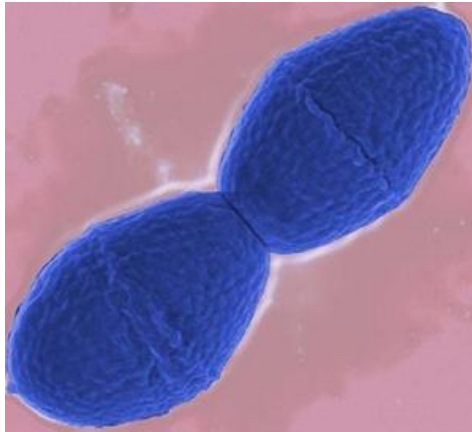


## **CORSO MICROBIOLOGIA ALIMENTARE: ENTEROCOCCHI**

### **1.0 GENERALITÀ**

Gli enterococchi sono batteri Gram positivi, catalasi negativi, ossidasi negativi, non sporigeni e anaerobi facoltativi; all'osservazione al microscopio ottico si presentano come cocchi isolati, a coppia o più frequentemente a catena, e alcuni sono mobili.



**Fig 1:** *Enterococcus faecalis*

Il genere comprende circa 17 specie determinate sulla base delle sequenze della subunità 16S dell'rRNA. Le specie appartenenti al genere *Enterococcus*, che vengono definite in base alla capacità di ridurre il 2,3,5-trifeniltetrazolio cloruro a formazano e di idrolizzare l'esculina a 44°C, soddisfano specifici requisiti: crescita da 10°C a 45°C, resistenza a 60°C per 30 minuti, crescita a pH 9,6 e al 6,5% di NaCl. Gruppi diversi sono stati individuati in questo genere e comprendono le specie *E. faecium*, *E. durans*, *E. hirae*, *E. mundtii* (primo gruppo); *E. avium*, *E. pseudoavium*, *E. raffinosus* e *E. malodoratus* (secondo gruppo); *E. casseliflavus* e *E. gallinarum* (terzo gruppo). *E. faecalis*, *E. cecorum*, *E. colombae* e *E. saccharolyticus*, che hanno tra loro una bassa similarità genotipica, sono stati inseriti in un quarto gruppo.

Precedentemente inseriti nel gruppo D degli streptococchi, attualmente sono considerati un genere a parte; inoltre, grazie alla capacità di fermentare il lattosio gli enterococchi appartengono al gruppo dei batteri lattici (LAB).

L'habitat predominante di questi batteri è il tratto gastro-intestinale dell'uomo e degli animali, ma l'elevata tolleranza alle condizioni ambientali avverse permette loro di colonizzare varie nicchie ecologiche.

## 2.0 PRESENZA DI ENTEROCOCCHI NEGLI ALIMENTI

Gli enterococchi, essendo residenti nel tratto gastro-intestinale animale e umano, vengono espulsi con le feci che contaminano le matrici ambientali; da qui nasce il ruolo di questi microrganismi come indicatori di contaminazione fecale in alimenti ed acque.

La presenza di enterococchi negli alimenti è indice di scarsa sanificazione dell'ambiente e degli utensili, e di ricontaminazione post-processo per prodotti che hanno subito trattamenti tecnologici inattivanti i microrganismi (calore, essiccazione, congelamento prolungato).

Species	Human	Cattle	Pig	Fowl
<i>E. faecalis</i>	++	(+)	+	++
<i>E. faecium</i>	++	++	+	++
<i>E. durans/hirae</i>	(+)	-	(+)	(+)
<i>E. gallinarum</i>	(+)	-	-	(+)
<i>E. casseliflavus</i>	(+)	-	-	-
<i>E. cecorum/columbae</i>	-	+	+	++

Fig. 2: Presenza di enterococchi nel tratto gastro-intestinale di alcuni animali

La contaminazione di un prodotto alimentare da parte degli enterococchi può avvenire:

- per contatto con acqua contaminata da feci umane o animali (ortaggi lavati o irrigati con acqua contaminata);
- per manipolazione da parte di operatori con scarsa igiene personale;
- per contatto con insetti che sono veicolo di microbi; ne sono esempio le mosche.
- per utilizzo di utensili e attrezzature mal sanificati. Se ad esempio, un prodotto cotto viene affettato su un tagliere in cui prima è stato manipolato un alimento crudo, il cibo cotto si contaminerà se il tagliere non è stato correttamente sanificato.

