

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ  
ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΥΓΙΕΙΝΗ:  
ΠΟΙΟΤΗΤΑ-ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΥΔΑΤΩΝ & ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ**

**ΘΕΜΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑΣ  
ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΤΟΙΜΩΝ ΠΡΟΣ ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗ  
ΣΑΛΑΤΩΝ (ΤΖΑΤΖΙΚΙ, ΤΥΡΟΣΑΛΑΤΑ, ΟΥΓΓΑΡΕΖΑ) ΑΠΟ  
ΤΑΧΥΦΑΓΕΙΑ ΣΤΙΣ ΠΟΛΕΙΣ ΤΗΣ ΛΑΡΙΣΑΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΚΑΡΔΙΤΣΑΣ**

**ΤΖΩΤΖΗΣ ΒΑΣΙΛΕΙΟΥ ΙΩΑΝΝΗΣ  
ΤΕΧΝΟΛΟΓΟΣ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ  
ΑΛΕΞΑΝΔΡΕΙΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ**

**ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2016**

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ  
ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΥΓΙΕΙΝΗ:  
ΠΟΙΟΤΗΤΑ-ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΥΔΑΤΩΝ & ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ**

**ΘΕΜΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑΣ  
ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΤΟΙΜΩΝ ΠΡΟΣ ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗ  
ΣΑΛΑΤΩΝ (ΤΖΑΤΖΙΚΙ, ΤΥΡΟΣΑΛΑΤΑ, ΟΥΓΓΑΡΕΖΑ) ΑΠΟ  
ΤΑΧΥΦΑΓΕΙΑ ΣΤΙΣ ΠΟΛΕΙΣ ΤΗΣ ΛΑΡΙΣΑΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΚΑΡΔΙΤΣΑΣ**

**ΤΖΩΤΖΗΣ ΒΑΣΙΛΕΙΟΥ ΙΩΑΝΝΗΣ  
ΤΕΧΝΟΛΟΓΟΣ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ  
ΑΛΕΞΑΝΔΡΕΙΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ**

**ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2016**

## **ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ**

**Πεξαρά Ανδρεάνα** (Επίκουρη Καθηγήτρια Υγιεινής Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης,  
Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα Κτηνιατρικής, ΠΘ, Επιβλέπουσα)

## **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**Πεξαρά Ανδρεάνα** (Επίκουρη Καθηγήτρια Υγιεινής Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης,  
Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα Κτηνιατρικής, ΠΘ, Μέλος Τριμελούς  
Επιτροπής)

**Γκόβαρης Αλέξανδρος** (Καθηγητής Υγιεινής Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης, Σχολή  
Επιστημών Υγείας, Τμήμα Κτηνιατρικής, ΠΘ, Μέλος Τριμελούς Επιτροπής)

**Σολωμάκος Νικόλαος** (Επίκουρος Καθηγητής Υγιεινής Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης,  
Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα Κτηνιατρικής, ΠΘ, Μέλος Τριμελούς  
Επιτροπής)

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

### Σκοπός της μελέτης

Ο σκοπός της μελέτης ήταν ο μικροβιολογικός έλεγχος έτοιμων προς κατανάλωση σαλατών (τζατζίκι, τυροσαλάτα, ουγγαρέζα) που πωλούνταν σε ταχυφαγεία στις πόλεις της Λάρισας και της Καρδίτσας. Η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε τους μήνες Αύγουστο και Σεπτέμβριο που οι υψηλές θερμοκρασίες του περιβάλλοντος σε συνδυασμό με λανθασμένους χειρισμούς των σαλατών στους χώρους των ταχυφαγείων, πιθανώς να επηρεάζουν την μικροβιολογική ποιότητα των σαλατών.

### Υλικά & Μέθοδοι

Σε χρονικό διάστημα 2 μηνών (Αύγουστος-Σεπτέμβριος 2015) εξετάστηκαν 90 δείγματα έτοιμων προς κατανάλωση σαλατών, 30 δείγματα τυροσαλάτας, 30 δείγματα τζατζικιού και 30 δείγματα ουγγαρέζας, τα οποία πωλούνται σε ταχυφαγεία στις πόλεις της Λάρισας και της Καρδίτσας. Το κάθε δείγμα (βάρους περίπου 100 γραμμαρίων) τοποθετούνταν από τους πωλητές των ταχυφαγείων σε πλαστικά δοχεία, τα οποία προορίζονται για τον σκοπό αυτό και μεταφέρονταν σε ισοθερμικό δοχείο υπό συνθήκες ψύξης (4°C) στο εργαστήριο Υγιεινής και Επιδημιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Στα δείγματα πραγματοποιήθηκε μικροβιολογική ανάλυση για να προσδιοριστούν οι πληθυσμοί της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας (OMX), των *Enterobacteriaceae*, του *Staphylococcus aureus*, ανίχνευση και καταμέτρηση *Listeria monocytogenes* και η ανίχνευση *Salmonella* spp. Στα δείγματα έγινε επίσης μέτρηση της τιμής του pH.

### Αποτελέσματα

Τα αποτελέσματα της μικροβιολογικής εξέτασης των δειγμάτων ουγγαρέζας έδειξαν ότι είχαν πληθυσμούς OMX  $6,04 \pm 1,2 \log \text{cfu/g}$ . Από τα 90 δείγματα που εξετάστηκαν συνολικά, τα 48 (53,33%) είχαν πληθυσμούς εντεροβακτηρίων  $<10^2 \text{cfu/g}$  και τα 42 (46,67%)  $>10^2 \text{cfu/g}$ . Από τα 42 δείγματα στα οποία ανιχνεύθηκαν πληθυσμοί εντεροβακτηρίων  $>10^2 \text{cfu/g}$  τα 25 ήταν δείγματα τυροσαλάτας (59,52%), τα 9 δείγματα σαλάτας ουγγαρέζας (21,43%) και τα 8 δείγματα τζατζικιού (19,05%). Από τα 90 δείγματα σαλατών που εξετάστηκαν, στα 4 δείγματα τυροσαλάτας (4,44%) απομονώθηκε *S. aureus*. Οι πληθυσμοί του παθογόνου ήταν μικρότεροι από  $10^5 \text{cfu/g}$ . Σε κανένα από τα 90 δείγματα σαλατών έτοιμων προς κατανάλωση που εξετάστηκαν δεν καταγράφηκε παρουσία της *Salmonella* spp. Από το σύνολο των δειγμάτων που εξετάστηκαν, 1 δείγμα τυροσαλάτας (1,11%) βρέθηκε θετικό στην παρουσία της *L. monocytogenes*. Στο δείγμα αυτό, οι πληθυσμοί της *L. monocytogenes* ήταν χαμηλότεροι από το κριτήριο ασφαλείας ( $100 \text{cfu/g}$ ) που ορίζεται από τη νομοθεσία για τα έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα.

**Σημαντικοί όροι:** Τυροσαλάτα, Τζατζίκι, Ουγγαρέζα, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacteriaceae*.

# Study of the microbiological status of ready to eat deli salads (tzatziki, cheesesalad, hungarian salad) from fast food establishments in the cities of Larissa and Karditsa

## ABSTRACT

### Aim

The aim of this work was to study the microbiological status of ready to eat deli salads (tzatziki, cheesesalad, hungarian salad) sold by fast food establishments in the cities of Larissa and Karditsa.

### Materials and Methods

90 samples of 'ready to eat' salads (30 samples of tzatziki-yogurt based, 30 samples of cheesesalad-cheese based, and 30 samples of hungarian salad- mayonnaise based) were collected during a two months period (August-September 2015), when high environmental temperatures are traditionally recorded, from fast food establishments in the cities of Larissa and Karditsa. Sampled salads were transported under refrigeration to the laboratory and subsequently subjected to bacteriological analyses. Samples were analysed for Total Viable Counts (TVC), *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes*.

### Results

Results of this microbiological analysis of the hungarian salad samples showed that TVC was  $6.04 \pm 1.2$  log cfu/g. *Enterobacteriaceae* counts were  $>10^2$  cfu/g in 42 (46,67%) of 90 samples analysed. Among the 42 samples that *Enterobacteriaceae* counts were  $>10^2$  cfu/g, 25 were cheesesalad samples (59.52%), 9 were hungaria salad samples (21.43%) and 8 tzatziki samples (19.05%). *S. aureus* was isolated from 4 samples (4.44%) out of 90 samples. All *S. aureus* positive samples were cheesesalad samples and the counts of pathogen were  $<10^5$  cfu/g. *Salmonella* spp was not detected in any of the 90 salad samples. *L. monocytogenes* was detected in one cheesesalad sample (1.11%), but the positive sample did not failed to comply with the 100 cfu/g limit set out in EU Regulation 2073/2005.

**Keywords:** *tzatziki, cheesesalad, hugarian salad, Listeria monocytogenes, Salmonella* spp, *Staphylococcus aureus, Enterobacteriaceae*.

## ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Ευχαριστίες	i
Κατάσταση Πινάκων	iii
Κατάσταση Διαγραμμάτων	iv
Εισαγωγή	v
Σκοπός διπλωματικής εργασίας	vii
<b><u>ΜΕΡΟΣ 1<sup>ο</sup>:</u></b>	<b>1</b>
<b><u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1</u></b>	
1.1 Επιδημιολογία Τροφιμογενών λοιμώξεων	1
1.2 Ανάπτυξη μικροοργανισμών στα τρόφιμα	3
1.2.1 Ρυθμός και Καμπύλη ανάπτυξης των μικροοργανισμών	3
1.2.2 Παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών στα τρόφιμα	4
1.2.2.1 Ενδογενείς παράγοντες ανάπτυξης μικροοργανισμών	5
1.2.2.2 Εξωγενείς παράγοντες	10
1.3 Μικροοργανισμοί δείκτες της υγιεινής και ασφάλειας των τροφίμων	13
1.3.1 Μικροβιολογικά κριτήρια ασφάλειας και ποιότητας των τροφίμων	13
1.3.2 Μικροβιολογικά όρια	14
1.3.3 Μικροοργανισμοί δείκτες της υγιεινής και ασφάλειας των τροφίμων	14
1.3.3.1 Ολική Μικροβιακή Χλωρίδα και Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα	15
1.3.3.2 Εντεροβακτηριακά	16
1.3.3.3 Κολοβακτηριοειδή/ <i>E. coli</i>	17
1.3.3.4 Εντερόκοκκοι	17
<b><u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 :</u></b> Τροφιμογενή Παθογόνα Βακτήρια	<b>19</b>
2.1 <i>Salmonellaspp</i>	19

<b>2.1.1 Ταξινόμηση και Ονοματολογία</b>	<b>19</b>
<b>2.1.2 Κατανομή</b>	<b>20</b>
<b>2.1.3 Συνθήκες ανάπτυξης</b>	<b>20</b>
<b>2.1.4 Επιβίωση</b>	<b>21</b>
<b>2.1.5 Ύποπτα τρόφιμα – Τρόπος μετάδοσης</b>	<b>21</b>
<b>2.1.6 Επιδημιολογικά στοιχεία σαλμονελλέσεων στην Ελλάδα</b>	<b>23</b>
<b>2.1.7 Κλινικές Εκδηλώσεις</b>	<b>23</b>
<b>2.1.8 Πρόληψη</b>	<b>24</b>
<b>2.1.9 Νομοθεσία</b>	<b>25</b>
<b>2.2 <i>Stahylococcus aureus</i></b>	<b>25</b>
<b>2.2.1 Χαρακτηριστικά του βακτηρίου</b>	<b>26</b>
<b>2.2.2 Συνθήκες ανάπτυξης</b>	<b>26</b>
<b>2.2.3 Επιβίωση</b>	<b>26</b>
<b>2.2.4 Κατανομή</b>	<b>27</b>
<b>2.2.5 Σταφυλοκοκκικές τοξίνες</b>	<b>27</b>
<b>2.2.6 Υπεύθυνα τρόφιμα – Τρόπος μετάδοσης</b>	<b>28</b>
<b>2.2.7 Προκαλούμενη νόσος-Συμπτώματα</b>	<b>30</b>
<b>2.2.8 Πρόληψη</b>	<b>30</b>
<b>2.2.9 Νομοθεσία</b>	<b>31</b>
<b>2.3 <i>Listeria monocytogenes</i></b>	<b>31</b>
<b>2.3.1 Κατανομή</b>	<b>32</b>
<b>2.3.2 Ανάπτυξη</b>	<b>32</b>
<b>2.3.3 Επιβίωση</b>	<b>33</b>
<b>2.3.4 Επιδημιολογικά στοιχεία Λιστερίωσης στην Ελλάδα</b>	<b>33</b>
<b>2.3.5 Τρόπος μετάδοσης – Κλινικές εκδηλώσεις</b>	<b>34</b>

2.3.6 Υπεύθυνα τρόφιμα	34
2.3.7 Πρόληψη	35
2.3.8 Νομοθεσία	36
<b><u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3:</u></b>	<b>38</b>
<b>Σαλάτες έτοιμες προς κατανάλωση (Μαγιονέζα-Σάλτσες και Παρεμφερή Προϊόντα, άρθρο 41, ΚΤΠ, 2014)</b>	
3.1 Τζατζίκι	38
3.1.1 Γιαούρτη	38
3.1.2 Μικροβιακή χλωρίδα και Ανάπτυξη μικροοργανισμών	40
3.2 Τυροσαλάτα – Τυροκαυτερή	40
3.2.1 Τυρί Φέτα	40
3.2.2 Μικροβιακή χλωρίδα και Ανάπτυξη μικροοργανισμών στο τυρί	43
3.3 Ουγγαρέζα - Μαγιονέζα	44
3.3.1 Μικροβιακή Χλωρίδα και Ανάπτυξη μικροοργανισμών στη μαγιονέζα	44
3.4 Μικροβιολογική ποιότητα των έτοιμων προς κατανάλωση σαλατών	45
<b><u>ΜΕΡΟΣ 2°</u></b>	<b>47</b>
<b><u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: Υλικά και Μέθοδοι</u></b>	
4.1 Συλλογή Δειγμάτων	47
4.2 Μικροβιολογική ανάλυση	47
4.2.1 Καταμέτρηση των <i>Enterobacteriaceae</i> σύμφωνα με τη μέθοδο BS 5763 Part:10 1993, ISO 7402:1993	47
4.2.2 Καταμέτρηση της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας (OMX) σύμφωνα με τη μέθοδο ISO 4833	48
4.2.3 Καταμέτρηση της <i>Listeriamonocytogenes</i> σύμφωνα με τη μέθοδο ISO 11290-2	48
4.2.4 Ανίχνευση της <i>Salmonellaspp</i> σύμφωνα με τη μέθοδο ISO 6579:2002	48
4.2.5 Καταμέτρηση του <i>Staphylococcus aureus</i> σύμφωνα με τη μέθοδο ISO 6889, 1:1999/A1:2004	49
4.3 Ταυτοποίηση μικροοργανισμών	49



<b>4.4 Μέτρηση pH</b>	<b>54</b>
<b>4.5 Στατιστική επεξεργασία</b>	<b>54</b>
<b><u>Κεφάλαιο 5: Αποτελέσματα - Συζήτηση</u></b>	<b>55</b>
<b>5.1 Μέτρηση της τιμής pH</b>	<b>55</b>
<b>5.2 Μικροβιολογική εξέταση</b>	<b>55</b>
<b>5.2.1 Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (Ο.Μ.Χ.)</b>	<b>55</b>
<b>5.2.2 <i>Enterobacteriaceae</i></b>	<b>56</b>
<b>5.2.3 <i>S. aureus</i></b>	<b>57</b>
<b>5.2.4 <i>Salmonella</i> spp.</b>	<b>58</b>
<b>5.2.5 <i>Listeria monocytogenes</i></b>	<b>59</b>
<b>Συμπεράσματα - Προτάσεις</b>	<b>61</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	<b>62</b>

## Ευχαριστίες

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες στην επιβλέπουσα καθηγήτρια, κα Ανδρεάνα Πεξαρά, Επίκουρη Καθηγήτρια Υγιεινής Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης στη Σχολή Επιστημών Υγείας του Τμήματος Κτηνιατρικής για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με το συγκεκριμένο θέμα.

Θερμές ευχαριστίες στον κο Χατζηχριστοδούλου Χρήστο, Καθηγητή της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για την παροχή των υποδομών για την εκτέλεση του πειραματικού μέρους.

