

# BACILLUS CEREREUS: ISOLAMENTO IN LATTE D'ASINA

## BACILLUS CEREREUS: ISOLATION IN JENNET MILK

Scatassa M.L., Carrozzo A., Ducato B., Giosuè C., Miraglia V., Arcuri L.<sup>1</sup>, Mancuso I.  
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia "A. Mirri", Palermo; <sup>1</sup>AUSL 6, Palermo.

### SUMMARY

Jennet milk as human food is hypoallergenic for patients affected by Cow Milk Protein Allergy and multiple food allergies. For these pathologies, jennet milk represents the best alternative to other types of milk. Therefore, jennet milk consumers are very sensible to the effects of pathogens' contaminations, and several hygienic practices during the milk production need to be adopted. During regular monitoring in one Sicilian jennet farm, *Bacillus cereus* in the milk was detected. In 3 bulk milk samples (maximum concentration:  $1.2 \times 10^3$  ufc/ml), in 3 individual milk samples (10, 20 e 60 ufc/ml), in the milk filter (5 ufc/cm<sup>2</sup>), in the soil (maximum concentration:  $1.5 \times 10^3$  ufc/g), on the hands and the gloves of two milkers, on the animal hide (from 1 to 3 ufc/cm<sup>2</sup>). No spores were detected. A total of 8 *Bacillus cereus* s.s. strains were analyzed for diarrhoic toxin, and 6 strains producing enterotoxins resulted. The improvement of environmental and milking hygienic conditions reduced *Bacillus cereus* concentration.

### KEYWORDS

jennet milk, *Bacillus cereus*, diarrhoic toxin, food security.

### INTRODUZIONE

Negli ultimi anni, alla luce delle nuove disposizioni comunitarie in materia di sicurezza alimentare (Reg. CE 852/2004, 853/2004, 854/2004) e dei limiti microbiologici fissati per alcuni patogeni (Reg. CE 2073/2005 e 1441/2007), gli alimenti d'origine animale destinati al consumo umano sono sottoposti a controlli sempre più articolati lungo tutta la filiera produttiva, con una particolare attenzione rivolta agli alimenti destinati a categorie a rischio, come lattanti o soggetti sensibili. In quest'ultima tipologia di alimenti è possibile collocare il latte d'asina, oggetto del presente lavoro.

Studi condotti negli ultimi anni hanno infatti proposto il latte d'asina come valido alimento sostitutivo nella prima infanzia, soprattutto per quei soggetti affetti da allergie o intolleranze alle proteine del latte vaccino e/o da allergie multiple (1). Il latte d'asina, inoltre, viene apprezzato al pari del latte crudo, per le caratteristiche di naturalità e genuinità legate alla filiera produttiva "corta".

In risposta a questo mercato potenziale, l'allevamento dell'asino, che fino a qualche anno fa rischiava di estinguersi, ha trovato una

nuova vocazione, ma parallelamente sono emerse problematiche gestionali legate alla pratica della mungitura e, più in generale, alla produzione di alimenti destinati a individui particolarmente sensibili ed "esigenti" riguardo alle caratteristiche di salubrità del prodotto (2 - 3).

In questo contesto sono state attivate delle linee di ricerca sul latte d'asina e sul relativo processo produttivo volte a definirne i parametri nutrizionali, chimico-fisici ed igienico-sanitari e per evidenziare gli eventuali rischi e le relative azioni correttive.

Nel corso del 2009 sono state seguite le produzioni di latte d'asina presso l'Istituto Sperimentale Zootecnico per la Sicilia; l'allevamento era a conduzione semi-intensiva, con stabulazione libera in paddock e alimentazione mista con pascolo al prato e concentrati in stalla. La mungitura era effettuata manualmente una volta al giorno.

Il monitoraggio del latte prodotto da 15 asine Ragusane ha evidenziato la presenza del *B. cereus* s.s. (*sensu strictu*) (3).