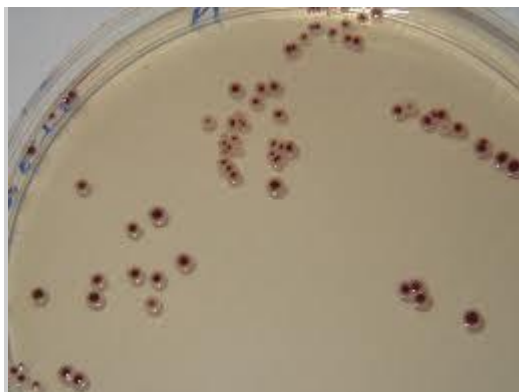


Fig. 3: Enterococchi in terreno Slanetz Bartley Medium

Gli enterococchi, insieme ad *E. coli*, sono microrganismi ricercati nelle acque, che per essere considerate potabili in base al Decreto Legislativo 31/2001, e successive modifiche, non devono presentare i batteri sopra citati (0/100ml). E' importante sottolineare che per essere potabile

l'acqua non deve soddisfare solo criteri microbiologici, ma anche chimici; i parametri considerati possono essere visionati nel Decreto sopra riportato.

Il ruolo degli enterococchi come indicatori di contaminazione fecale negli alimenti è dibattuto, poiché tali microrganismi sono spesso utilizzati nell'industria alimentare per la produzione di alimenti fermentati in quanto contribuiscono al loro sapore; quindi la loro presenza non è detto sia indice di contaminazione. Ceppi di *Enterococcus spp.* sono impiegati nella fermentazione biologica di carni, che in seguito sono salate e affumicate ma tali procedure non comportano la morte di questi microrganismi che invece, essendo resistenti ad alte concentrazioni di sale e ad un ampio range di temperature, possono moltiplicarsi e causare il deterioramento di questi alimenti.

Anche alcuni prodotti lattiero-caseari sono sottoposti ad un processo di fermentazione, e la temperatura di pastorizzazione non sempre è in grado di eliminare gli enterococchi, che possono tollerare tali temperature.

Gli enterococchi sono il gruppo più controverso dei batteri lattici, in quanto negli alimenti svolgono una funzione sia positiva che negativa. Ad esempio, contribuiscono allo sviluppo delle proprietà organolettiche dei prodotti fermentati, principalmente dei formaggi, grazie a reazioni che avvengono durante il processo di fermentazione. Inoltre, svolgono un ruolo benefico grazie alla produzione di batteriocine (enterocine), che inibiscono la crescita di patogeni come *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum* e *Clostridium perfringens*. Le batteriocine sono piccoli peptidi che formano pori nella membrana cellulare delle cellule bersaglio e permettono la fuoriuscita di molecole intracellulari. Le enterocine sono attive principalmente contro *Listeria spp.*, e ciò può essere spiegato dalla vicinanza filogenetica tra enterococchi e listerie.

*E. faecalis* produce particolari batteriocine, aventi attività emolitica oltre che batteriocinetica, definite citolisine. Tali peptidi, però, colpiscono non solo le cellule batteriche, ma anche le cellule eucariote.