Στο προσωπικό του Εργαστηρίου Υγιεινής και Επιδημιολογίας του Τμήματος της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για τη συνεργασία και την καθοδήγηση και υποστήριξή τους κατά την εκτέλεση του πειραματικού μέρους.

Θερμές ευχαριστίες στον κο Γκόβαρη Αλέξανδρο, Καθηγητή Υγιεινής Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης, Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα Κτηνιατρικής, ΠΘ, Μέλος Τριμελούς Επιτροπής), στην κα Πεξαρά Ανδρεάνα, Επίκουρη Καθηγήτρια του Τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας καθώς και στον κο Σολωμάκο Νικόλαο, Επίκουρο Καθηγητή του Τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για την πολύτιμη βοήθειά τους και τις γνώσεις που μου παρείχαν, καθώς στάθηκαν σημαντικοί αρωγοί στην προσπάθειά μου και με υποστήριξαν σε κάθε φάση της πορείας μου.

Θερμά ευχαριστώ στους γονείς μου για τη στήριξη, την υπομονή, τη βοήθεια και την

αμέριστη συμπαράσταση που μου παρείχαν για την ολοκλήρωση του μεταπτυχιακού προγράμματος.

## Κατάσταση Πινάκων

- Πίνακας 1.** Κριτήρια για τη *L. monocytogenes* ανάλογα με το τρόφιμο, όπως ορίζονται στον Κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 2073/2005 (και στον Κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 1441/2007 που τον τροποποιεί).....**37**
- Πίνακας 2.** Πληθυσμοί των *Enterobacteriaceae* σε σαλάτες έτοιμες προς κατανάλωση από ταχυφαγεία στις πόλεις της Λάρισας και της Καρδίτσας.....**57**
- Πίνακας 3.** Πληθυσμοί του *Staphylococcus aureus* σε σαλάτες έτοιμες προς κατανάλωση από ταχυφαγεία στις πόλεις της Λάρισας και της Καρδίτσας.....**58**
- Πίνακας 4.** Παρουσία της *Salmonella* spp. σε σαλάτες έτοιμες προς κατανάλωση από ταχυφαγεία στις πόλεις της Λάρισας και της Καρδίτσας.....**59**
- Πίνακας 5.** Παρουσία της *Listeria monocytogenes* σε σαλάτες έτοιμες προς κατανάλωση από ταχυφαγεία στις πόλεις της Λάρισας και της Καρδίτσας.....**60**

## **Κατάσταση Διαγραμμάτων**

<b>Διάγραμμα 1.</b> Διάγραμμα ροής παραγωγής γιαούρτης.....	<b>39</b>
<b>Διαγραμμα 2.</b> Διάγραμμα ροής παραγωγής τυριού.....	<b>42</b>

## Εισαγωγή

Η απαίτηση των καταναλωτών για ασφαλή τρόφιμα αυξάνεται συνεχώς. Παράλληλα όμως οι γρήγοροι ρυθμοί της καθημερινής ζωής στη σύγχρονη κοινωνία έχουν μειώσει το χρόνο των ανθρώπων για "σπιτικό" φαγητό και τους ωθούν συχνά στο γρήγορο φαγητό ("fast food"). Κύρια θέση, ιδιαίτερα για τους νέους, κατέχουν τα ταχυφαγεία, στα οποία σερβίρονται πολύ συχνά σαλάτες έτοιμες προς κατανάλωση.

Η παρούσα διπλωματική εργασία ασχολείται με τον έλεγχο της μικροβιολογικής κατάστασης δειγμάτων τυροσαλάτας-τυροκαυτερής, τζατζικιού και ουγγαρέζας που πωλούνται σε ταχυφαγεία. Οι σαλάτες αυτές είναι στενά συνδεδεμένες με την ελληνική κουζίνα και τις διατροφικές συνήθειες του Έλληνα, ιδιαίτερα η τυροσαλάτα και το τζατζίκι και για αυτό το λόγο παρουσιάζουν ευρεία κατανάλωση. Σύμφωνα με το Κώδικα Τροφίμων και Ποτών (ΚΤΠ 2014) οι σαλάτες αυτές συμπεριλαμβάνονται στο άρθρο 41( Μαγιονέζα-Σάλτσες και Παρεμφερή Προϊόντα).

Μεταξύ των βασικών συστατικών και ανάλογα με το είδος της σαλάτας είναι η μαγιονέζα, το γιαούρτι, το τυρί και συμπληρώνονται με τεμάχια προϊόντων ζωικής ή φυτικής προέλευσης (αγγούρι, πιπεριά, προϊόντα με βάση το κρέας).

Οι σαλάτες αυτές θεωρούνται ευαλλοιώτα τρόφιμα (ΚΤΠ 2014) και η συντήρησή τους στηρίζεται στο χαμηλό pH, στη χαμηλή τιμή ενεργού ύδατος ( $a_w$ ) και στη διατήρηση της ψυκτικής αλυσίδας. Επίσης, για την παράταση του χρόνου ζωής τους, μπορούν να χρησιμοποιηθούν χημικά συντηρητικά (αρθ. 41, ΚΤΠ, 2014), όπως το σορβικό και το βενζοϊκό οξύ (Manios et al., 2009) για να αναστείλουν την ανάπτυξη των αλλοιογόνων και παθογόνων μικροοργανισμών.

Ωστόσο, σημαντικά τροφιμογενή παθογόνα όπως *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. και *Escherichia coli* O157:H7 έχει αναφερθεί ότι επιβιώνουν ή ακόμη και αναπτύσσονται (Tassou et al., 2009).

Σε παρόμοια μελέτη (Κοντοπούλου και συν. (2015) που πραγματοποιήθηκε στην περιφερειακή ενότητα Λάρισας κατά τους χειμερινούς εξετάσαν 52 δείγματα έτοιμων προς κατανάλωση σαλατών (13 δείγματα από τυροσαλάτα, τζατζίκι, ουγγαρέζα, κηπουρού), που πωλούνται χύμα σε ταχυφαγεία και υπεραγορές της πόλης της Λάρισας. Από τα 26 δείγματα σαλατών κηπουρού και ουγγαρέζας που εξετάστηκαν τα 19 (73,1%) είχαν πληθυσμούς O.M.X.  $< 10^6$  και τα 7 (26,9%)  $> 10^6$  cfu/g. Επίσης, από τα 52 δείγματα που εξετάστηκαν, τα 47 (90,4%) είχαν πληθυσμούς εντεροβακτηριοειδών  $< 10^2$  και 5 δείγματα τυροσαλάτας (9,6%)  $> 10^2$  cfu/g. Σε κανένα από τα δείγματα σαλατών δεν καταγράφηκε παρουσία της *Salmonella* spp. Τέλος, 2 από το σύνολο των 52 δειγμάτων (3,85%) που εξετάστηκαν βρέθηκαν θετικά στην παρουσία της *L. monocytogenes*. Το ένα δείγμα σαλάτας που απομονώθηκε το παθογόνο ήταν ουγγαρέζα και το άλλο δείγμα ήταν τυροσαλάτα, ενώ και τα δύο δείγματα προέρχονταν από ταχυφαγεία. Στα δύο αυτά δείγματα, τα οποία βρέθηκαν θετικά στην παρουσία του παθογόνου, οι πληθυσμοί της *L. monocytogenes* ήταν χαμηλότεροι από το κριτήριο ασφαλείας (100 cfu/g) που ορίζεται από τη νομοθεσία για τα έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα.

Καθώς πρόκειται για τρόφιμα έτοιμα προς κατανάλωση, σημαντικό ρόλο για την ασφάλεια τους είναι η επιλογή καλής ποιότητας πρώτων υλών, η τήρηση των συνθηκών υγιεινής κατά την παραγωγική διαδικασία, η αποφυγή επιμόλυνσης τόσο κατά την παραγωγική διαδικασία, όσο και κατά την παραμονή τους στα ταχυφαγεία και η διατήρηση της ψυκτικής αλυσίδας στις εγκαταστάσεις παραγωγής τους και σε όλα τα στάδια διανομής και πώλησης μέχρι την κατανάλωσή τους από τον καταναλωτή (Angelidis et al, 2006).

## Σκοπός διπλωματικής εργασίας

Ο σκοπός της μελέτης ήταν ο μικροβιολογικός έλεγχος έτοιμων προς κατανάλωση σαλατών, που πωλούνται στα ταχυφαγεία της Λάρισας και της Καρδίτσας.

Κρίνεται σημαντικό να διευκρινιστεί ότι ο σκοπός της εργασίας ήταν ο έλεγχος της μικροβιολογικής κατάστασης των σαλατών αυτών έτσι όπως σερβίρονται στους καταναλωτές, λαμβάνοντας υπόψη τους χειρισμούς των σαλατών στους χώρους των ταχυφαγείων.

Σύμφωνα με το ΚΕΕΛΠΝΟ το χρονικό διάστημα 2004-2013 δηλώθηκαν συνολικά 369 συρροές κρουσμάτων τροφιμογενούς/υδατογενούς νοσήματος. Ο αριθμός των συρροών που δηλώθηκαν ήταν αυξημένος κατά τους θερινούς μήνες, με κορύφωση τον Αύγουστο, ενώ τους επόμενους μήνες παρουσίαζε πτώση. Για το λόγο αυτό η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε τους μήνες Αύγουστο και Σεπτέμβριο που οι υψηλές θερμοκρασίες του περιβάλλοντος πιθανόν να επηρεάσουν την μικροβιολογική ποιότητα των σαλατών.

Η εξέταση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε λαμβάνοντας υπόψη τα κριτήρια υγιεινής και ασφάλειας που ορίζονται στον Κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 2073/2005 περί μικροβιολογικών κριτηρίων για τα τρόφιμα, όπως τροποποιήθηκε και ισχύει.



## ΜΕΡΟΣ 1<sup>ο</sup>

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

#### **1.1 Επιδημιολογία Τροφιμογενών λοιμώξεων**

Το Ευρωπαϊκό κέντρο πρόληψης και ελέγχου ασθενειών (European Center for Diseases Prevention and Control -ECDC) αναφέρει ότι οι λοιμώξεις από σαλμονέλα και καμπυλοβακτηρίδιο παραμένουν οι συχνότερα αναφερόμενες γαστρεντερικές νόσοι στην Ευρωπαϊκή Ένωση. Η καταγεγραμμένη συχνότητα εμφάνισης των λοιμώξεων από σαλμονέλα μειώνεται σταθερά από το 2004 και οφείλεται, τουλάχιστον εν μέρει, στην επιτυχία των προγραμμάτων ελέγχου των λοιμώξεων στην πτηνοτροφία.. Οι καταγεγραμμένες λοιμώξεις από σαλμονέλα εξακολουθούν να είναι συχνότερες μεταξύ των παιδιών ηλικίας κάτω των 5 ετών. Συνεχίζουν δε να είναι πηγή πολλών επιδημικών εκρήξεων, καθώς το 2009 τα κράτη μέλη επαλήθευσαν 324 επιδημικές εκρήξεις με 4.500 εντοπισμένα κρούσματα.

Η λοίμωξη από το καμπυλοβακτηρίδιο είναι η πιο συχνή γαστρεντερική λοίμωξη απανταχού στην Ευρώπη. Τα αναφερόμενα μεγέθη είναι σταθερά, τα περισσότερα κρούσματα είναι σποραδικά και οι επιδημικές εκρήξεις σπάνιες. Παρότι η προέλευση της λοίμωξης είναι άγνωστη σε πολλές περιπτώσεις, το κρέας των πουλερικών θεωρείται η πιο σημαντική τροφιμογενής πηγή της, εξ ου και τα σημερινά και πιθανώς τα μελλοντικά μέτρα ελέγχου εξακολουθούν να εστιάζουν εκεί.

Οι παρασιτικές νόσοι, ιδίως η κρυπτοσποριδίωση και η γιαρδίαση, εξακολουθούν να αποτελούν σημαντικές αιτίες γαστρεντερικών λοιμώξεων στην Ευρώπη, ενώ πολλά είναι τα κρούσματα που δεν διαγιγνώσκονται και δεν καταγράφονται.

Η αναφορά των κρουσμάτων πολλών από τις ασθένειες αυτής της ομάδας εξακολουθεί να είναι σπάνια ή αραιή. Κάποιες από τις ασθένειες έχουν σοβαρές επιπτώσεις για τα προσβεβλημένα άτομα (π.χ. άνθρακας, αλλαντίαση, λιστερίαση, τοξοπλάσμωση). Σε γενικές γραμμές, όλες οι χώρες της ΕΕ αναφέρουν κρούσματα των ασθενειών αυτών, ο δε αριθμός των επιβεβαιωμένων κρουσμάτων εμφανίζεται σχετικά σταθερός, χωρίς κάποια ιδιαίτερη ή αισθητή τάση την περίοδο 2006-2009.

Τα κρούσματα άνθρακα ήταν συχνότερα, κυρίως λόγω έκρηξης της νόσου μεταξύ των χρηστών ενδοφλέβιων ναρκωτικών ουσιών στο Ηνωμένο Βασίλειο. Η ασθένεια θα πρέπει να θεωρηθεί νεοεμφανιζόμενη όσον αφορά τη συγκεκριμένη οδό μετάδοσης.

Η αναφορά κρουσμάτων αιμολυτικού ουραιμικού συνδρόμου (HUS), μιας δυνητικά θανατηφόρου κλινικής εκδήλωσης της λοίμωξης από STEC/VTEC, ήταν συχνότερη το 2009 σε σχέση με παλαιότερα, κάτι το οποίο ενδεχομένως σχετίζεται με τα χαρακτηριστικά των τύπων του E. coli που ευθύνονται για δύο μεγάλες εκρήξεις στο Ηνωμένο Βασίλειο και στις Κάτω Χώρες.

Τα περισσότερα κρούσματα τριχενέλλωσης καταγράφονται στη Βουλγαρία, στη Ρουμανία και στη Λιθουανία, γεγονός που ενδεχομένως συνδέεται με την κατανάλωση

οικόσιτων χοίρων και αγριόχοιρων. Τα περισσότερα επιβεβαιωμένα κρούσματα εχινόκοκκιάσης καταγράφηκαν στη Βουλγαρία.

Τα καταγεγραμμένα κρούσματα γερσινίωσης παρουσιάζουν συνολικά πτώση, όμως τα μεγέθη παραμένουν υψηλά στις σκανδιναβικές χώρες, στη Γερμανία, στην Τσεχική Δημοκρατία και στη Σλοβακία. Η συγκεκριμένη λοίμωξη συνδέεται συχνά με την κατανάλωση χοιρινού κρέατος.

Τα καταγεγραμμένα κρούσματα γερσινίωσης παρουσιάζουν συνολικά πτώση, όμως τα μεγέθη παραμένουν υψηλά στις σκανδιναβικές χώρες, στη Γερμανία, στην Τσεχική Δημοκρατία και στη Σλοβακία. Η συγκεκριμένη λοίμωξη συνδέεται συχνά με την κατανάλωση χοιρινού κρέατος.

Τα κρούσματα ηπατίτιδας Α που αναφέρθηκαν ήταν στο σύνολό τους σχετικά σπάνια, όμως τα ποσοστά των επιβεβαιωμένων κρουσμάτων παραμένουν σχετικά υψηλά στη Λεττονία, στην Τσεχική Δημοκρατία, στη Σλοβακία, στη Ρουμανία και στη Βουλγαρία.

Ο τυφοειδής και παρατυφοειδής πυρετός και η χολέρα θεωρούνται σπάνιες ασθένειες στην ΕΕ και στις χώρες του ΕΟΧ και της ΕΖΕΣ. Τα κρούσματα συνίστανται κατά κύριο λόγο σε σποραδικά περιστατικά εισαγόμενα από χώρες εκτός ΕΕ και η διασπορά τους είναι αντανάκλαση των ταξιδιωτικών διαδρομών που ακολουθούν οι πολίτες της ΕΕ σε χώρες όπου οι εν λόγω νόσοι είναι ενδημικές.

Το Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (ΚΕΕΛΠΝΟ), έχει καταγράψει κατά το διάστημα 2004-2013 τα επιδημιολογικά δεδομένα συρροών κρουσμάτων τροφιμογενούς/υδατογενούς νοσήματος στην Ελλάδα, στο σύστημα υποχρεωτικής δήλωσης νοσημάτων.

Ως συρροή κρουσμάτων τροφιμογενούς/υδατογενούς νοσήματος ορίζεται η εμφάνιση δύο ή περισσότερων κρουσμάτων με παρόμοια συμπτωματολογία, συνήθως από το γαστρεντερικό σύστημα (διάρροια ή/και έμετο), η αιτία των οποίων μπορεί να αποδοθεί στην κατανάλωση του ίδιου τροφίμου ή νερού της ίδιας προέλευσης.