Il genere *Bacillus* comprende microrganismi Gram positivi, catalasi positivi, aerobi/anaerobi facoltativi e sporigeni. La più recente tassonomia riconosce un *Bacillus cereus* group (denominato anche *Bacillus cereus* s.l. (*sensu*

lato)) al quale appartengono diversi bacilli, alcuni dei quali considerati agenti di tossinfezione alimentare; tra questi ritroviamo il cosiddetto *B. cereus s.s.* oggetto del presente lavoro. I bacilli appartenenti al genere *Bacillus cereus s.l.* sono ubiquitari, è possibile isolarli da suolo, piante, aria e acqua, possono facilmente contaminare gli alimenti e sono stati più volte ritrovati, sia sotto forma di spore sia in forma vegetativa, nel latte crudo e/o trattato termicamente (4, 5). Tali microrganismi crescono a temperature comprese tra 7-8°C e 50-55°C, con una temperatura ottimale di 37 ± 2°C; tuttavia, studi hanno ampiamente dimostrato che al di sotto di 10°C o in assenza di ossigeno non sono in grado di produrre la tossina *cereulide* responsabile della sintomatologia emetica (6).

La patogenicità del *B. cereus* nelle infezioni gastrointestinali è associata alla possibilità dello stesso di produrre tossine, con differenze considerevoli tra i diversi ceppi di *B. cereus* (7). Nei Paesi orientali è maggiormente diffusa la sindrome emetica, in Europa e nel Nord America è particolarmente diffusa la sindrome diarroica (8).

La tossina diarroica, termolabile, viene prodotta durante la fase di crescita esponenziale; la sintomatologia nell'uomo è dovuta all'ingestione di cellule/spore batteriche capaci, una volta giunte nell'intestino tenue, di produrre l'enterotossina. Non tutti i ceppi, però, hanno uguale capacità tossigena; è stato evidenziato infatti che ceppi di *B. cereus* psicrotrofi, una volta giunti nell'intestino, incontrano difficoltà nel moltiplicarsi a livelli adeguati e quindi non sono in grado di produrre tossina (6). Le manifestazioni cliniche compaiono tra le 6 e le 15 ore dopo l'ingestione degli alimenti contaminati e sono caratterizzate da diarrea acquosa, forti dolori addominali, che tuttavia tendono a risolversi nel giro delle 24 ore. Difficilmente questa sintomatologia è accompagnata da nausea e vomito (9).

La tossina emetica a differenza della diarroica è termostabile, in grado di resistere a temperature di 130°C per 90 minuti e a valori estremi di pH (2-11) ed è caratterizzata da una sintomatologia molto più acuta. I sintomi compaiono precocemente, dopo circa 6 ore, perché l'effetto emetico è dovuto all'ingestione della tossina già preformata nell'alimento (10). Nel corso del monitoraggio delle produzioni di latte d'asina, nel presente lavoro, è stata valutata la capacità dei ceppi di *B. cereus s.s.* di produrre tossina diarroica.

## MATERIALI E METODI

L'indagine è stata condotta nel periodo marzo -

giugno 2009. La ricerca e l'identificazione del *B. cereus* è stata eseguita su 3 campioni di latte di massa, 32 di latte individuale, 2 di terriccio misto a feci, 5 di acqua, 3 di alimenti somministrati alle asine (fieno, erba e mangime), e 42 tamponi ambientali (materiale a contatto con il latte, attrezzature, mani e guanti dei mungitori, pelo degli animali), prelevati nel corso di due sopralluoghi effettuati durante lo svolgimento dell'indagine epidemiologica.

Il conteggio dei microrganismi è stato effettuato seminando i campioni di latte per spatolamento su Agar Sangue (AS - OXOID) e su Mannitol Egg Yolk Polymyxin Agar (MYP - Biolife), terreni sui quali sono stati seminati anche i tamponi di superficie, dopo esser stati diluiti in SSP (Soluzione Salina Peptonata - OXOID).

I campioni di terriccio misto a feci sono stati analizzati secondo la metodica descritta da Christiansson *et al.* (1999): 25 g diluiti 1:10 in Acqua Peptonata sterile (OXOID), centrifugati a 300 rpm per 15', trasferiti in un cilindro sterile e, dopo due minuti di sedimentazione, prelevati 20 ml per il successivo isolamento su MYP. Parallelamente su tutti i campioni si è proceduto alla ricerca delle spore, sottoponendoli ad un trattamento termico ad 80°C per 10 minuti prima della semina (11).

L'identificazione presuntiva delle colonie è stata confermata mediante identificazione biochimico-enzimatica sia in macro che in micrometodo (API50 CHB-bioMerieux).

