 10272-2:2006 e col metodo SimPlate® (Biocontrol). I ceppi isolati sono stati passati in subcoltura su Columbia Blood Agar (Oxoid) e quindi identificati in base alle caratteristiche biochimiche, con gallerie Api Campy (bioMérieux). In più, i medesimi ceppi sono stati analizzati con *multiplex* PCR, per confermare l'identificazione di genere e individuare la specie, in base al protocollo di Yamazaki-Matsune (6). La rilevazione del pH è stata effettuata utilizzando un pH-metro BASIC 20 (Crison).

RISULTATI

Le cariche microbiche (CMT) individuate nel latte variavano da un minimo di $1,3 \cdot 10^2$ ufc/ml a un massimo di $4,2 \cdot 10^5$ ufc/ml (media: $1,8 \cdot 10^4$ ufc/ml). Il pH medio dei campioni analizzati è risultato pari a 7,02, con un minimo a 6,98 e un massimo a 7,08. I valori medi dei parametri microbiologici e chimico-fisici del latte nelle singole

le aziende sono riportati nella tabella n.1.

Tabella n.1. Valori medi dei parametri microbiologici e chimico-fisici del latte nelle singole aziende.

Aziende	Regione	N° campioni	Carica Microbica Totale (ufc/ml)	pH
A	Veneto	2	$2,2 \cdot 10^4$	7,06
B	Veneto	2	$9,0 \cdot 10^4$	7,02
C	Veneto	1	$1,9 \cdot 10^3$	7,03
D	Veneto	1	$3,4 \cdot 10^4$	7,03
E	Veneto	1	$3,8 \cdot 10^3$	7,01
F	Friuli Venezia Giulia	5	$2,9 \cdot 10^3$	7,01
G	Basilicata	12	$7,2 \cdot 10^4$	7,00
H	Lazio	14	$7,1 \cdot 10^3$	7,01
I	Lazio	29	$5,1 \cdot 10^3$	7,02
L	Abruzzo	19	$7,1 \cdot 10^3$	7,01

L'azienda con la carica microbica più elevata è stata la B dove, in un campione di latte, con separazione immunomagnetica, è stato pure isolato un ceppo di *E. coli* O157. Dal DNA estratto da quest'ultimo ceppo è stato possibile amplificare i geni codificanti la sintesi delle verocitotossine. Nessun campione, invece, è risultato positivo alla ricerca di *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*. La numerazione di *Campylobacter* spp. con la metodica ISO è risultata sempre inferiore alle 10 ufc/ml (limite di rilevanza della metodica ISO prima citata), mentre con la metodica SimPlate® un solo campione della azienda A è risultato contenere un valore di *Campylobacter* spp. pari a $1,2 \cdot 10^1$ ufc/ml. Alle prove biochimiche tradizionali in micro metodo API Campy, l'unico ceppo isolato ha dato luogo ad un'identificazione solo presuntiva (*low discrimination*) mentre lo stesso ceppo, saggiato con *multiplex* PCR è risultato essere *Campylobacter coli*.

CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

Confrontando i risultati ottenuti, per quanto riguarda la CMT, possiamo ritenere i valori ottenuti in linea con quanto già rilevato da studi precedenti (2, 7, 8, 9) e constatare che il valore di CMT medio ottenuto dall'analisi dei nostri campioni di latte è decisamente al di sotto del limite di legge (pari a 1.500.000/ml). Va tenuto presente che i campioni di latte sono stati esaminati pochissimo tempo dopo la mungitura, per cui le basse CMT riscontrate sono, verosimilmente, espressione della sola microflora intramammaria e dei limitati inquinamenti che sono intervenuti nelle fasi immediatamente