Το χρονικό διάστημα 2004-2013 δηλώθηκαν συνολικά 369 συρροές κρουσμάτων τροφιμογενούς/υδατογενούς νοσήματος. Ο αριθμός των συρροών που δηλώθηκαν ήταν αυξημένος κατά τους θερινούς μήνες, με κορύφωση τον Αύγουστο, ενώ τους επόμενους μήνες παρουσίαζε πτώση, ενώ η μεγαλύτερη μέση ετήσια δηλούμενη επίπτωση για την περίοδο 2004-2013 καταγράφηκε στην περιφέρεια Ιονίων Νήσων και η μικρότερη στην περιφέρεια Δυτικής Ελλάδας.

Από τα παραπάνω δηλωθέντα κρούσματα ο αιτιολογικός παράγοντας βρέθηκε στο 291 κρούσματα. Από αυτά, τα 271 ήταν βακτηριακής αιτιολογίας. Ο μικροοργανισμός που απομονώθηκε στα 249 κρούσματα ήταν η σαλμονέλλα, και από αυτά στα 79 κρούσματα ταυτοποιήθηκε η *Salmonella enteritidis*.

Από τη διερεύνηση των κρουσμάτων βρέθηκε ότι 7 κρούσματα συσχετιζόνταν με ταξίδι στο εξωτερικό, σε 340 κρούσματα βρέθηκε το εμπλεκόμενο τρόφιμο και σε 22 κρούσματα οφειλόταν η κατάποση μολυσμένου νερού. Σε 151 συρροές, ο χώρος

κατανάλωσης του ύποπτου τροφίμου ήταν το σπίτι, σε 69 ένα εστιατόριο/ταχυφαγείο ή άλλος χώρος εστίασης και σε 27 ένα ξενοδοχείο.

Τα τρόφιμα που θεωρήθηκαν συχνότερα πιθανοί αγωγοί μετάδοσης των δηλωθεισών συρροών ήταν το αυγό (68 συρροές), το κοτόπουλο (53 συρροές) και τα γαλακτοκομικά προϊόντα (29 συρροές). Ωστόσο, συχνά η πληροφορία για το ύποπτο τρόφιμο βασίζεται στα συλλεχθέντα περιγραφικά δεδομένα και δεν αποτελεί εύρημα αναλυτικής επιδημιολογικής μελέτης ή εργαστηριακού ελέγχου του εμπλεκόμενου τροφίμου.

## 1.2 Ανάπτυξη μικροοργανισμών στα τρόφιμα

### 1.2.1 Ρυθμός και Καμπύλη ανάπτυξης των μικροοργανισμών

Τα τρόφιμα λόγω της περιεκτικότητας τους σε θρεπτικά συστατικά ευνοούν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Με τον όρο ανάπτυξη των μικροοργανισμών αναφερόμαστε στην αύξηση του αριθμού των κυττάρων ενός μικροοργανισμού σε ένα πληθυσμό. Η αύξηση του πληθυσμού γίνεται μέσω της κυτταρικής διαίρεσης. Ο πολλαπλασιασμός των μικροβίων ακολουθεί μια γεωμετρική πρόοδο κατά την οποία η αλλαγή στο μικροβιακό πληθυσμό συναρτίζεται του χρόνου είναι ευθέως ανάλογη με τον αρχικό πληθυσμό των μικροβίων και εκφράζεται με τον ακόλουθο τύπο:

$$dN/dt=k.No,$$

όπου,  $dN$  η αλλαγή στο μικροβιακό πληθυσμό,  $dt$  ο χρόνος που χρειάστηκε για την κυτταρική διαίρεση,  $k$  η σταθερά ανάπτυξης (Σαββαΐδης Ι., 2014). Το χρονικό διάστημα που μεσολάβησε για το σχηματισμό δυο θυγατρικών από το μητρικό κύτταρο ονομάζεται γενεά, ενώ ο χρόνος που απαιτείται για να ολοκληρωθεί αυτή η διαδικασία χρόνος γενεάς.

Η ανάπτυξη των μικροοργανισμών στα τρόφιμα μπορεί να παρουσιαστεί γραφικά συναρτίζεται του αριθμού των μικροβίων σε λογαριθμική κλίμακα σε σχέση με το χρόνο, με την καμπύλη ανάπτυξης. Η καμπύλη ανάπτυξης παρουσιάζει 4 φάσεις ανάπτυξης των μικροβίων και είναι οι εξής (Σκεπαστιανός, 2012):

- την φάση προσαρμογής (λανθάνουσα φάση ή φάση καθυστέρησης)
- την φάση εκθετικής ανάπτυξης (εκθετική ή λογαριθμική φάση),
- την φάση σταθεροποίησης
- και την φάση μείωσης ή θανάτου

Στη λανθάνουσα φάση τα βακτήρια προσαρμόζονται στο περιβάλλον που βρέθηκαν. Δεν παρατηρείται πολλαπλασιασμός και μεταβολή του αριθμού τους, αλλά τα βακτήρια συνθέτουν τα απαραίτητα ένζυμα και τις πρωτεΐνες για την επόμενη φάση. Η διάρκεια αυτής της φάσης εξαρτάται από την περιεκτικότητα των τροφίμων σε θρεπτικά υλικά, από τον αρχικό πληθυσμό των μικροβίων και τις συνθήκες που επικρατούν. Σε ευνοϊκές για τα μικρόβια συνθήκες, ο χρόνος της λανθάνουσας φάσης είναι μικρότερος από ότι σε μη ευνοϊκές συνθήκες όπου απαιτείται περισσότερος χρόνος για να προσαρμοστούν τα μικρόβια (Pirt, 1975).

Η λογαριθμική ή εκθετική φάση είναι η φάση κατά την οποία παρατηρείται λογαριθμική αύξηση των μικροβίων και ύστερα από κάθε διαίρεση ο αριθμός των μικροβίων διπλασιάζεται. Στο αρχικό στάδιο της φάσης παρατηρείται μέγιστος ρυθμός ανάπτυξης, ενώ προς το τέλος του σταδίου αυτού ο ρυθμός ανάπτυξης αρχίζει να ελαττώνεται, καθώς σταδιακά μειώνονται τα θρεπτικά συστατικά και αρχίζουν να συσσωρεύονται προϊόντα του μεταβολισμού των μικροβίων που είναι τοξικά για τα μικρόβια (Σαββαΐδης, 2014).

Στη φάση σταθεροποίησης ο λογάριθμος ανάπτυξης του πληθυσμού αποκτά σταθερή τιμή και αναστέλλεται ο πολλαπλασιασμός των μικροβίων, λόγω έλλειψης θρεπτικών συστατικών, συσσώρευσης τοξικών προϊόντων του μεταβολισμού και εξάντλησης του οξυγόνου. Παρατηρείται μόνο ελάχιστος πολλαπλασιασμός, ικανός να αντικαθιστά τον αριθμό των νεκρών κυττάρων (Σκεπαστιανός, 2012).

Στη φάση θανάτου ο λογάριθμος αποκτά αρνητικές τιμές και η καμπύλη αρνητική κλίση. Ο αριθμός των νεκρών κυττάρων υπερβαίνει τον αριθμό των ζώντων κυττάρων και αντίστοιχα ο ρυθμός θανάτου είναι μεγαλύτερος από το ρυθμό ανάπτυξης, καθώς το θρεπτικό υπόστρωμα δεν μπορεί να υποστηρίξει πλέον τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων (Pirt, 1975; Σαββαΐδης, 2014).

### **1.2.2 Παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών στα τρόφιμα**

Τα τρόφιμα αποτελούν σύνθετα οικοσυστήματα που αποτελούνται από τα συστατικά που τα αποτελούν και τους μικροοργανισμούς που υπάρχουν σε αυτά ή μπορούν να τα επιμολύνουν. Οι μικροοργανισμοί για να αναπτυχθούν απαιτούν μια σειρά θρεπτικών συστατικών που τα χρησιμοποιούν ως πηγή ενέργειας για να παράγουν τα δομικά τους συστατικά. Τα περισσότερα τρόφιμα περιέχουν αρκετά θρεπτικά συστατικά ώστε να υποστηρίξουν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών, ωστόσο πολλοί παράγοντες μπορούν να ευνοήσουν, να εμποδίσουν ή να περιορίσουν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών σε αυτά. Οι παράγοντες αυτοί είναι είτε ενδογενείς ή εξωγενείς (Montville and Matthews, 2010).

Οι ενδογενείς παράγοντες, σχετίζονται με το είδος και τη σύνθεση των τροφίμων και είναι το pH, η ενεργότητα του νερού, το οξυγόνο και το οξειδοαναγωγικό δυναμικό, τα θρεπτικά συστατικά, οι αντιμικροβιακοί παράγοντες, η ανταγωνιστική χλωρίδα και οι βιολογικές δομές. Οι εξωγενείς παράγοντες, σχετίζονται με την επεξεργασία, το χειρισμό και τη συντήρηση των τροφίμων και μεταξύ αυτών είναι η θερμοκρασία, οι συνθήκες συντήρησης (υγρασία), συσκευασία (είδος ατμόσφαιρας), η παρουσία και η δράση άλλων μικροοργανισμών (Morris, 2000). Για καθένα από τους παραπάνω παράγοντες υπάρχουν τρεις τιμές, η ελάχιστη, η μέγιστη και η βέλτιστη. Η ελάχιστη και η μέγιστη αποτελούν την ελάχιστη και τη μέγιστη τιμή του παράγοντα στην οποία ο μικροοργανισμός μπορεί να αναπτύσσεται, ενώ η βέλτιστη τιμή, είναι η τιμή του παράγοντα όπου παρατηρείται η μέγιστη τιμή ανάπτυξης του μικροοργανισμού. Αυτό πρακτικά σημαίνει ότι ο μικροοργανισμός αναπτύσσεται σε όλο το εύρος των τιμών μεταξύ της ελάχιστης και της μέγιστης τιμής, ο ρυθμός όμως πολλαπλασιασμού μειώνεται καθώς η τιμή του παράγοντα μετακινείται από τη βέλτιστη προς τα δυο

άκρα. Πρέπει ωστόσο να τονιστεί ότι οι παράγοντες που επηρεάζουν, ή ορθότερα προσδιορίζουν το ρυθμό πολλαπλασιασμού των μικροβιακών κυττάρων, βρίσκονται σε συνεχή μεταξύ τους αλληλεξάρτηση και αλληλεπίδραση. Έτσι, το τελικό αποτέλεσμα δεν εξαρτάται μόνο από την απόλυτη τιμή καθενός από τους υπεύθυνους για την ανάπτυξη των μικροβίων παράγοντες, αλλά και από τον βαθμό στον οποίο ο παράγοντας αυτός επηρεάζει ή επηρεάζεται από όλους τους άλλους (Morris, 2000).

### 1.2.2.1 Ενδογενείς παράγοντες ανάπτυξης μικροοργανισμών

#### α) pH

Το pH εκφράζεται ως ο αρνητικός λογάριθμος της συγκέντρωσης των ιόντων υδρογόνου. [ $\text{pH} = (-\log_{10}[\text{H}^+])$ ]. Οι τιμές του κυμαίνονται από το 0 έως το 14, με 7 το ουδέτερο. Το pH δείχνει πόσο όξινα είναι τα τρόφιμα. Τρόφιμα με  $\text{pH} \leq 4,6$  θεωρούνται υψηλής οξύτητας, όπως είναι οι χυμοί φρούτων, τα αναψυκτικά, το κρασί, ενώ τρόφιμα με  $\text{pH} > 4,6$  θεωρούνται χαμηλής οξύτητας, όπως είναι το κρέας (Jay, 2000).

Οι περισσότεροι μικροοργανισμοί αναπτύσσονται καλύτερα σε τιμές pH 6,5 – 7,5. Οι οξεόφιλοι μικροοργανισμοί αναπτύσσονται σε  $\text{pH} < 4$ , ενώ οι αλκαλόφιλοι σε  $\text{pH} > 9 - 10$ . Όταν τα μικρόβια βρίσκονται σε περιβάλλον με όξινο ή αλκαλικό pH, η ικανότητα τους να αναπαράγονται εξαρτάται από την ικανότητα τους να μεταβάλλουν το pH του περιβάλλοντος σε πιο ευνοϊκό για αυτά pH. Το είδος των μικροβίων που μπορούν να αναπτυχθούν στα τρόφιμα εξαρτάται από την ικανότητα του τροφίμου να αντιστέκεται στις αλλαγές του pH. Η ανθεκτικότητα των τροφίμων να αντιστέκονται σε τέτοιες αλλαγές ονομάζεται ρυθμιστική ικανότητα. Έτσι, το pH των τροφίμων με χαμηλή ρυθμιστική ικανότητα αλλάζουν το pH, όταν συστατικά παράγονται από το μεταβολισμό των μικροβίων στα τρόφιμα. Σε γενικές γραμμές τρόφιμα με μεγάλη ρυθμιστική ικανότητα θεωρούνται το γάλα και το κρέας (Montville and Matthews, 2010; Μαλατσούρας, 2006). Όταν οι μικροοργανισμοί βρίσκονται σε τρόφιμα με pH έξω από τα ιδανικά όρια, τότε παρατηρείται επιμήκυνση της φάσης προσαρμογής. Η επιμήκυνση της φάσης προσαρμογής εξαρτάται από τη ρυθμιστική ικανότητα των τροφίμων, με αποτέλεσμα να είναι μεγαλύτερη στα τρόφιμα με μεγάλη ρυθμιστική ικανότητα (Bager and Harwood, 1999). Αυτό οφείλεται στη προσπάθεια των μικροοργανισμών να προσαρμόσουν τα χαρακτηριστικά του τροφίμου σε συνθήκες που μπορούν να αναπτυχθούν.

Τόσο το χαμηλό pH, όσο και το υψηλό pH, έχουν μεγάλη σημασία και μπορεί να οδηγήσουν σε αναστολή της ανάπτυξης των μικροοργανισμών. Για παράδειγμα, η ανάπτυξη της *Listeria monocytogenes* αναστέλλεται σε τρόφιμα με υψηλές τιμές pH. Το ενδοκυτταρικό pH των μικροοργανισμών πρέπει να διατηρείται πάνω από μια κρίσιμη τιμή, κάτω από την οποία επέρχεται κυτταρικός θάνατος. Η ανθεκτικότητα των μικροοργανισμών στην επίδραση αυξημένης οξύτητας διαφέρει ανάλογα με το μικροοργανισμό. Ορισμένοι μικροοργανισμοί διαθέτουν ορισμένους μηχανισμούς διατήρησης του ενδοκυτταρικού pH τους για την επιβίωσή τους σε όξινα περιβάλλοντα. Γενικά, οι ζύμες και οι μύκητες αναπτύσσονται σε ένα μεγάλο εύρος τιμών, ενώ τα βακτήρια εντός ενός πιο περιορισμένου εύρους τιμών. Τα Gram (+) βακτήρια αναπτύσσονται σε pH εύρους από 4 έως 8,5, ενώ τα Gram (-) βακτήρια μεταξύ 4,5 – 9,0 (Doyle et al., 1997; Μπαλατσούρας, 2006).

Στη συντήρηση των τροφίμων το pH συνήθως δρα σε συνδυασμό και με άλλους παράγοντες των τροφίμων, όπως το  $a_w$ , η συγκέντρωση NaCl, το οξειδοαναγωγικό δυναμικό, τα συντηρητικά για την επιβράδυνση ή αναστολή της ανάπτυξης των μικροοργανισμών (Montville and Matthews, 2010).

## **β) Νερό – Ενεργότητα ύδατος (water activity $a_w$ )**

Οι μικροοργανισμοί δεν μπορούν να αναπτυχθούν στο καθαρό νερό ή απουσία νερού. Το νερό είναι το συστατικό του κυττάρου με τη μεγαλύτερη αναλογία, διευκολύνει την είσοδο θρεπτικών για το μικροοργανισμό συστατικών και την αποβολή των προϊόντων του μεταβολισμού του. Οι δραστηριότητες αυτές απαιτούν νερό. Μια βασική παράμετρος που επηρεάζει το ρυθμό ανάπτυξης των μικροβίων είναι η ενεργότητα του νερού ( $a_w$ ) ή ο συντελεστής ενεργού ύδατος (ΣΕΥ) και αφορά στη ποσότητα του νερού των τροφίμων που είναι διαθέσιμη για τις βιοχημικές και βακτηριακές δράσεις. Δεν αφορά δηλαδή το συνολικό νερό που περιέχεται σε ένα τρόφιμο, αλλά το ελεύθερο μέρος αυτού που είναι διαθέσιμο για τους μικροοργανισμούς (Corlett et al., 1980; Μπαλατσούρας, 2006).