La capacità dei ceppi di *B. cereus s.s.* di produrre tossina diarroica è stata valutata utilizzando il test di agglutinazione passiva inversa al lattice in piastra microtitre (BCET-RPLA Toxin detection kit - OXOID), test specifico per la ricerca di tale enterotossina.

Il test è stato eseguito su 8 ceppi di *B. cereus s.s.* isolati da latte di massa e tamponi prelevati dai guanti degli operatori, dal pelo delle asine e dalla superficie esterna della mangiatoia.

Il ritrovamento di ceppi produttori di enterotossina ha indotto ad indagare a posteriori, sulla presenza di tossina preformata nelle diverse matrici. A tale scopo sono stati sottoposti alla ricerca dell'enterotossina campioni di latte congelato e tamponi ambientali.

Dopo gli interventi di sanificazione degli ambienti e delle attrezzature sono stati effettuati, con cadenza settimanale, 4 campionamenti di latte di massa al fine di valutare l'efficacia del trattamento.

## RISULTATI

I risultati hanno evidenziato la presenza di bacilli appartenenti al genere *B.cereus s.l.* in 3

campioni di latte di massa ( $9,3 \times 10^2$ ,  $1,2 \times 10^3$  e  $5,4 \times 10^1$  ufc/ml), su 3 campioni di latte individuale (10, 20 e 60 ufc/ml), sul filtro del latte ( $5 \text{ ufc/cm}^2$ ), sulle mani e, in seguito, sui guanti dei due operatori a fine mungitura, sul pelo degli animali (da 1 a 3 ufc/cm<sup>2</sup>), sul terriccio (valore massimo:  $1,5 \times 10^3$  ufc/g) e sulla superficie esterna della mangiatoia ( $1,5 \times 10^2$  ufc/cm<sup>2</sup>).

I campioni di acqua, fieno, erba e mangime sono risultati negativi. Non sono state evidenziate forme sporigene nelle matrici prese in esame.

Sono stati tipizzati 14 ceppi di *B. cereus* s.s., isolati da latte di massa, latte individuale, pelo degli animali, terriccio, superficie esterna della mangiatoia, mani e guanti degli operatori a fine mungitura e filtro del latte. Tre ceppi di *B. mycoides* sono stati isolati da un campione di latte massa, dal pelo di un'asina e dai guanti di un mungitore, matrici nelle quali era già stato isolato *B. cereus* s.s.

I campioni di latte di massa prelevati dopo la sanificazione degli ambienti ed il miglioramento delle condizioni igieniche di mungitura sono risultati negativi.

La ricerca della tossina diarroica ha dato esito positivo su 6/8 ceppi batterici testati (75%) isolati da latte di massa, tamponi eseguiti sul mantello delle asine, mani degli operatori e superficie esterna della mangiatoia.

Non è stata evidenziata la presenza di tossina preformata nei campioni analizzati: latte e tamponi ambientali congelati.

## CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

Dai risultati dell'indagine epidemiologica riportata precedentemente (3), in accordo con altri dati bibliografici (4, 11) e con le caratteristiche di ubiquitarità del *B. cereus*, è stato dimostrato che l'origine della contaminazione del latte era ambientale. Il terriccio, la polvere ed il pelo degli animali contaminati venendo a contatto con le mani dei mungitori determinavano una contaminazione secondaria del latte munto. L'assenza di *B. cereus* s.s. nei campioni di latte individuale prelevati successivamente con l'adozione di più rigorose misure igieniche, conferma l'origine ambientale della contaminazione del latte.

Dall'analisi dei risultati ottenuti, il miglioramento delle condizioni igieniche della fase di mungitura unitamente alla sensibilizzazione degli operatori ed una più approfondita e sistematica sanificazione degli ambienti ed attrezzature, ha consentito di risolvere la criticità evidenziata.

L'assenza di forme sporigene nell'ambiente e nel latte è difforme da quanto riportato da Altri

Autori (4,5,11), anche se tali studi sono relativi a condizioni climatiche notevolmente differenti (Nord Europa, Polonia, Canada ecc.) rispetto a quelle dell'area in cui è stata effettuata l'indagine.