Tali considerazioni positive hanno permesso l'introduzione di alcune specie di enterococchi in colture starter per formaggi ed il loro utilizzo come probiotici per animali e uomini. In Danimarca è stato messo in commercio un latte probiotico, chiamato Gaio, contenente un ceppo di *E. faecium*, e preparati probiotici sono utilizzati in zootecnia per prevenire o trattare malattie enteriche. Inoltre, è stato studiato nel dettaglio *E. faecium SF68*, impiegato per il trattamento della diarrea umana in alternativa al trattamento antibiotico classico. L'uso degli enterococchi come probiotici desta molto interesse, in quanto rappresenta un'alternativa all'uso di antibiotici negli allevamenti che quindi ostacolerebbe lo sviluppo di batteri antibiotico resistenti. Tuttavia, sono stati trovati enterococchi antibiotico resistenti in ceppi utilizzati come probiotici.

Ad oggi non è del tutto chiaro il ruolo degli enterococchi negli alimenti. I ricercatori, infatti, sono divisi in due linee di pensiero: pro e contro enterococchi nelle tecnologie alimentari.

La presenza di enterococchi in alimenti a base di carne non è, però, sempre positiva. Infatti, *E. faecium* e *E. faecalis* sono implicati nel deterioramento non solo di carni crude, ma anche di prodotti trasformati sottoposti a riscaldamento come il prosciutto in scatola.

### **3.0 TOSSINFEZIONI CAUSATE DALLA PRODUZIONE DI AMMINE BIOGENE**

In molti alimenti fermentati come insaccati, formaggi, olive e prodotti ittici sono stati riscontrati elevati livelli di ammine biogene, composti organici responsabili di tossinfezioni alimentari da enterococchi. L'ingestione di queste molecole determina una serie di sintomi, che includono mal di testa, vomito, aumento della pressione sanguigna e persino allergia.

Le ammine biogene si formano a partire da amminoacidi, che vengono decarbossilati da specifici enzimi. I processi di maturazione che hanno luogo nei prodotti fermentati favoriscono l'accumulo di tali molecole; ne sono esempio cadaverina, putresceina e tiramina.

I fattori che influenzano la produzione di ammine biogene riguardano le caratteristiche del prodotto (pH- acqua libera- sostanze nutritive) e la fase di crescita in cui si trovano gli enterococchi.

### **4.0 ANTIBIOTICO RESISTENZA E ALIMENTI**

Il livello estremamente elevato di resistenza agli antibiotici osservato negli enterococchi e la loro presenza negli alimenti crudi sono due elementi che contribuiscono al frequente recupero di enterococchi antibiotico resistenti (ARE) in alimenti fermentati. Sono stati trovati nei prodotti a base di carne, nei prodotti lattiero-caseari e persino all'interno di ceppi proposti come probiotici. Recentemente, sono stati isolati da formaggi francesi a latte crudo enterococchi resistenti alla kanamicina, alla gentamicina e alla vancomicina. Altri studi confermano la presenza di ARE nelle carni crude e fermentate. La presenza di enterococchi antibiotico resistenti nei cibi pone la questione, tutt'oggi aperta, riguardo agli alimenti come loro possibile veicolo di trasmissione all'uomo.

La pressione selettiva esercitata dall'uso di antibiotici come promotori di crescita negli allevamenti, come l'avoparcina (glicopeptide simile alla vancomicina), sembra aver creato grandi serbatoi di antibiotico resistenza, trasferibili nei diversi ecosistemi.

L'uso di avoparcina è stato vietato in Danimarca nel 1995 ed in quasi tutto il resto d'Europa nel 1997. Studi in Danimarca hanno dimostrato che il divieto d'uso di avoparcina negli animali ha portato a una riduzione di enterococchi vancomicina resistenti nel pollame e nei suini; andamento analogo si è verificato in Italia.

Altri promotori di crescita sono stati recentemente banditi dall'Unione europea (1998), tra cui bacitracina, tilosina, spiramicina e virginiamicina. Circa dieci anni fa è stato scoperto il primo farmaco efficace nei confronti di infezioni causate da enterococchi antibiotico resistenti, il Synercid, composto da due streptogamine, la quinupristina e la dalfopristina. Per decenni la virginiamicina, che appartiene al gruppo delle streptogamine, è stata usata come promotore di crescita nell'Unione europea e negli Stati Uniti, principalmente per gli allevamenti di pollame; ciò ha comportato l'acquisizione della resistenza degli enterococchi al Synercid.