*Ως ενεργότητα νερού ορίζεται η σχέση της τάσης των υδρατμών του τροφίμου δια της τάσης των υδρατμών του καθαρού νερού στην ίδια θερμοκρασία και λαμβάνει τιμές από 0 έως 1 (Jay, 2000). Το  $a_w$  του καθαρού νερού είναι 1,0, στο οποίο δεν αναπτύσσονται τα μικρόβια λόγω έλλειψης θρεπτικών συστατικών, ενώ το  $a_w$  ενός πλήρως αφυδατωμένου τροφίμου είναι 0. Διάλυμα NaCl 22% έχει  $a_w$  0,86, κορεσμένο διάλυμα NaCl έχει  $a_w$  0,75, ενώ το  $a_w$  των περισσότερων νωπών τροφίμων είναι περίπου 0,99 (Jay, 2000).*

Στο καθαρό νερό, τα μόρια είναι χαλαρά διατεταγμένα με αποτέλεσμα να είναι εύκολα διαθέσιμα για τους μικροοργανισμούς. Όταν προστίθενται ουσίες, όπως άλας και σάκχαρα, τα μόρια του ύδατος προσανατολίζονται προς την προστιθέμενη ουσία αλλάζοντας τη διάταξη τους. Με τον τρόπο αυτό το νερό δεσμεύεται και συνεπώς καθίσταται λιγότερο διαθέσιμο για τους μικροοργανισμούς (Gorris, 2005).

Η ενεργότητα του νερού συνδέεται με 3 τύπους μικροοργανισμών που απαντώνται στα τρόφιμα. Οι οσμοανεκτικοί ή οσμόφιλοι που αφορούν μικροοργανισμούς που αναπτύσσονται παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων ζάχαρης (π.χ ζυμομύκητες σε μαρμαλάδες). Οι αλοανεκτικοί ή αλόφιλοι που αφορούν μικροοργανισμούς που αναπτύσσονται παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων αλάτων. Και τέλος, οι ξηροανεκτικοί ή ξηρόφιλοι, αφορούν μικροοργανισμούς που αναπτύσσονται σε ξηρά τρόφιμα. (Montville et al., 2001).

Τα περισσότερα μικρόβια αναπτύσσονται σε τρόφιμα με ενεργότητα νερού  $a_w=0,990 - 0,998$ , ενώ δεν αναπτύσσονται όταν το  $a_w$  είναι μικρότερο ή ίσο με  $0,85 - 0,90$ . Σε γενικές γραμμές, τα βακτήρια απαιτούν υψηλές τιμές  $a_w$  (Gorris, 2005, Mossel et al., 1995). Τα περισσότερα βακτήρια δεν μπορούν να αναπτυχθούν σε τιμές  $a_w$  χαμηλότερες από 0,90, ενώ οι ζύμες σε τιμές μέχρι  $a_w$  0,87 και οι μύκητες σε τιμές μέχρι  $a_w$  0,80. Τα περισσότερα βακτήρια δεν μπορούν να αναπτυχθούν σε τιμές  $a_w$  χαμηλότερες από 0,90, οι ζύμες μπορούν να αναπτυχθούν μέχρι  $a_w$  0,87 και οι μύκητες μέχρι και  $a_w$  0,80. Ωστόσο ορισμένα βακτήρια που καλούνται «αλόφιλα» μπορούν να αναπτυχθούν σε κορεσμένο διάλυμα NaCl που αντιστοιχεί σε  $a_w$  περίπου 0,75 και ορισμένα είδη ζυμών και μυκήτων

αναπτύσσονται, ωστόσο εξαιρετικά αργά, σε διαλύματα σακχάρων ή σε αποξηραμένα τρόφιμα σε τιμές μέχρι 0,65-0,60. Από τα τροφιμογενή παθογόνα βακτήρια τη μεγαλύτερη ανθεκτικότητα σε χαμηλές τιμές  $a_w$  παρουσιάζει ο *Staphylococcus aureus*, που μπορεί να αναπτυχθεί σε τιμές  $a_w$  μέχρι και 0,86 (Mossel et al., 1995).

Πυκνά διαλύματα αλάτων ή σακχάρων ασκούν ωσμωτική πίεση στα μικροβιακά κύτταρα με αποτέλεσμα την έξοδο του νερού και τη λύση του κυττάρου. Το φαινόμενο της όσμωσης εφαρμόζεται στη συντήρηση των τροφίμων. Ιδιαίτερη σημασία στην ανθεκτικότητα των μικροοργανισμών στη μείωση του  $a_w$  έχει ο τρόπος με τον οποίο επιτυγχάνεται (Gorris 2005; Corlett, 1980). Αναφέρεται ότι για την ανάπτυξη του *Clostridium perfringens* οι ελάχιστες τιμές  $a_w$  ήταν 0,97 και 0,95 όταν χρησιμοποιήθηκαν σουκρόζη και NaCl αντίστοιχα (Kang et al., 1969).

Εκτός από την προσθήκη αλάτων ή σακχάρων και την αφυδάτωση, μείωση της τιμής του  $a_w$  επιτυγχάνεται επίσης με την κατάψυξη, καθώς το νερό στη μορφή του πάγου, λόγω κρυσταλλώσεως δεν είναι διαθέσιμο για τους μικροοργανισμούς (International Commission on Microbiological Specification for Foods–ICMSF, 1996).

Τέλος οι τιμές του  $a_w$  για την ανάπτυξη των μικροβίων επηρεάζεται και από άλλους παράγοντες. Μεταβολές του pH και της θερμοκρασίας αυξάνουν τις ελάχιστες τιμές  $a_w$  που είναι αναγκαίες για την ανάπτυξη των μικροβίων. Πρακτικά αυτό σημαίνει ότι η προσθήκη άλατος σε ποσότητες που μεμονωμένα δεν μπορούν να αναστείλουν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών, όταν δρουν συνεργατικά με άλλους παράγοντες μειώνουν το  $a_w$  σε τιμές που αναστέλλουν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών (Corlett et al., 1980).

### γ) Οξυγόνο $O_2$ και οξειδοαναγωγικό δυναμικό Eh

Η ικανότητα ενός μέσου (τροφίμου) να αποδεχθεί ή να δώσει ηλεκτρόνια, να οξειδώσει ή να αναγάγει, καλείται οξειδοαναγωγική ικανότητα Eh (Αμβροσιάδης, 2004). Όταν ηλεκτρόνια μεταφέρονται από μια ουσία σε μια άλλη τότε δημιουργείται δυναμικό το οποίο μπορεί να μετρηθεί και εκφράζεται σε mV (milliVolt). Όταν μια ουσία οξειδώνεται αποκτά θετικό ηλεκτρικό δυναμικό, ενώ όταν ανάγεται αποκτά αρνητικό ηλεκτρικό δυναμικό (Mossel et al., 1995).

Η επαφή με τον αέρα και συγκεκριμένα η παρουσία οξυγόνου ως οξειδωτικός παράγοντας εξασφαλίζει υψηλή οξειδοαναγωγική δράση στα τρόφιμα ευνοώντας την ανάπτυξη των αερόβιων μικροβίων. Αντίθετα η παρουσία ενός αναγωγικού παράγοντα, όπως το ασκορβικό οξύ, προκαλεί πτώση του οξειδοαναγωγικού δυναμικού ευνοώντας την ανάπτυξη των αναερόβιων μικροβίων (Αμβροσιάδης, 2004).

Θα πρέπει να διευκρινιστεί ότι οι μικροοργανισμοί, ανάλογα με τις απαιτήσεις τους σε οξυγόνο, χωρίζονται σε αερόβιους, αναερόβιους, μικροαερόφιλους και προαιρετικά αναερόβιους. Οι αερόβιοι μικροοργανισμοί απαιτούν για τον πολλαπλασιασμό τους ελεύθερο οξυγόνο (2% οξυγόνο) που υπάρχει στον αέρα και αναπτύσσονται σε θετικές τιμές Eh (+500 έως +300). Οι υποχρεωτικά αναερόβιοι οργανισμοί αναπτύσσονται απουσία ελεύθερου οξυγόνου (0% οξυγόνο) γιατί η παρουσία του δρα τοξικά σε αυτά. Για το λόγο αυτό τα αναερόβια μικρόβια αναπτύσσονται σε τρόφιμα που είναι

συσκευασμένα σε κενό αέρος ή σε κονσερβοποιημένα τρόφιμα. Αναπτύσσονται σε τιμές Eh +100 έως κάτω από -250mV. Οι μικροαερόφιλοι μικροοργανισμοί απαιτούν χαμηλότερες συγκεντρώσεις σε οξυγόνο (3 – 6%) και αναπτύσσονται σε ήπιες συνθήκες αναγωγής. Τέλος, οι προαιρετικά αναερόβιοι, πολλαπλασιάζονται τόσο σε αερόβιες, όσο και σε αναερόβιες συνθήκες και αναπτύσσονται σε τιμές Eh +300 έως -100 mV (Morris, 2000; Legnani et al., 2005;).

Ο αποκλεισμός του αέρα από τα τρόφιμα κατά τη διάρκεια της κονσερβοποίησης μειώνει την οξειδοαναγωγική ικανότητα. Αντίθετα, κατά τη διάρκεια του τεμαχισμού τα τρόφιμα έρχονται σε επαφή με τον αέρα σε μεγαλύτερο ποσοστό από ότι στην ακέραιη μορφή τους και επομένως αυξάνεται η οξειδοαναγωγική τους ικανότητα. Έτσι, τα αυστηρά αναερόβια βακτήρια αναπτύσσονται σε κονσερβοποιημένα τρόφιμα, τρόφιμα σε συσκευασία υπό κενό ή και στο εσωτερικό μεγάλου μεγέθους τεμαχίων ακατέργαστων τροφίμων, όπου η διείσδυση του οξυγόνου είναι περιορισμένη (Morris, 2000; Μπαλατσούρας 2006).

Το Eh ενός τροφίμου δεν παραμένει σταθερό, αλλά επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες. Ένας παράγοντας είναι η παρουσία μικροοργανισμών στο τρόφιμο. Τα αερόβια βακτήρια, κατά τον πολλαπλασιασμό τους καταναλώνουν οξυγόνο με αποτέλεσμα την πτώση του Eh του τροφίμου. Επίσης, η παρουσία οξειδωτικών ή αναγωγικών ουσιών επηρεάζει το Eh. Τα νωπά τρόφιμα, όπως τα φρούτα και το κρέας κατά τη διάρκεια της συντήρησης του συνεχίζουν τις μεταβολικές τους δράσεις με αποτέλεσμα τη πτώση του Eh. Αντίθετα, σε θερμικά επεξεργασμένα τρόφιμα, όπου καταστρέφονται οι οξειδωτικές και αναγωγικές ουσίες, διαχέεται το οξυγόνο στο τρόφιμο με αποτέλεσμα την αύξηση του Eh (Jay, 2000; Morris, 2000).

#### **δ) Θρεπτικά συστατικά**

Οι μικροοργανισμοί απαιτούν θρεπτικά συστατικά για να μπορέσουν να αναπτυχθούν και να διατηρήσουν τις μεταβολικές τους λειτουργίες. Δεν έχουν όλοι οι μικροοργανισμοί τις ίδιες απαιτήσεις σε θρεπτικά συστατικά, αλλά αυτές εξαρτώνται από το είδος του μικροοργανισμού (Montville and Matthews, 2010).

Γενικά, τα τρόφιμα παρέχουν τα κύρια θρεπτικά συστατικά για την ανάπτυξη των μικροβίων και ανάλογα με τη διαθεσιμότητα των θρεπτικών συστατικών καθορίζεται ποια μικρόβια θα αναπτυχθούν στα τρόφιμα (ICMSF, 1996).

Τα ουσιώδη θρεπτικά συστατικά που είναι απαραίτητα για τους μικροοργανισμούς είναι το νερό, οι πηγές ενέργειας, οι πηγές αζώτου, οι βιταμίνες και τα ιχνοστοιχεία. Οι μικροοργανισμοί που αναπτύσσονται σε ένα τρόφιμο είναι αυτοί που μπορούν να χρησιμοποιήσουν τα θρεπτικά συστατικά που παρέχει το τρόφιμο. Για παράδειγμα, οι μικροοργανισμοί που μπορούν να ζυμώσουν τη λακτόζη στο γάλα, ή οι μικροοργανισμοί που διασπούν τις πρωτεΐνες στο κρέας (Jay, 2000).

Η κύρια πηγή ενέργειας των μικροοργανισμών είναι ο άνθρακας στη μορφή των υδατανθράκων, αλκοολών και αμινοξέων. Τα περισσότερα παθογόνα βακτήρια μεταβολίζουν απλά σάκχαρα, όπως η γλυκόζη, ενώ άλλα πιο σύνθετα, όπως το άμυλο. Ως πηγή αζώτου τα μικρόβια μεταβολίζουν διάφορα αμινοξέα, ενώ άλλες πηγές αζώτου



είναι η ουρία, η αμμωνία κ.α (Montiville et al., 2001) .

Οι απαιτήσεις των μικροβίων σε βιταμίνες διαφέρουν ανάλογα με το μικροοργανισμό. Αρκετοί μικροοργανισμοί δεν μπορούν να αναπτυχθούν απουσία βιταμινών, κυρίως του συμπλέγματος Β. Παράδειγμα αποτελεί η βιοτίνη, η οποία είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών και η οποία είναι συνδεδεμένη με το λεύκωμα του αυγού, οπότε δεν είναι διαθέσιμη για τα μικρόβια περιορίζοντας το εύρος των μικροοργανισμών που θα αναπτυχθούν στα αυγά (Board et al., 1986).

Τα ιχνοστοιχεία που είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών είναι ο φώσφορος, το μαγνήσιο, ο σίδηρος, το μαγγάνιο, το ασβέστιο κ.α. Γενικά, οι απαιτήσεις των μικροοργανισμών σε ιχνοστοιχεία δεν είναι σημαντικές και τα περισσότερα τρόφιμα αποτελούν πλούσιες πηγές ιχνοστοιχείων. Ωστόσο υπάρχουν και μικροοργανισμοί με ιδιαίτερες απαιτήσεις σε ιχνοστοιχεία όπως π.χ. η *Salmonella* Enteritidis που απαιτεί σίδηρο για την ανάπτυξη της (Clay et al., 1991).

### **ε) Ανασταλτικές ουσίες**

Τα τρόφιμα περιέχουν ποικίλες ενδογενείς ουσίες και αντιμικροβιακές ενώσεις που εμποδίζουν τη μικροβιακή ανάπτυξη. Τα τρόφιμα φυτικής προέλευσης περιέχουν ουσίες με αντιμικροβιακή δράση, όπως τα αιθέρια έλαια, όμως οι ουσίες αυτές βρίσκονται σε μικρές συγκεντρώσεις και δεν επηρεάζουν σημαντικά την ανάπτυξη των μικροβίων. Σε συνδυασμό με άλλους παράγοντες μπορούν να παρέχουν μεγαλύτερη αντιμικροβιακή δράση (Doyle et al., 1997). Οι κυριότερες αντιμικροβιακές ουσίες των τροφίμων ζωϊκής προέλευσης είναι η λυσοζύμη, που υδρολύει το κυτταρικό τοίχωμα, η λακτοφαινόλη που δεσμεύει το σίδηρο κ.α (Gorris, 2005).

Στο γάλα, ο κυριότερος αντιμικροβιακός παράγοντας είναι η λακτοφαινόλη υπεροξειδάση, η λυσοζύμη, οι ανοσοσφαιρίνες, η λακτοφερίνη κ.α (Noordhuijzen et al., 2005).

Τέλος, στα αυγά και κυρίως στο λεύκωμα εμπεριέχονται πολλές αντιμικροβιακές ουσίες, όπως η λυσοζύμη, η αβιδίνη, η συναλβουμίνη και η ωαλβουμίνη (Board et al., 1986).