Di notevole importanza, per le potenziali conseguenze sulla sicurezza dell'alimento, è la significativa presenza di ceppi tossigeni (tossina diarroica) tra i ceppi di *B. cereus* s.s. isolati, anche se la concentrazione massima di *B. cereus* ritrovata nel latte a fine mungitura non ha mai superato i valori di  $1,2 \times 10^3$  ufc/ml. L'assenza di enterotossina nel latte ha confermato la sporadicità della presenza di tossina preformata negli alimenti (6).

Nell'ambito del "pacchetto igiene", i valori soglia per *B. cereus* sono riportati nel Reg. CE 1441/2007, che prevede per gli alimenti in polvere per lattanti e per gli alimenti dietetici in polvere a fini medici speciali destinati ai bambini di età inferiore ai sei mesi, prelevati alla fine del processo di lavorazione, un piano di campionamento con i seguenti limiti:  $n=5$ ;  $c=1$ ;  $m=50$  ufc/g;  $M=500$  ufc/g. Il patogeno, se presente, deve essere in concentrazione inferiore a 50 ufc/g e solo in una delle 5 unità campionarie è accettabile un valore inferiore a 500 ufc/g. Le azioni correttive previste dal Reg. CE 1441/2007 consistono nel miglioramento delle condizioni igieniche durante la produzione, nella prevenzione di un eventuale ricontaminazione e nella selezione delle materie prime.

In conclusione si può affermare che il latte d'asina si pone all'attenzione del mondo scientifico come una nuova realtà produttiva idonea a soddisfare le esigenze nutritive di soggetti con allergie e/o intolleranze alimentari. Al tempo stesso le ricerche sul campo iniziano a mettere in evidenza problematiche sanitarie legate al processo produttivo in azienda ed alla commercializzazione, del tutto sovrapponibili, anche in una filiera tipicamente "corta" come quella del latte crudo, a quelle evidenziate nelle altre specie animali produttrici di latte alimentare.

Pertanto è indispensabile attuare, a partire dalla produzione primaria e per tutta la distribuzione, misure comportamentali ed igieniche in grado di prevenire, limitare e contrastare l'eventuale contaminazione e quindi l'alterazione dello stato sanitario del latte.

## BIBLIOGRAFIA

1. Carroccio F., Cavataio F., Montalto G., D'Amico D., Alabrese L., Iacono G. (2000) I parametri chimico-fisici del latte di asina Ragusana nel corso della lattazione.

- Clinical & Experimental Allergy* 30, 1597-1603.
2. Conte F. (2008) L'asino all'attenzione della comunità scientifica e del territorio - Chirotti Editori, Italia.
  3. Scatassa M.L., Arcuri F., Carrozzo A., Ducato B., Giosuè C., Lo Biundo G., Iannolino G., Arcuri L., Mancuso I. (2009) *Bacillus cereus*: isolamento in latte di asina - Nota preliminare. *Atti SISVET* 2009, 410-412
  4. Bartoszewicz M., Hansen B.M., Swiecicka I. (2008) The members of the *Bacillus cereus* group are commonly present contaminant of fresh and heat-treated milk. *Food Microbiology*, 25, 588-596.
  5. Lin S., Schraft H., Odumeru J.A., Griffiths (1998) Identification of contamination sources of *Bacillus cereus* in pasteurized milk. *Internattional Journal of Food Microbiology* 43: 159-171.
  6. Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on *Bacillus cereus* and other *Bacillus spp* in foodstuff. *The EFSA Journal* (2005) 175, 1-48.
  7. Kotiranta A., Lounatmaa K., Haapasalo M. (2000) Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. *Microbes and Infection*, 189-198.
  8. McKillip J.L. (2000) Prevalence and expression of enterotoxins in *Bacillus cereus* and other *Bacillus spp.*, a literature review. *Antonie van Leeuwenhoek. Kluwer Academic Publisher*. 77:393-399
  9. Manzano M. (2006) *Igiene Alimenti / Disinfezzazione & Igiene Ambientale*, 7-10.
  10. Jay M. J., Lossner M.J., Golden D.A. (2005) *Microbiologia degli alimenti*, 628-630, Springer science.
  11. Christiansson A., Bertilsson J., Svensson B. (1999). *Bacillus cereus* spores in raw milk: Factors affecting the contamination of milk during the grazing period. *Journal of Dairy Science* 82:2, 305-314.