E' di fondamentale importanza evitare di sottoporre gli animali a cure con farmaci che hanno struttura molecolare simile a quelli utilizzati nella terapia umana; il rischio è quello di dover creare nuovi chemioterapici per curare infezioni batteriche causate da microrganismo resistenti agli antibiotici di solito utilizzati. Gli enterococchi, insieme agli stafilococchi, sono i batteri che maggiormente causano infezioni nosocomiali, ovvero acquisite negli ambienti ospedalieri; ceppi di

enterococchi antibiotico resistenti creano grandi problematiche, poichè essendo patogeni opportunisti provocano infezioni in soggetti debilitati.

## 5.0 BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA

1. Istituto superiore di sanità. [www.iss.it](http://www.iss.it)
2. Ministero della salute [www.ministerosalute.it](http://www.ministerosalute.it)
3. Microbiologia dei formaggi. Regione Piemonte –settore vigilanza e controllo degli alimenti di origine animali. Gianfranco Corgiat Loia  
[www.regione.piemonte.it/sanita/sanpub/vigilanza/dwd/presentazioni/formaggi/microbfo.pdf](http://www.regione.piemonte.it/sanita/sanpub/vigilanza/dwd/presentazioni/formaggi/microbfo.pdf)
4. Microbiologia degli alimenti [www.federica.unina.it/agraria/microbiologia-degli-alimenti-/i-microrganismi-indicatori-della-qualità-e-sicurezza-microbiologica-degli-alimenti/](http://www.federica.unina.it/agraria/microbiologia-degli-alimenti-/i-microrganismi-indicatori-della-qualità-e-sicurezza-microbiologica-degli-alimenti/)
5. International Journal of Food Microbiology : Safety assessment of dairy microorganisms: The Enterococcus genus. Volume 126, Issue 3, 1 September 2008, Pages 291-301  
[www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)
6. FEMS Microbiology Reviews : Enterococci from foods. Volume 26, Issue 2, June 2002, Pages 163-171 [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)
7. International Journal of Food Microbiology : The role and application of enterococci in food and health. Volume 26, Issue 2, June 2002, Pages 163-171 [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)
8. International Journal of Food Microbiology : Enterococci at the crossroads of food safety?. Volume 47, Issues 1-2, 1 March 1999, Pages 1-24 [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)
9. International Journal of Food Microbiology : Functionalty of enterococci in meat products. Volume 88, Issues 2-3, 1 December 2003, Pages 223-233 [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)
10. Microbes and Infection : Antibiotic-resistant enterococci: the mechanisms and dynamics of drug introduction and resistance. Volume 4, Issue 2, February 2002, Pages 215-224  
[www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)
11. International Journal of Food Microbiology : Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastro-intestinal tract. Volume 88, Issues 2-3, 1 December 2003, Pages 123-131 [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)
12. WHO. Use of antimicrobial in food-producing animals. [www.who.int/emc/malattie/zoo/who-global-principles.html](http://www.who.int/emc/malattie/zoo/who-global-principles.html)
13. Use of Antimicrobial Grow Promoters in food animals and Enterococcus faecium resistance to therapeutic antimicrobial drugs in Europe. 1999  
[www.cdc.gov/ncidod/EID/vol5no3/pdf/wegener.pdf](http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol5no3/pdf/wegener.pdf)
14. WHO. Beyond antimicrobial growth promoters in food animal production. 2002  
[www.who.int/entity/salmsurv/links/en/FoulumWorkingPapers.pdf](http://www.who.int/entity/salmsurv/links/en/FoulumWorkingPapers.pdf)
15. <http://www.camera.it/parlam/leggi/deleghe/01031dl.htm>