Εκτός από τις ενδογενείς ανασταλτικές ουσίες, στα τρόφιμα υπάρχουν και αντιμικροβιακές ουσίες, οι οποίες προκύπτουν κατά την επεξεργασία τους, όπως κατά την κάπνιση του κρέατος και των αλιευμάτων, όπου εμπλουτίζονται με αντιμικροβιακές ενώσεις, όπως οι φαινόλες, οι αλδεΐδες κ.α (Mossel et al., 1995).

### **στ) Βιολογικές δομές**

Ορισμένα τρόφιμα ζωϊκής και φυτικής προέλευσης διαθέτουν κάποιες βιολογικές δομές που αποτρέπουν την είσοδο των μικροβίων σε αυτά, λειτουργώντας ως φυσικό εμπόδιο. Τέτοια παραδείγματα είναι το κέλυφος των αυγών, η φλούδα των φρούτων κ.α. Οι βιολογικές αυτές δομές δεν αποτρέπουν την επιβίωση των μικροοργανισμών στην επιφάνειά τους με αποτέλεσμα η μερική ή πλήρη καταστροφή τους σε κάποιο στάδιο της συλλογής, μεταφοράς, επεξεργασίας ή αποθήκευσής τους να συνεπάγεται την

είσοδο και την ανάπτυξη των μικροοργανισμών στο τρόφιμο (Barer et al., 1999; Jay, 2000, Legnani et al., 2005).

### 1.2.2.2 Εξωγενείς παράγοντες

Οι εξωγενείς παράγοντες, αφορούν παράγοντες που βρίσκονται στο περιβάλλον και επηρεάζουν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών στο τρόφιμο. Οι εξωγενείς παράγοντες είναι η θερμοκρασία, η συσκευασία και η παρουσία άλλων μικροοργανισμών (Barer et al., 1999).

#### α) Θερμοκρασία

Η θερμοκρασία του περιβάλλοντος είναι από τους κυριότερους παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη των μικροβίων στα τρόφιμα. Υπάρχει ένα μεγάλο εύρος θερμοκρασιών, όπου μπορούν να αναπτυχθούν τα μικρόβια (Jay, 2000). Για κάθε μικροοργανισμό υπάρχει μια μέγιστη και μια ελάχιστη θερμοκρασία, όπου μπορεί να αναπτυχθεί και μια βέλτιστη θερμοκρασία, όπου παρατηρείται η μέγιστη ανάπτυξη. Ανάλογα με τη βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης οι μικροοργανισμοί χωρίζονται σε τρεις κύριες: θεرمόφιλοι, μεσόφιλοι και ψυχρόφιλοι (Montiville et al., 2001). Οι θεرمόφιλοι χαρακτηρίζονται από την ικανότητα ανάπτυξης σε υψηλές θερμοκρασίες (βέλτιστη ανάπτυξη 55-65°C). Στην ομάδα αυτή ανήκουν οι σπορογόνοι μικροοργανισμοί (*Clostridium*, *Bacillus*), οι οποίοι παρουσιάζουν ιδιαίτερη σημασία για τα τρόφιμα και κυρίως στα κονσερβοποιημένα τρόφιμα (Mossel et al., 1995). Στους μεσόφιλους υπάγονται οι μικροοργανισμοί που αναπτύσσονται σε μια μέση θερμοκρασία (βέλτιστη ανάπτυξη 30-45°C). Στην κατηγορία αυτή ανήκουν διάφοροι μικροοργανισμοί που προκαλούν αλλοιώσεις στα τρόφιμα καθώς και πολλά από τα σημαντικότερα τροφιμογενή παθογόνα βακτήρια, όπως *Escherichiacoli*, *Salmonellaspp.*, *S. aureus* (Gorris, 2005). Τέλος, οι ψυχρόφιλοι περιλαμβάνουν μικροοργανισμούς όπως το *Corynobacterium*, *Pseudomonas*, *Shewanella* κ.α. Οι μικροοργανισμοί μπορούν και αναπτύσσονται σε θερμοκρασίες ψύξης, με αποτέλεσμα να προκαλούν αλλοιώσεις στα τρόφιμα όπως το κρέας, το γάλα, τα αλιεύματα που συντηρούνται υπό ψύξη (Μπαλατσούρας, 2006).

Πολλοί ερευνητές (Doyle, et al., 1997; Barer et al., 1999; Jay, 2000,) χρησιμοποιούν επίσης και τον όρο ψυχρότροφοι για μικροοργανισμούς που αναπτύσσονται σε χαμηλές θερμοκρασίες, αλλά έχουν μεγαλύτερη μέγιστη θερμοκρασία ανάπτυξης από τα ψυχρόφιλα. Τέτοιοι μικροοργανισμοί, όπως η *L.monocytogenes*, παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τα τρόφιμα που συντηρούνται στην ψύξη.

Σε θερμοκρασία χαμηλότερη από την ελάχιστη θερμοκρασία ανάπτυξης επιβραδύνεται η ενζυμική λειτουργία και μειώνεται η διαπερατότητα της κυτταροπλασματικής μεμβράνης με αποτέλεσμα να επιβραδύνεται ο πολλαπλασιασμός των μικροοργανισμών. Αντίστοιχα, σε θερμοκρασία μεγαλύτερη από τη μέγιστη θερμοκρασία ανάπτυξης, επέρχεται μετουσίωση των πρωτεϊνών των κυττάρων (Montiville et al., 2001).

## **β) Συνθήκες συντήρησης – Σχετική υγρασία**

Η σχετική υγρασία του περιβάλλοντος έχει άμεση σχέση με την ενεργότητα ύδατος  $a_w$  του τροφίμου. Οι δυο παράμετροι έχουν άμεση αλληλεπίδραση με φυσική τάση προς εξισορρόπηση των τιμών τους. Για παράδειγμα, τρόφιμα με χαμηλή τιμή  $a_w$ , όπως τα αποξηραμένα τρόφιμα, όταν αποθηκευτούν σε ατμόσφαιρα υψηλής σχετικής υγρασίας μεταφέρεται νερό από την αέρια φάση στα τρόφιμα προκαλώντας αύξηση της τιμής  $a_w$  (Αμβροσιάδης, 2004). Γενικά τα τρόφιμα είναι σημαντικό να συντηρούνται σε σωστά ρυθμισμένες συνθήκες ΣΥ ανάλογα με το είδος των τροφίμων, αλλά και το στάδιο της συντήρησης τους για την αποφυγή ανάπτυξης μικροοργανισμών ή την απώλεια των επιθυμητών οργανοληπτικών χαρακτηριστικών τους.

## **γ) Συσκευασία**

Η συσκευασία των τροφίμων λειτουργεί σαν φραγμός ανάμεσα στο περιβάλλον και τα τρόφιμα, με αποτέλεσμα την προστασία του από διάφορους μικροοργανισμούς και φυσικούς παράγοντες, όπως η σκόνη (ICMSF, 1996).

Στον τομέα της τεχνολογίας τροφίμων έχει αναπτυχθεί μια πληθώρα από τεχνολογίες που αφορούν στη συσκευασία των τροφίμων με στόχο τον περιορισμό της ανάπτυξης των μικροοργανισμών που προκαλούν αλλοιώσεις στα τρόφιμα και την αύξηση της ασφάλειάς τους (Mossel et al., 1995).

Η συσκευασία υπό κενό επιτυγχάνεται με απομάκρυνση του αέρα της συσκευασίας. Η απουσία του οξυγόνου αποτρέπει την ανάπτυξη των αερόβιων μικροβίων, με αποτέλεσμα την παράταση του χρόνου συντήρησης του τροφίμου. Ωστόσο, η απουσία του οξυγόνου από τη συσκευασία μπορεί να ευνοήσει την ανάπτυξη των αναερόβιων μικροβίων (Barer et al., 1999).

Μια άλλη μέθοδος, με ευρεία εφαρμογή είναι η συσκευασία των τροφίμων σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα (MAP). Χρησιμοποιείται ιδιαίτερα για τη συσκευασία κρεάτων και κρεατοσκευασμάτων. Η μέθοδος στηρίζεται στην απομάκρυνση του αέρα της συσκευασίας και την αντικατάστασή του με μίγμα αερίων σε διαφορετική αναλογία. Συνήθως χρησιμοποιούνται το διοξείδιο του άνθρακα ( $\text{CO}_2$ ), το άζωτο ( $\text{N}_2$ ) και το οξυγόνο ( $\text{O}_2$ ) (Gorris, 2005).

Το  $\text{CO}_2$  έχει ανασταλτική δράση στην ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Η παρουσία του επιμηκύνει τη φάση προσαρμογής των μικροοργανισμών και επιβραδύνει τις μεταβολικές των δραστηριότητες. Δρα έμμεσα στη ανάπτυξη των μικροοργανισμών μέσω της πτώσης του pH στα τρόφιμα, καθώς κατά τη διάλυση του στα τρόφιμα σχηματίζει ανθρακικό οξύ (Jay, 2000). Το  $\text{O}_2$  ευνοεί την ανάπτυξη των αερόβιων μικροοργανισμών, ενώ αναστέλλει την ανάπτυξη των αναερόβιων. Διατηρεί επίσης το κόκκινο χρώμα στο κρέας, αλλά παρουσιάζει οξειδωτική δράση στα τρόφιμα (Barer et al., 1999). Το  $\text{N}_2$  χρησιμοποιείται κυρίως για την αντικατάσταση του  $\text{O}_2$  σε διάφορες συσκευασίες με σκοπό την αναστολή της ανάπτυξης των αερόβιων μικροοργανισμών και την επιβράδυνση της οξειδωτικής δράσης (ICMSF, 1996).

#### δ) Παρουσία και δράση άλλων μικροοργανισμών

Στα τρόφιμα ένας σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει την ανάπτυξη των μικροοργανισμών είναι η αλληλεπίδραση των διαφόρων μικροοργανισμών που υπάρχουν στο τρόφιμο. Ιδιαίτερη σημασία έχουν οι ανταγωνιστικές διεργασίες μεταξύ των μικροοργανισμών που υπάρχουν σε ένα τρόφιμο και συνήθως περιλαμβάνουν τον ανταγωνισμό για τα θρεπτικά συστατικά, για τις θέσεις συνδέσεως / προσκόλλησης κ.α. (Montville and Matthews, 2010).

Η επικράτηση κάποιων μικροβίων σε ένα τρόφιμο προκαλεί την κατανάλωση των θρεπτικών συστατικών που είναι διαθέσιμα για την ανάπτυξη των άλλων μικροοργανισμών. Παράδειγμα αποτελεί ο *S. aureus*. Πρόκειται για ένα μικροοργανισμό που βρίσκεται σε πολλά τρόφιμα, ωστόσο η παραγωγή των εντεροτοξινών του δεν είναι τόσο συχνή, καθώς οι άλλοι παρόντες μικροοργανισμοί καταναλώνουν πιο γρήγορα τα θρεπτικά συστατικά που παρέχει το τρόφιμο, εμποδίζοντας έτσι την ανάπτυξή του και την παραγωγή των τοξινών του (Jay, 2000; Mossel et al., 1995).

Η επικράτηση μιας ομάδας βακτηρίων σε ένα τρόφιμο μπορεί να επηρεάσει και με άλλους τρόπους την ανάπτυξη άλλων μικροοργανισμών. Συνεπώς η ανάπτυξη παθογόνων ή άλλων μικροοργανισμών στα τρόφιμα επηρεάζεται από τη μικροχλωρίδα του τροφίμου ή από άλλους μικροοργανισμούς που χρησιμοποιούνται στη τεχνολογία παρασκευής τους, όπως η οξυγαλακτική καλλιέργεια. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια αποτελούν μία ομάδα βακτηρίων μέγιστης σημασίας για την παραγωγή προϊόντων ζύμωσης από το γάλα, το κρέας, τα λαχανικά και τα δημητριακά, λόγω της οξίνισης που επιφέρουν, η οποία έχει σαν τελικό αποτέλεσμα την αύξηση του χρόνου ζωής των προϊόντων. Τα βακτήρια αυτά πέρα από την σημαντική συμβολή τους στη διαμόρφωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των προϊόντων συμβάλλουν στη συντήρηση του προϊόντος, μέσω ανταγωνισμού με τους μικροοργανισμούς των τροφίμων, κυρίως λόγω της παραγωγής γαλακτικού οξέος, οξικού οξέος, αλκοόλης, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> και βακτηριοσινών (Ross et al. 2002). Οι βακτηριοσίνες είναι πεπτίδια ή πρωτεΐνες με αντιμικροβιακή δράση. Αρκετές βακτηριοσίνες είναι δραστικές έναντι αλλοιογόνων και παθογόνων βακτηρίων, όπως είναι το *Clostridium* spp, ο *S. aureus* και η *L. monocytogenes* (Ennahar et al. 2000).

Η αλληλεπίδραση των μικροοργανισμών στα τρόφιμα μπορεί να έχει και θετική επίδραση για την ανάπτυξη τους με πολλούς τρόπους. Πολλοί μικροοργανισμοί χρησιμοποιούν για την ανάπτυξη τους τα προϊόντα του μεταβολισμού άλλων μικροοργανισμών. Η ανάπτυξη των αερόβιων μικροοργανισμών έχει ως αποτέλεσμα την κατανάλωση του οξυγόνου O<sub>2</sub> με αποτέλεσμα τη δημιουργία ευνοϊκών συνθηκών για την ανάπτυξη των αναερόβιων μικροοργανισμών. Η ανάπτυξη κάποιων μικροοργανισμών, όπως οι ζύμες και οι μύκητες προκαλούν άνοδο του pH, ευνοώντας την ανάπτυξη μικροοργανισμών, όπως το *Clostridium botulinum*, που διαφορετικά δε θα μπορούσαν να αναπτυχθούν (Jay, 2000; Morris, 2000).

## 1.3 Μικροοργανισμοί δείκτες της υγιεινής και ασφάλειας των τροφίμων

### 1.3.1 Μικροβιολογικά κριτήρια ασφάλειας και ποιότητας των τροφίμων

Οι μικροοργανισμοί όταν αναπτύσσονται στα τρόφιμα τα αλλοιώνουν ή αν πρόκειται για τροφιμογενείς παθογόνους μικροοργανισμούς τα καθιστούν επικίνδυνα για τους καταναλωτές. Τα τρόφιμα θεωρούνται ασφαλή για κατανάλωση όταν είναι απαλλαγμένα από κάποιους παθογόνους μικροοργανισμούς ή προϊόντα αυτών, όπως οι τοξίνες. Για ορισμένους παθογόνους μικροοργανισμούς δεν απαιτείται η απουσία τους ώστε το τρόφιμο να θεωρηθεί ασφαλές, αλλά πρέπει οι πληθυσμοί των μικροοργανισμών αυτών να είναι χαμηλότεροι από ένα όριο ασφαλείας. Επειδή όμως, ο προσδιορισμός των παθογόνων μικροοργανισμών είναι μια ακριβή και χρονοβόρα διαδικασία, πρακτικά προσδιορίζονται στο τρόφιμο κάποιοι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται ως δείκτες. Οι αριθμοί των μικροοργανισμών που σχετίζονται με ένα τρόφιμο μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μικροβιολογικά κριτήρια για τη μικροβιολογική ασφάλεια και τη ποιότητα του τροφίμου. Τα μικροβιολογικά κριτήρια χρησιμοποιούνται για τη διάκριση μεταξύ ενός αποδεκτού από ένα μη αποδεκτό προϊόν και τη διάκριση μεταξύ αποδεκτών από μη αποδεκτές πρακτικές επεξεργασίας τροφίμων, διασφαλίζοντας ότι ένα προϊόν έχει παραχθεί κάτω από σωστές συνθήκες υγιεινής και ότι από μικροβιολογικής άποψης μπορεί να καταναλωθεί (Jay, 2000; Montville and Matthews, 2010).

Μικροβιολογικό κριτήριο, σύμφωνα με τον Κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 2073/2005, ορίζεται το κριτήριο που καθορίζει το αποδεκτό ενός προϊόντος, μιας παρτίδας τροφίμων ή μιας διαδικασίας, με βάση την απουσία, την παρουσία ή τον αριθμό μικροοργανισμών, ή/και με βάση την ποσότητα των τοξινών ή μεταβολιτών τους, ανά μονάδα μάζας, όγκου, επιφάνειας ή ανά παρτίδα.