successive. Non possiamo stimare, al momento, quale ruolo abbiano giocato, da questo punto di vista, gli enzimi ad azione antimicrobica quali lisozima e lattoferrina. Confrontando, inoltre, i limiti di CMT riportati dal Regolamento (CE) n. 1662/2006 e i valori ottenuti nella nostra indagine, appare evidente come il valore riportato dalla normativa sia decisamente elevato e poco consono al latte d'asina. Appare più adeguato il limite di carica microbica totale a 30°C proposto da altri ricercatori, con criteri pari o inferiori a 70.000 ufc/ml (4). Gli stessi autori, inoltre, hanno proposto un intervallo di valori anche per il pH che era tra 6,80 e 7,2; i campioni di latte da noi analizzati rientrano nell'intervallo suggerito. L'indagine batteriologica riguardante *E. coli* nel latte d'asina è stata effettuata in precedenza da altri autori che hanno riscontrato cariche pari a $1,0 \cdot 10^2$ ufc/ml (8, 9), ma il nostro dovrebbe essere il primo isolamento di *E. coli* O157 potenzialmente patogeno da questa specifica matrice alimentare. La determinazione della carica di *Campylobacter* spp. è stata effettuata con il metodo ufficiale ISO e il metodo SimPlate® a confronto, perché quest'ultimo risulta di semplice interpretazione e a differenza del metodo ufficiale, porta a un risultato in 48 ore. Da un recente studio che ha confrontato le performance dei due metodi, il SimPlate® ha dimostrato di potere fornire valori di sensibilità, specificità e accuratezza migliori del metodo ISO (10). Il metodo SimPlate® è costituito da piastre a pozzetti, dotate di terreni disidratati e pronti all'uso. I dati da noi ottenuti, con il solo metodo SimPlate® indicano una bassissima contaminazione del latte, ma purtroppo il *Campylobacter* spp. è anche quest'anno segnalato come il principale agente di malattia zoonosica (11). Anche se recentemente uno studio evidenzia l'assenza di patogeni alimentari nel latte di asina (2), è a nostro avviso più che opportuno considerare la ricerca di *Campylobacter* spp. come uno dei parametri suggeriti (4) per valutare la qualità sanitaria di questo alimento. Tutto questo poiché secondo le statistiche ufficiali nell'anno 2009 diminuiscono del 17% i casi di epidemie di origine alimentare causate da *Salmonella* spp. mentre aumentano del 4% quelle da *Campylobacter* spp. (11). A margine, annotiamo che dalla bibliografia scientifica emergono segnalazioni di isolamenti di agenti microbici di malattia alimentare dal latte di asina come *Cronobacter sakazakii* (12) e ceppi di *Bacillus cereus* tossigeni (13). Alla luce dei risultati riteniamo che dovrebbe essere rivolta una maggiore attenzione alle condizioni igieniche legate al consumo di alimenti come quelli della filiera corta del latte crudo.

BIBLIOGRAFIA

1. Cosseddu A.M., De Santis E., Serraino A. (2008). Igiene e tecnologie del latte, del colostro e dei prodotti derivati. In: Colavita G. Igiene e tecnologie degli alimenti di origine animale. PVI, Milano, 203-257.
2. Pilla R., Daprà V., Zecconi A., Piccinini R. (2010). Hygienic and health characteristics of donkey's milk during a follow-up study. *Journal of Dairy Research*, 77 (4), 392-397.
3. Conte F., Rapisarda T., Belvedere G., Carpino S. (2010). Shelf life del latte d'asina: batteriologia e componente volatile. *Rivista dell'Associazione Italiana Veterinari Igienisti.*, 7.1, 25-29.
4. Conte F., Passantino A. (2009). Guidelines for physical, chemical and hygienic quality and safety control of donkey's milk. *Milchwissenschaft*, 64 (1), 86-88.
5. Karch H., Meyer T. (1989). Single primer pair for amplification segments of distinct Shiga-like-toxin genes by polymerase chain reaction. *Journal of clinical microbiology*, 12, 2751-2757.
6. Yamazaki-Matsune W., Taguchi M., Seto K., Kawahara R., Kawatsu K., Kumeda Y., Kitazato M., Nukina M., Misawa N., Tsukamoto T. (2007). Development of a multiplex PCR assay for identification of *Campylobacter coli*, *Campylobacter fetus*, *Campylobacter hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter lari* and *Campylobacter upsaliensis*. *Journal Medical Microbiology*, 56 (11), 1467-1473.
7. Ivankovic A., Ramljak J., Stulina I., Antunac N., Basic I., Kelava N., Konjacic M. (2009). Characteristics of the lactation, chemical composition and milk hygiene quality of the Littoral-dinaric ass. *Mlječkarstvo*, 59 (2), 107-113.
8. Conte F., Scatassa M.L., Monsù G., Minniti A., Calabrò A. (2003). Rilievi su composizione e qualità igienico-sanitaria del latte di asine allevate in Sicilia. *Abstract XIII Convegno A.I.V.I. Montesilvano (Pescara)*, 237-241.
9. Colavita G., Amadoro C., Maglieri C., Sorrentino E., Varisco G., Salimei E. (2010). Hygiene and health parameters of donkey's milk. *EAAP-61st Annual Meeting*, Heraklion, 44.
10. Bilei S., Bogdanova T., Flores Rodas E.M., Greco S., De Santis P., Cesarano D., Di Domenico I., Mussino M. (2010). Numerazione di *Campylobacter* su carcasse di broiler con metodo UNI EN ISO 10272-2:2006 a confronto con metodo SimPlate (Biocontrol system). *Atti: XII Congresso Nazionale*

- S.I.Di.L.V.* Genova 27-29 Ottobre 2010, 145-147.
11. EFSA (2011). The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2009. *EFSA Journal*, 9(3):2090, 1-378.
 12. Conte F., Passantino A. (2008). Isolation of *Enterobacter sakazakii* from ass'milk in Sicily: Case report, safety and legal issues. *Travel Medicine and Infectious Disease*, (6), 250-252.
 13. Scatassa M.L., Carrozzo A., Ducato B., Giosuè C., Miraglia V., Arcuri L. (2010). *Bacillus cereus*: isolamento in latte d'asina. *Abstract XX Convegno A.I.V.I. Qualità dell'ambiente e sicurezza alimentare*, Copanello di Staletti (CZ), 69.