Όπως προαναφέρθηκε παραπάνω, τα μικροβιολογικά κριτήρια χρησιμοποιούνται για να οριστεί η ασφάλεια και η ποιότητα ενός τροφίμου. Η ασφάλεια ορίζεται από την απουσία, την παρουσία ή το επίπεδο των παθογόνων μικροοργανισμών, ενώ στο επίπεδο των αλλοιογόνων μικροοργανισμών αντανακλάται η ποιότητα του τροφίμου και η αποτελεσματικότητα της σωστής τήρησης των ορθών βιομηχανικών πρακτικών. Ως εκ τούτου, προκύπτουν δυο μικροβιολογικά κριτήρια. Τα κριτήρια ασφάλειας των τροφίμων και τα κριτήρια υγιεινής της παραγωγικής διαδικασίας (Pierson et al., 1992).

Σύμφωνα με τον Κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 2073/2005, κριτήριο ασφαλείας των τροφίμων είναι το κριτήριο που καθορίζει το αποδεκτό ενός προϊόντος ή μιας παρτίδας και το οποίο εφαρμόζεται στα προϊόντα που διατίθενται στην αγορά. Κριτήριο υγιεινής της παραγωγικής διαδικασίας είναι το κριτήριο που καθορίζει την αποδεκτή λειτουργία της παραγωγικής διαδικασίας. Δεν εφαρμόζεται δηλαδή σε προϊόντα που διατίθενται στην αγορά, αλλά ορίζει μια ενδεικτική τιμή, πάνω από την οποία απαιτούνται διορθωτικές ενέργειες της παραγωγικής διαδικασίας.

Ένα μικροβιολογικό κριτήριο θα πρέπει να θεσπίζεται ως ανταπόκριση σε συγκεκριμένες ανάγκες, να είναι πρακτικό και αποτελεσματικό και να δηλώνει ποιός μικροοργανισμός, ομάδα μικροοργανισμών ή τοξίνη καλύπτεται από το συγκεκριμένο κριτήριο. Θα πρέπει επίσης, να αναφέρει κατά πόσο θα είναι απών ή παρών ένας

συγκεκριμένος μικροοργανισμός στο τρόφιμο, και ποιό είναι το αριθμητικό του όριο σε ένα συγκεκριμένο τρόφιμο. Τα μικροβιολογικά κριτήρια θα πρέπει τέλος, να αναπτύσσονται όταν η εφαρμογή τους μειώνει ή εξαλείφει ένα μικροβιακό τροφιμογενές κίνδυνο και πιστοποιεί ότι η διαδικασία της παρασκευής του είναι κατάλληλη για την εξάλειψη του κινδύνου (Randell et al., 1997; Jay, 2000).

Τα μικροβιολογικά κριτήρια μπορούν να είναι είτε υποχρεωτικά, είτε συμβουλευτικά. Ένα υποχρεωτικό κριτήριο είναι ένα κριτήριο το οποίο δεν επιτρέπει την υπέρβαση του ορίου που θέτει, ενώ ένα συμβουλευτικό κριτήριο μας βοηθάει να κρίνουμε αν αποδεχτούμε ή όχι ένα τρόφιμο.

### **1.3.2 Μικροβιολογικά όρια**

Τα μικροβιολογικά όρια, δείχνουν το όριο πάνω από το οποίο απαιτούνται διορθωτικές παρεμβάσεις. Τα όρια πρέπει να είναι ρεαλιστικά και να καθορίζονται βάσει της διεθνούς βιβλιογραφίας όσον αφορά τις πρώτες ύλες, τις συνθήκες επεξεργασίας, χειρισμού, αποθήκευσης, τελικής διάθεσης και κατανάλωσης του προϊόντος. Θα πρέπει να λαμβάνεται επίσης υπόψη ο κίνδυνος που σχετίζεται με ένα τρόφιμο και κάποιους συγκεκριμένους μικροοργανισμούς (Montville and Matthews, 2010).

Τα μικροβιολογικά όρια καθορίζουν επίσης τη διάρκεια ζωής των τροφίμων. Γενικά, ισχύει ότι ένα τρόφιμο με μεγάλο πληθυσμό αλλοιογόνων μικροοργανισμών έχει μικρότερη διάρκεια ζωής, από ότι αν έχει μικρότερο αριθμό. Τα τρόφιμα που παράγονται βάσει Ορθής Βιομηχανικής Πρακτικής (Good Manufacturing Practices - GMP) είναι αναμενόμενο να παρουσιάζουν καλύτερο μικροβιολογικό προφίλ σε σχέση με τρόφιμα που παράγονται κάτω από ελλιπείς συνθήκες υγιεινής και ασφάλειας. Τα στάδια επεξεργασίας των τροφίμων, όπως η θέρμανση, η ζύμωση, η κατάψυξη μπορούν επιπλέον να μειώσουν τον αριθμό των μικροοργανισμών (Pierson et al., 1992). Ωστόσο, ανάλογα με τον παθογόνο μικροοργανισμό, τα χαμηλά επίπεδα του μπορεί να είναι ή να μην είναι ανησυχητικά, καθώς μερικοί μικροοργανισμοί έχουν τόσο μεγάλη μολυσματική δόση ώστε και η παρουσία τους μόνο στο τρόφιμο να αποτελεί κίνδυνο. Για αυτούς τους μικροοργανισμούς σημασία δεν έχει η ικανότητα τους να πολλαπλασιάζονται στο τρόφιμο, αλλά η ικανότητα τους να επιβιώνουν στο τρόφιμο (Jay, 2000).

### **1.3.3 Μικροοργανισμοί δείκτες της υγιεινής και ασφάλειας των τροφίμων**

Οι μικροοργανισμοί δείκτες χρησιμοποιούνται ως τα μικροβιολογικά κριτήρια. Η παρουσία των δεικτών σημαίνει την παρουσία μικροβιακού κινδύνου που προέκυψε από την αποτυχία επεξεργασίας, την επιμόλυνση του κατά την επεξεργασία, τη μόλυνση από το περιβάλλοντα χώρο και τις γενικές συνθήκες κάτω από τις οποίες το τρόφιμο επεξεργάστηκε (Randell et al., 1997).

Οι μικροοργανισμοί δείκτες είναι ομάδες ή είδη μικροοργανισμών που θα πρέπει να πληρούν κάποια χαρακτηριστικά, όπως (ICMSF, 1996) :

- να είναι παρόντες και ανιχνεύσιμοι σε όλα τα τρόφιμα στα οποία πρόκειται να γίνει η εκτίμηση της ποιότητας τους
- η αύξηση τους θα πρέπει να έχει άμεση σχέση με την ποιότητα του τροφίμου
- να μπορούν εύκολα και με ακρίβεια να προσδιορίζονται και να διαφοροποιούνται από άλλους μικροοργανισμούς ακόμα και αν βρίσκονται σε χαμηλούς πληθυσμούς
- να μπορούν να αριθμηθούν σε σχετικά σύντομο χρονικό διάστημα
- να έχουν ιστορικό συσχέτισης με τον παθογόνο τον οποίο πρόκειται να υποδείξουν
- να παρουσιάζεται όταν παρουσιάζεται και το παθογόνο που μας απασχολεί και τα νούμερα του να σχετίζονται με αυτά του παθογόνου
- ο ρυθμός αύξησης και μείωσης του να σχετίζεται με αυτά του παθογόνου και τέλος,
- να απουσιάζει από τα τρόφιμα που απουσιάζει και ο παθογόνος μικροοργανισμός.

Στη συνέχεια παρουσιάζονται οι κυριότερες ομάδες μικροοργανισμών που χρησιμοποιούνται ως δείκτες της υγιεινής και της ασφάλειας των τροφίμων.

### 1.3.3.1. Ολική Μικροβιακή Χλωρίδα και Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα

Η μέτρηση της ολικής μικροβιακής χλωρίδας αντανακλά στο συνολικό αριθμό των μικροοργανισμών σε ένα τρόφιμο και η καταμέτρησή της βασίζεται στην υπόθεση ότι κάθε μικροβιακό κύτταρο θα σχηματίσει μια ορατή αποικία, όταν καλλιεργηθεί σε θρεπτικό υπόστρωμα. Πιο συχνά στα τρόφιμα προσδιορίζεται ο αριθμός των αερόβιων μεσόφιλων βακτηρίων, για τον οποίο χρησιμοποιείται ο όρος Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (OMX) και περιλαμβάνει αερόβιους μικροοργανισμούς που αναπτύσσονται μεταξύ 20 – 45°C, με βέλτιστη θερμοκρασία τους 32°C (Freitas et al., 2009). Με τον προσδιορισμό της OMX μπορεί να εκτιμηθεί η συμβατότητα με τη νομοθεσία, τους κανόνες της Ορθής Βιομηχανικής Πρακτικής (GMP) και της Ορθής Υγιεινής Πρακτικής (Good Hygiene Practices, GHP).

Σύμφωνα με τον Κανονισμό (ΕΚ) 2073/2005 περί μικροβιολογικών κριτηρίων για τα τρόφιμα, ο προσδιορισμός της OMX αποτελεί κριτήριο υγιεινής για τα σφάγια αιγοπροβάτων, βοειδών, αλόγων και χοίρων μετά τον καθαρισμό και πριν την ψύξη τους. Αποτελεί, επίσης κριτήριο υγιεινής για τον κιμά και για το μηχανικά επεξεργασμένο κρέας στο τέλος της παραγωγικής τους διαδικασίας. Σε κάθε περίπτωση μη τήρησης των ορίων, απαιτούνται διορθωτικά μέτρα ελέγχου και επανεξέτασης της διαδικασίας παραγωγής τους.

Η OMX μπορεί να αποτελέσει ακόμη, δείκτη υγιεινής κατάστασης τροφίμων που δεν ευνοείται η ανάπτυξη μικροοργανισμών, ενώ στα ναυπά τρόφιμα η μέτρηση της OMX ανταποκρίνεται στο χρόνο ζωής του τροφίμου καθώς, τέτοια τρόφιμα έχουν εν γένει πολλούς μικροοργανισμούς. Στα τελευταία, η μέτρηση μικρού αριθμού OMX δεν αποτελεί κριτήριο για τη μη ύπαρξη παθογόνων μικροοργανισμών (Jay, 2000).

Ο προσδιορισμός της OMX δε συνίσταται ως κριτήριο υγιεινής σε ζυμούμενα τρόφιμα

(τυρί, γιαούρτι κλπ), καθώς στα τρόφιμα αυτά προστίθενται οξυγαλακτικά βακτήρια κατά την παρασκευή τους. Επίσης στα κατεψυγμένα τρόφιμα δεν προτείνεται η μέτρηση της OMX, καθώς τα μεσόφιλα βακτήρια δεν αναπτύσσονται σε θερμοκρασίες ψύξης (Γκοβαρης και συν., 2009). Στα θερμικά επεξεργασμένα τρόφιμα, στα οποία αναμένεται χαμηλός αριθμός OMX λόγω της καταστροφής των μικροοργανισμών από τη θερμοκρασία, πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή κατά το χειρισμό τους για να μην επιμολυνθούν από μικρόβια.

Γενικά, μεγάλος αριθμός OMX ( $>10^6 - 10^8$  cfu/g) σε ένα τρόφιμο συνδέεται με μη σωστή τήρηση των κανόνων υγιεινής στην παραγωγική διαδικασία και αποτελεί ένδειξη πιθανής αλλοίωσης.

### 1.3.3.2 Εντεροβακτηριακά

Ως εντεροβακτηριακά καλούνται Gram (-) αρνητικά βακτηρίδια, προαιρετικά αναερόβια, που διασπούν τη γλυκόζη προς παραγωγή οξέος και αερίου. Βάσει των παραπάνω βιοχημικών χαρακτηριστικών γίνεται η ταυτοποίηση και αρίθμηση τους. Πρόκειται για κινητά βακτήρια, που κινούνται με τη βοήθεια περιτρίχων βλεφαρίδων. Αναπτύσσονται σε θερμοκρασία 22 – 45°C, παρουσία χολικών αλάτων, τα οποία αναστέλλουν την ανάπτυξη των Gram (+) βακτηρίων. Βρίσκονται στον εντερικό σωλήνα των ανθρώπων και των ζώων, στο νερό και το έδαφος (Παπαπαναγιώτου και Κυριαζοπούλου-Δαλαινά, 2004).

Στην οικογένεια των εντεροβακτηριακών ανήκουν πολλά γένη μικροβίων, όπως *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *Citrobacter*, *E.coli*, *Proteus*, *Enterobacter*, *Klebsiella* κ.α., μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονται και τροφιμογενή παθογόνα βακτήρια (*Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*), αποτελώντας κίνδυνο για τη δημόσια υγεία, ενώ άλλα αποτελούν σημαντικά αλλοιογόνους παράγοντες για πολλά τρόφιμα, όπως το κρέας, τα αλιεύματα, το γάλα, τα γαλακτοκομικά προϊόντα κ.α. (Baylis et al., 2011). Σύμφωνα με τον Κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 2073/2005 τρόφιμα (όπως τροποποιήθηκε από τον Κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 1441/2007 και τον Κανονισμό (ΕΕ) αριθ. 365/2010) τα εντεροβακτηριακά αποτελούν κριτήριο της υγιεινής της παραγωγικής διαδικασίας για διάφορα προϊόντα.

Η μέτρηση των εντεροβακτηριακών αποτελεί δείκτη υγιεινής για τα επεξεργασμένα τρόφιμα, όπως τα μαγειρεμένα τρόφιμα, τα τρόφιμα με βάση το κρέας και τα αυγά, στα οποία η παρουσία των εντεροβακτηριακών υποδεικνύει μόλυνση μετά την επεξεργασία. Για τα σφάγια ο περιορισμός της μόλυνσης από εντεροβακτηριακά μπορεί να επιτευχθεί με την τήρηση των κανόνων Ορθής Γεωργικής Πρακτικής (Good Agricultural Practice-GAP) κατά την πρωτογενή παραγωγή και της Ορθής Υγιεινής Πρακτικής (GHP) κατά τη διάρκεια της σφαγής, ενώ ο έλεγχος της αποτελεσματικότητας τους μπορεί να εκτιμηθεί με τον προσδιορισμό των εντεροβακτηριακών μετά τον καθαρισμό των σφάγιων και πριν την ψύξη. Για τα επεξεργασμένα τρόφιμα, όπως τα μαγειρεμένα τρόφιμα, και τα τρόφιμα με βάση το γάλα, το κρέας και τα αυγά ο έλεγχος της ορθής επεξεργασίας τους μπορεί να εκτιμηθεί με τον προσδιορισμό των εντεροβακτηριακών στο τέλος της παραγωγικής διαδικασίας, στο τελικό προϊόν. Επιπλέον ασφάλεια μπορεί να εξασφαλιστεί με την εφαρμογή του συστήματος Ανάλυσης Κινδύνου Κρίσιμων Σημείων Ελέγχου (HazardAnalysisCriticalControlPoint. HACCP) και της Ορθής Βιομηχανικής



Πρακτικής (GMP) (Baylis et al., 2011).

### 1.3.3.3 Κολοβακτηριοειδή/*E. coli*

Μικροβιολογικό δείκτη υγιεινής αποτελούν τα κολοβακτηριοειδή και η *E. coli*. Τα κολοβακτηριοειδή ανήκουν στην οικογένεια των εντεροβακτηριακών, με τη διαφορά ότι ζυμώνουν επιπλέον και τη λακτόζη στους 37° C προς παραγωγή οξέος και αερίου και βάσει αυτού του χαρακτηριστικού διαφοροποιούνται και ταχτοποιούνται (Παπαπαναγιώτου και Κυριαζοπούλου-Δαλαϊνά, 2004). Τα κολοβακτηριοειδή, σύμφωνα με τον Κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 2073/2005 αποτελούν κριτήριο υγιεινής της παραγωγικής διαδικασίας για τα έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα που συντηρούνται στην ψύξη, συσχετιζόμενα με επιμόλυνση από το εγγύς περιβάλλον.

Στα κολοβακτηριοειδή ανήκει μια υποκατηγορία μικροοργανισμών, τα κολοβακτηρίδια εντερικής προέλευσης, τα οποία έχουν τη δυνατότητα να αναπτύσσονται στους 44°C, και η παρουσία τους στα τρόφιμα είναι ενδεικτική κοπρανώδους μόλυνσης.

Στα κολοβακτηρίδια εντερικής προέλευσης ανήκει η *E. coli*, η οποία διαφοροποιείται από τα υπόλοιπα κολοβακτηρίδια εντερικής προέλευσης με τη δοκιμή της ινδόλης και της β-γλυκουρονιδάσης. Αποτελεί δείκτη κοπρανώδους μόλυνσης στα τρόφιμα και παρότι αποτελεί μικροοργανισμό της φυσιολογικής χλωρίδας του εντέρου του ανθρώπου και των ζώων, μερικά στελέχη είναι παθογόνα. Στα νωπά τρόφιμα ζωϊκής προέλευσης μπορεί να βρεθεί κατά τη διαδικασία της σφαγής. Η παρουσία της στα λαχανικά και τα φρούτα αποτελεί ένδειξη επιμόλυνσης, στα θερμικά επεξεργασμένα τρόφιμα ένδειξη προβλήματος στην παραγωγική διαδικασία ή επιμόλυνσής τους κατά τους χειρισμούς τους στις εγκαταστάσεις επεξεργασίας τροφίμων (Jay, 2000).

Σύμφωνα με τον Κανονισμό (ΕΚ) 2073/2005, η *E. coli* αποτελεί κριτήριο ασφάλειας για τα δίθυμα μαλάκια, ζώντα εχινόδερμα χιτωνόζωα, και γαστερόποδα. Αποτελεί κριτήριο υγιεινής για τον κιμά, το μηχανικά διαχωρισμένο κρέας και τα παρασκευάσματα κρέατος ως δείκτης κοπρανώδους επιμόλυνσης. Για τα τυριά από γάλα ή ορό γάλακτος που έχουν υποστεί θερμική επεξεργασία, το βούτυρο και την κρέμα από νωπό γάλα ή γάλα που έχει υποστεί θερμική επεξεργασία σε θερμοκρασία μικρότερη της παστερίωσης αποτελεί δείκτη υγιεινής στο τέλος της παραγωγικής διαδικασίας. Για τα προϊόντα με ή χωρίς κέλυφος βρασμένων μαλακόστρακων και μαλακίων, τα κομμένα φρούτα και λαχανικά και τους μη παστεριωμένους χυμούς φρούτων και λαχανικών που είναι έτοιμα προς κατανάλωση αποτελεί κριτήριο υγιεινής.

### 1.3.3.4 Εντερόκοκκοι

Το γένος *Enterococcus* περιλαμβάνει περισσότερα από 30 είδη. Πρόκειται για Gram (+) κόκκους, καταλάση αρνητικούς, εσκουλίνη θετικούς. Αναπτύσσονται σε θερμοκρασία μεταξύ 10 – 45°C, τιμές pH 4 – 9.6. Είναι είναι ανθεκτικά στην παρουσία NaCl (μπορούν να αναπτυχθούν σε συγκεντρώσεις NaCl 5 έως 10%) και σχετικά ανθεκτικά στην κατάψυξη, ενώ ορισμένα είδη εντερόκοκκων (*E. faecalis* και *E. faecium*) είναι

σχετικά ανθεκτικά και στη θέρμανση. Αποτελούν μικροοργανισμούς της μικροβιακής χλωρίδας του εντέρου, ενώ απομονώνονται επίσης από το περιβάλλον, το έδαφος, το νερό και τα τρόφιμα ως αποτέλεσμα επιμόλυνσης από κόπρανα (Παπαπαναγιώτου και Κυριαζοπούλου-Δαλαϊνά, 2004).

Στα τρόφιμα απαντώνται κυρίως δυο είδη εντεροκόκκων, ο *Enterococcus faecalis* και ο *Enterococcus faecium*, όπου είναι κυρίως εντερικής προέλευσης (Foulquie et al., 2006). Η ικανότητα τους να αναπτύσσονται σε ένα μεγάλο εύρος θερμοκρασιών, αλατότητας και pH τους δίνει τη δυνατότητα να πολλαπλασιάζονται σε πολλά τρόφιμα, καθιστώντας τους σημαντικόπαράγοντα αλλοίωσης (Foulquie et al., 2006). Επίσης, εκτός από τις αλλοιώσεις στα τρόφιμα, ορισμένα στελέχη, κυρίως του *E. faecalis* και λιγότερο του *E. faecium*, βρέθηκαν από τους Riboldi και συν. (2009) παθογόνα για τον άνθρωπο.

Λόγω της εντερικής τους προέλευσης και της αυξημένης ανθεκτικότητας τους στο περιβάλλον, οι εντερόκοκκοι αποτελούν δείκτη παλαιάς κοπρανώδους μόλυνσης των υδάτων. Όσον αφορά στα τρόφιμα αποτελούν καλύτερο δείκτη υγιεινής κοπρανώδους μόλυνσης. Οι Burton και συν. (1949) βρήκαν ότι ενώ τα κολοβακτηρίδια ήταν καλύτεροι δείκτες της υγιεινής πριν την κατάψυξη των τροφίμων, μετά την κατάψυξη τους και κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους οι εντερόκοκκοι ήταν καλύτεροι δείκτες.

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 : Τροφιμογενή Παθογόνα Βακτήρια**

### **2.1 *Salmonellaspp***

Το γένος *Salmonellaspp* περιλαμβάνει Gram αρνητικά βακτηρίδια, προαιρετικά αναερόβια που ανήκουν στην οικογένεια *Enterobacteriaceae*. Μπορούν να κινούνται με τη βοήθεια περιτρίχων μαστιγίων. Πρόκειται για χημειοοργανότροφα βακτήρια (χρησιμοποιούν οργανικά υποστρώματα), με την ικανότητα να μεταβολίζουν τα θρεπτικά συστατικά μέσω της αναπνευστικής και ζυμωτικής οδού. Η *Salmonella* διασπά τη γλυκόζη, τη μαννιτόλη και τη σορβιτόλη με παραγωγή αερίου, ενώ δε ζυμώνουν τη σακχαρόζη και την αδονιτόλη. Λίγα στελέχη *Salmonella* διασπούν τη λακτόζη. Δεν παράγουν ινδόλη και ουρεάση και είναι αρνητικές στην οξειδάση. Τέλος, παράγουν υδρόθειο και αποκαρβοξυλιώνουν τη λυσίνη και την ορνιθίνη. (Παπαπαναγιώτου και Κυριαζοπούλου-Δαλαινά, 2004)

Η σαλμονέλλωση στον άνθρωπο εκδηλώνεται με δύο μορφές. Η γαστρεντερίτιδα που προκαλείται από διάφορα στελέχη εκτός από τα *Salmonella Typhica* και *Salmonella Paratyphi* (Mossel et al., 1975). Η πλειονότητα των περιστατικών οφείλεται σε μολύνσεις από *S. Enteritidis* και *S. Typhimurium* που αντιπροσωπεύουν το 80% των σαλμονελλώσεων παγκοσμίως. Οι ορότυποι αυτοί προέρχονται κυρίως από τα ζώα.

Τα *S. Typhi* και *S. Paratyphi* A, B, C προκαλούν τυφοειδή πυρετό. Η μορφή αυτή συνήθως συνδέεται με το νερό και σποραδικά μόνο με τα τρόφιμα (Taylor et al., 1984). Η συχνότητά της μειώνεται συνεχώς λόγω βελτίωσης των συνθηκών υγιεινής.

#### **2.1.1 Ταξινόμηση και Ονοματολογία**

Αντιγονικά, στη *Salmonella* παρατηρούνται τα σωματικά αντιγόνα O, τα οποία είναι λιποπολυσακχαρίτες και τα βλεφαριδικά αντιγόνα H, που είναι πρωτεΐνες. Μερικοί τύποι *Salmonella* έχουν και ένα επιφανειακό αντιγόνο Vi. Σύμφωνα με τη ταξινόμηση που προτείνεται από το Κέντρο Αναφοράς Σαλμονελλών του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας για την ταξινόμηση *Salmonella* είναι απαραίτητη η μελέτη των σωματικών αντιγόνων O, βάσει του οποίου η *Salmonella* ταξινομείται στους διάφορους τύπους και η μελέτη των βλεφαριδικών αντιγόνων H, βάσει των οποίων η *Salmonella* υποδιαιρείται στους οροτύπους. Σχετικά με την ταξινόμηση το γένος της *Salmonella* περιλαμβάνει δυο είδη, τη *Salmonella enterica*, που είναι το χαρακτηριστικό είδος και τη *Salmonella bongori*. Πάνω από το 99% των οροτύπων *Salmonella* ανήκουν στο είδος *S. enterica*, οι οποίοι υποδιαιρούνται περαιτέρω σε έξι υποείδη: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae*, και *indica*. Οι ορότυποι που συνδέονται με την πρόκληση ασθενειών στον άνθρωπο ανήκουν ως επί το πλείστον στον ορότυπο *S. Enteric sub sp enterica*, στον οποίο ανήκουν οι περισσότεροι γνωστοί ορότυποι *Salmonella*. Γενικά, η *S. Enteric sub sp enterica* σχετίζεται με θερμόαιμα ζώα, ενώ τα άλλα υποείδη σχετίζονται με τα ψυχρόαιμα ζώα, όπως τα ερπετά, ενώ ανευρίσκονται και στο περιβάλλον (Παπαπαναγιώτου και Κυριαζοπούλου-Δαλαινά, 2004; Montville and

Matthews, 2010; Yasmine et al., 2014).

### 2.1.2 Κατανομή

Η *Salmonella* είναι βακτήριο του εντερικού σωλήνα των ανθρώπων, των θηλαστικών και των πτηνών. Το έντερο των ανθρώπων, των θηλαστικών και των πουλερικών είναι η φυσική δεξαμενή του βακτηρίου. Απαντάται ευρεία στο περιβάλλον, στο χώμα, στο νερό, στα θηλαστικά, στα τρωκτικά, τα ερπετά, τα έντομα και τον άνθρωπο. Συνήθως μεταδίδεται στον άνθρωπο με κατανάλωση τροφίμων που μολύνονται από κόπρανα ζώων. Τα ζώα μολύνονται από τα πτηνά και τα ερπετά, στη συνέχεια η κοπρία των ζώων, στην οποία αφθονεί η *Salmonella*, χρησιμοποιείται στα λαχανικά και με αυτόν τον τρόπο μεταφέρεται στον άνθρωπο. Τα αλιεύματα μολύνονται από τα απόβλητα που χύνονται στη θάλασσα (Fricker, 1987; Montville and Matthews, 2010)

Τα μολυσμένα τρόφιμα είναι συχνά ζωικής προέλευσης, αλλά μπορεί να επιμολυνθούν και φυτικά τρόφιμα όπως τα λαχανικά. Η κύρια πηγή *Salmonella* για τον άνθρωπο είναι τα πουλερικά και τα αυγά είναι ο συχνότερος φορέας. Τα αυγά μολύνονται εξωτερικά στο κέλυφος από τα κόπρανα των πουλερικών και εσωτερικά από το μολυσμένο γεννητικό σύστημα των πουλερικών (Yasmine et al., 2014).

Η ύπαρξη φορέων είναι ιδιαίτερης σημασίας για την μόλυνση, καθώς υπάρχει ο κίνδυνος επιμόλυνσης των τροφίμων από τους μολυσμένους χειριστές. Η αποβολή με τα κόπρανα σαλμονελών από τον άνθρωπο ακολουθεί συνήθως την οξεία φάση της ανθρώπινης σαλμονέλλωσης και μπορεί να είναι μικρής διάρκειας ή μπορεί να διαρκέσει ένα ή περισσότερα χρόνια εάν δεν εφαρμοστεί η κατάλληλη θεραπεία (χρόνιοι φορείς). Η μέση διάρκεια της αποβολής που ακολουθεί την οξεία μη τυφοειδή σαλμονέλλωση είναι περίπου 5 εβδομάδες και λιγότεροι από 1% των ασθενών παραμένουν χρόνια φορείς (Συμινελάκης και συν., 1986).

### 2.1.3 Συνθήκες ανάπτυξης

Η ομάδα των σαλμονελών αποτελείται από μικροοργανισμούς που προσαρμόζονται σε εξαιρετικά ακραίες συνθήκες περιβάλλοντος.

Αναπτύσσεται σε ένα μεγάλο εύρος θερμοκρασιών από 10<sup>0</sup>C – 50<sup>0</sup> C (Παπαπαναγιώτου και Κυριαζοπούλου-Δαλαϊνά, 2004). Ως βέλτιστη θεωρείται η θερμοκρασία των 37<sup>0</sup> C (Jay, 2000). Αναπτύσσεται σε τρόφιμα με τιμές  $a_w$  0,93 – 0,95 και τιμή pH από 4,5 – 9. Ενώ σε τιμές  $a_w \leq 0,93$  αναστέλλεται η ανάπτυξη των σαλμονελών (Jay, 2000).

Η ικανότητα των *Salmonella* spp. να προσαρμόζονται σε διάφορα περιβάλλοντα φαίνεται ιδιαίτερα στην ικανότητα να πολλαπλασιάζονται σε εύρος τιμών pH από 4,5 έως 9,5, με την βέλτιστη ανάπτυξη να παρατηρείται σε τιμές από 6,5 έως 7,5 (D' Aoust, 1991).

Αναπτύσσεται και πολλαπλασιάζεται σε περιβάλλον με συγκέντρωση NaCl 4% και νιτρικών 350 mg/L. Παρόλο που γενικά η ανάπτυξη των σαλμονελών αναστέλλεται σε

παρουσία 3-4% NaCl, η ανθεκτικότητα των στελεχών στο αλάτι αυξάνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας στο εύρος 10-30<sup>0</sup> C. Παρατηρήθηκε ανάπτυξη και σε άλμη 7-8% σε θερμοκρασία 37<sup>0</sup> C (Montville and Matthews, 2010).

#### 2.1.4 Επιβίωση

Η *Salmonella* θανατώνεται ύστερα από θέρμανση στους 55<sup>0</sup>C για 1 ώρα ή στο 60<sup>0</sup>C για μισή ώρα. Για προστασία από *Salmonella* συνίσταται η θέρμανση του τροφίμου στους 75<sup>0</sup>C για 10 λεπτά ώστε να φτάσει η θερμοκρασία μέχρι το γεωμετρικό κέντρο του τροφίμου (D'Aoust, 1991).

Υπάρχουν μεγάλες διαφορές στη θερμοανθεκτικότητα ανάλογα με το στέλεχος. Ως αρκετά θερμοευαίσθητο στέλεχος στο χοιρινό κρέας προσδιορίστηκε η *S. Kingston 1124* με τιμές D 2,79, 0,92 και 0,24 min στους 58<sup>0</sup> C, 60<sup>0</sup> C και 63<sup>0</sup> C, αντίστοιχα. Οι τιμές D για τη *S. Senftenberg* σε βόειο μπιτωτό υπολογίστηκαν σε 53, 15,17, 2,08 , και 0,22 min στους 53, 58, 63 και 68<sup>0</sup> C, αντίστοιχα, με τιμή z=6,24<sup>0</sup> C (D' Aoust, 2000). Οι τιμές D της *S. Senftenberg* έχουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον γιατί το στέλεχος *S. senftenberg 775W* είναι το πιο θερμοανθεκτικό (ICMSF, 1996). Η θερμοαντοχή του υπολογίζεται ως και 30 φορές μεγαλύτερη συγκριτικά με τη *S. Typhimurium* (Brenneretal., 2000). Η τιμή D για τη *S. Typhimurium* είναι φυσιολογικά χαμηλότερη από 1 min στους 60<sup>0</sup> C, όπως και για τους περισσότερους ορότυπους της *Salmonella*.

Η κατάψυξη προκαλεί μείωση του αρχικού πληθυσμού των σαλμονελών κατά 1-2 λογαρίθμους. Η επιβίωση κατά την κατάψυξη είναι μεγαλύτερη σε χαμηλότερες θερμοκρασίες (-30<sup>0</sup>C) συγκριτικά με τις υψηλότερες (-10<sup>0</sup>C) (Jay, 2000).

#### 2.1.5 Υποπτα τρόφιμα – Τρόπος μετάδοσης

Η σαλμονέλλωση θεωρείται ζωνόσος, καθώς η μόλυνση του ανθρώπου γίνεται από μολυσμένα ζώα, είτε μετά από άμεση επαφή, είτε έμμεσα μετά από κατανάλωση μολυσμένης τροφής. (Yasmine et al., 2014)

Η μόλυνση είναι συνήθως τροφιμογενής, ενώ στον αναπτυσσόμενο κόσμο μπορεί να ενοχοποιηθεί και το μολυσμένο πόσιμο νερό. Μετάδοση από άνθρωπο σε άνθρωπο, που γίνεται από την κοπρανοστοματική οδό, είναι σπάνια, λόγω της υψηλής μολυσματικής δόσης του μικροοργανισμού, ενώ μπορεί να μεταδοθεί στον άνθρωπο και με την άμεση επαφή με τα κατοικίδια ζώα. Ωστόσο η τροφιμογενής προέλευση της λοίμωξης είναι αυτή που αναγνωρίζεται ως η πιο συχνή και συμβαίνει μετά από κατανάλωση προϊόντων μολυσμένων ζώων, κυρίως αυγών, κρέας πουλερικών, χοιρινό κρέας και βόειο κρέας. Τα ζώα μπορούν να μολυνθούν από μολυσμένες ζωοτροφές, ή μέσω της επαφής με άγρια ζώα στο αγρόκτημα. Κατά τη σφαγή μπορεί να γίνει διασταυρούμενη μόλυνση μη μολυσμένου κρέατος από μολυσμένο κρέας, ενώ στο λιανικό εμπόριο μπορεί να μολυνθεί κατά τη διάρκεια λάθος χειρισμών. Σημαντικός τρόπος μετάδοσης αποτελεί και η μόλυνση που λαμβάνει χώρα στα σπίτια ή τις εστίες σίτισης, μέσω μη διαχωρισμού του ωμού κρέατος με τα συστατικά της σαλάτας, ή την ατελή θερμική

επεξεργασία του κρέατος και των αυγών (Montville and Matthews, 2010).

Τα αυγά αποτελούν σημαντική πηγή μόλυνσης του ανθρώπου από *Salmonella*. Το παθογόνο βρίσκεται τόσο στο εσωτερικό, όσο και στο εξωτερικό του αυγού και σε αντίθεση με τα κρέατα, τα αυγά πολλές φορές καταναλώνονται ωμά (μαγιονέζα) ή μετά από μερική θερμική επεξεργασία. Τα περιστατικά που οφείλονται στον ορότυπο *S. Enteritidis* συνδέονται με την κατανάλωση νωπών ή ελαφρώς μαγειρεμένων αυγών και προϊόντων με αυγά, τονίζοντας τη σημασία των αυγών ως αίτιο της ανθρώπινης σαλμονέλλωσης και την ανάγκη μείωσης του ποσοστού μόλυνσης.

Το χοιρινό κρέας και τα προϊόντα χοιρινού κρέατος αποτελούν επίσης σημαντική πηγή μόλυνσης του ανθρώπου από *Salmonella*. Το 10-20% των κρουσμάτων *Salmonella* στον άνθρωπο οφείλεται στο χοιρινό κρέας. (D' Aoust, 1994).

Όλοι οι γνωστοί ορότυποι σαλμονελλών είναι δυνατόν να βρεθούν στο γάλα ως αποτέλεσμα επιμόλυνσης από τα κόπρανα των ζώων, το περιβάλλον της εκτροφής, το νερό ή και τους ανθρώπους φορείς. Συχνά ανευρίσκονται ορότυποι που απαντούν στο έντερο των γαλακτοπαραγωγών ζώων. Αρκετά περιστατικά σαλμονέλλωσης αποδόθηκαν σε κατανάλωση γάλακτος και γαλακτοκομικών προϊόντων. Κυρίως ενοχοποιείται το απαστερίωτο γάλα και η σκόνη γάλακτος. Οι σαλμονέλλες δεν επιζούν μετά την παστερίωση του γάλακτος ή ισοδύναμη θερμική επεξεργασία και η παρουσία τους συνήθως είναι αποτέλεσμα επιμόλυνσης μετά τη θερμική επεξεργασία. Επίσης τα τυριά και τα παγωτά έχουν προκαλέσει αρκετά ομαδικά κρούσματα. Από τα διάφορα είδη τυριών, το μεγαλύτερο κίνδυνο ενέχουν αυτά που δεν ωριμάζουν σωστά. Κατά τις πρώτες ώρες από την έναρξη της πήξης, όταν δεν έχει αναπτυχθεί ικανοποιητική οξύτητα οι σαλμονέλλες μπορούν να πολλαπλασιαστούν, αλλά με την αύξηση της οξύτητας σε τιμές pH κάτω από 4,5ο πληθυσμός μειώνεται (Μάντης, 2005).

Το βόειο κρέας αποτελεί, αν και λιγότερο συχνά, πηγή μόλυνσης του ανθρώπου (D' Aoust, 1994).

Τέλος τα αλιεύματα μολύνονται είτε από τα απόβλητα που χύνονται στη θάλασσα, είτε από μολυσμένες ζωοτροφές (ωμά κρέατα και περιττώματα) που χρησιμοποιούνται στις υδατοκαλλιέργειες (ICMSF, 1996).

Σύμφωνα με την EFSA, στα κράτη της ΕΕ, την περίοδο 2006-2009 φαίνεται πως η κύρια πηγή μόλυνσης είναι οι ωοτόκες όρνιθες σε ποσοστό 43,8% των περιπτώσεων σαλμονέλλωσης. Ακολουθούν οι περιπτώσεις σαλμονέλλωσης από χοίρους σε ποσοστό 26,9%, ενώ οι περιπτώσεις από γαλοπούλες και κοτόπουλα πάχυνσης είναι στο 4,0% (γαλοπούλες) και 3,4% (κοτόπουλα πάχυνσης) αντίστοιχα. Ποσοστό 9,2% αναφέρεται πως σχετίζεται με ταξίδια, ενώ το 3,6% αφορούσαν τις εστίες σίτισης (Sara et al., 2011).

Τα τελευταία χρόνια παρατηρούνται κρούσματα σαλμονέλλωσης που οφειλόταν σε λιγότερο συχνούς ορότυπους από αυτούς που έχουν ευρέως μελετηθεί. Επίσης διαπιστώθηκε ότι συχνά στην εκδήλωση σαλμονέλλωσης στον άνθρωπο εμπλέκονται και άλλα τρόφιμα, όπως φρούτα και λαχανικά, που παλαιότερα δεν θεωρούνταν ύποπτα. Η κατάσταση αυτή διαμορφώθηκε από τις αυξημένες παγκόσμιες εξαγωγές λαχανικών και φρούτων από χώρες με τροπικό και υποτροπικό κλίμα. Η λίπανση των καλλιεργειών με ανεπεξέργαστα απόβλητα μολυσμένα με σαλμονέλλες, η άρδευση των χωραφιών και η

πλύση των λαχανικών και φρούτων με μολυσμένα νερά, ο εσφαλμένος χειρισμός των προϊόντων από τοπικούς εργάτες είναι ορισμένοι από τους παράγοντες που ευθύνονται για αυτή την μόλυνση. Αποτέλεσμα είναι πολλά περιστατικά σαλμονέλλωσης τα τελευταία χρόνια να συνδέονται με κατανάλωση λαχανικών. Άλλες, επίσης, μη ζωϊκής πηγής μόλυνσης αποτελούν τα αμύγδαλα, τα μπαχαρικά, οι σοκολάτες (ICMSF, 1996).

### 2.1.6 Επιδημιολογικά στοιχεία σαλμονελλέσεων στην Ελλάδα

Η *Salmonella* spp. είναι ένα από τα κυριότερα παθογόνα αίτια των τροφιμογενών λοιμώξεων, καθώς και το κύριο βακτηριακό αίτιο των επιδημιών τροφιμογενούς αιτιολογίας στην Ευρώπη. Αποτελεί συχνή αιτία διαρροϊκού συνδρόμου στα παιδιά και στους ηλικιωμένους, αλλά μπορεί να προσβάλλει όλες τις ηλικιακές ομάδες. Τα νοσήματα από *Salmonella* είναι υποχρεωτικής δήλωσης και τα δεδομένα του Συστήματος Υποχρεωτικής Δήλωσης Νοσημάτων αποστέλλονται στο ΚΕΕΛΠΝΟ.

Σύμφωνα με το ΚΕΕΛΠΝΟ, το διάστημα 2004 – 2013, οι συχνότεροι ορότυποι μη-τύφου/παρατύφου που απομονώθηκαν είναι η *S. enteritis* και *S. Typhimurium* με την πρώτη να ακολουθεί πτωτική τάση. Το νόσημα παρουσίασε υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης σε παιδιά ηλικίας 0-14 ετών και ιδιαίτερα στην ηλικιακή ομάδα παιδιών 0 - 4 ετών. Το νόσημα παρουσιάζει εποχικότητα: αύξημένη συχνότητα εμφάνισης το καλοκαίρι με κορύφωση τον Αύγουστο. Από τα επιβεβαιωμένα κρούσματα, το 17,1% ανέφερε πως στο οικείο περιβάλλον του υπήρχε άτομο με τα ίδια συμπτώματα, ενώ το 2,8% ανέφερε ταξίδι στο εξωτερικό εντός του χρόνου επώασης. Οι συχνότεροι ορότυποι που απομονώθηκαν είναι η *S. enteritis* και *S. typhimurium* με την πρώτη να ακολουθεί πτωτική τάση (ΚΕΕΛΠΝΟ)

Όσον αφορά τα επιβεβαιωμένα κρούσματα τύφου/παραφύτου, σύμφωνα με το ΚΕΕΛΠΝΟ, το διάστημα 2004 – 2013, η κατανομή διαφέρει μεταξύ Ελλήνων και αλλοδαπών, με την επίπτωση της νόσου να επιβαρύνει τους τελευταίους (42 αλλοδαποί έναντι 7 Ελλήνων). Από τους αλλοδαπούς, το 43,8% ανέφεραν ταξίδι κυρίως στη χώρα προέλευσης τους. Ενώ, το 9,5% ανέφεραν παρουσία άλλου ατόμου στο σπίτι με τα ίδια συμπτώματα. Η πλειονότητα των αλλοδαπών ήταν άνδρες (86,9%), ηλικίας 25 – 44 ετών (63,3%). Η συχνότητα εμφάνισης της νόσου παρουσίαζε εποχική κατανομή τους Θερινούς και Φθινοπωρινούς μήνες με κορύφωση τον Αύγουστο (ΚΕΕΛΠΝΟ).

### 2.1.7 Κλινικές Εκδηλώσεις

Η *Salmonella* spp προκαλεί εντερικές και εξωεντερικές εκδηλώσεις. Οι εντερικές εκδηλώσεις διακρίνονται στην εντεροκολίτιδα και στον τυφοειδή/παρατυφοειδή πυρετό. (Παπαπαναγιώτου και Κυριαζοπούλου-Δαλαινά, 2004)

Η εντεροκολίτιδα οφείλεται στην πρόσληψη με την τροφή μεγάλου αριθμού *Salmonella* (μολυσματική δόση τουλάχιστον  $10^6$  κυττάρων). Οι πιο συχνοί ορότυποι που προκαλούν την εντεροκολίτιδα είναι η *S. enteritis* και η *S. typhimurium*. Ο χρόνος επώασης και η εμφάνιση των συμπτωμάτων κυμαίνεται από 6 - 48 ώρες και διαρκούν 1 – 4 ημέρες,

όπου υποχωρούν χωρίς θεραπευτική αγωγή στην πλειοψηφία των νοσούντων. Τα συμπτώματα είναι πονοκέφαλος, πόνος στο υπογάστριο, πυρετός, ρίγος, πόνοι στα άκρα, εξάντληση, διάρροια και εμετός. Μετά το τέλος των συμπτωμάτων, οι ασθενείς παραμένουν φορείς και ο μικροοργανισμός αποβάλλεται από τα κόπρανα σε υψηλούς αριθμούς για μερικές εβδομάδες (Verma, 1999)

Ο τυφοειδής και παρατυφοειδής πυρετός προκαλείται από τη *S. typhi* και τη *S. Paratyphi A,B και C* αντίστοιχα. Η μόλυνση γίνεται από ασθενείς ή μικροβιοφόρους, οι οποίοι αποβάλλουν με τα κόπρανα τη *Salmonella*. Λοίμωξη εγκαθίσταται με βακτήρια της τάξης  $10^5 - 10^6$ . Το στάδιο επώασης της νόσου είναι 7- 14 ημέρες. Ο μικροοργανισμός διέρχεται από το βλεννογόνο του λεπτού εντέρου στο αίμα προκαλώντας μικροβαιμία, Στη συνέχεια τα βακτήρια μεταφέρονται στο ήπαρ, σπλήνα και χολή όπου πολλαπλασιάζονται. Από τη χολή αποβάλλονται τα βακτήρια από τα κόπρανα. Η αποβολή της *Salmonella* μπορεί να συνεχιστεί από τους φορείς για πολλούς μήνες, από τους οποίους μπορεί να ξεσπάσει επιδημία, ιδιαίτερα αν αυτοί εργάζονται στην παρασκευή και διανομή τροφίμων (Brenner et al., 2000).

Οι εξωεντερικές εκδηλώσεις που προκαλούνται από *Salmonella* είναι οστεομυελίτιδα, σηπτική αρθρίτιδα, μηνιγγίτιδα, ουρολοίμωξη, λοιμώξεις μαλακών μορίων (Montville and Matthews, 2010).

Καθοριστικός παράγοντας για την πρόκληση νόσου είναι ο αριθμός των κυττάρων που εισέρχονται στον οργανισμό.Σημαντικό ρόλο παίζουν οι προδιαθεσικοί παράγοντες για την ανάπτυξη της νόσου: παθογένεια του ορότυπου, ευαισθησία του ατόμου και το ύποπτο τρόφιμο. 10 με 100 κύτταρα στις ευπαθείς ομάδες μπορεί να αποβεί μοιραία (Glynn et al., 1992).

### 2.1.8 Πρόληψη

Για τον έλεγχο των σαλμονελλώσεων θα πρέπει να αποφεύγεται η μόλυνση στην πρωτογενή παραγωγή. Αυτό επιτυγχάνεται με τη βελτίωση των συνθηκών υγιεινής στους στάβλους, τη βελτίωση των διαδικασιών συγκομιδής και συσκευασίας των φρούτων και λαχανικών και την αποφυγή χρήσης αντιβιοτικών στις τροφές των πουλερικών, καθώς ευνοούν την ανάπτυξη της *Salmonella* (Linton, 1983) .

Επίσης, πρέπει να αποφεύγεται η μόλυνση των τροφίμων στα στάδια παραγωγής τους. Για το λόγο αυτό κρίνεται αναγκαία η σωστή εκπαίδευση των εργαζομένων στις βιομηχανίες τροφίμων για την ασφάλεια των τροφίμων, η τήρηση των συνθηκών υγιεινής, η απομάκρυνση από την γραμμή παραγωγής ατόμων – φορέων. Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δίνεται στην τήρηση των κανόνων ατομικής υγιεινής από τους χειριστές τροφίμων. Οι φορείς πρέπει να απομακρύνονται από την παραγωγή και την επαφή με τα τρόφιμα (Yasmine et al., 2014)

Τα ωμά κρέατα πρέπει να διατηρούνται χωριστά από τα τρόφιμα που καταναλώνονται ωμά, από τα μαγειρεμένα τρόφιμα ή τα τρόφιμα έτοιμα προς κατανάλωση. Οι πάγκοι κοπής, τα μαχαίρια και τα χέρια του χειριστή να πλένονται καλά μετά από χειρισμό ωμών κρεάτων. Τα χέρια πρέπει να πλένονται πριν το χειρισμό των τροφίμων, καθώς



και μεταξύ των χειρισμών διαφορετικών τροφίμων. (Linton, 1983)

Τα τρόφιμα που είναι ύποπτα για *Salmonella* πρέπει να καταναλώνονται με προσοχή. Τα πουλερικά και το κρέας πρέπει να έχει υποστεί επαρκή θερμική επεξεργασία. Τρόφιμα που περιέχουν ωμά αυγά, όπως τираμισου, μαγιονέζα, συχνά δεν είναι εύκολο να αναγνωριστούν ως ύποπτα και επικίνδυνα. Το γάλα πρέπει να καταναλώνεται αφού έχει υποστεί πρώτα θερμική επεξεργασία. (ICMSF, 1996)

Τέλος, γενικά μέτρα πρόληψης αποτελούν η χλωρίωση του νερού, το πλύσιμο των χεριών μετά από επαφή με ζώα ή περιττώματα ζώων (Linton, 1983).

### 2.1.9 Νομοθεσία

Λόγω της σημασίας της *Salmonellaspp.* για τη δημόσια υγεία, στην κοινοτική νομοθεσία για τα τρόφιμα, το τροφιμογενές αυτό παθογόνο συγκαταλέγεται μεταξύ των μικροβιολογικών κριτηρίων ασφαλείας και καθορίζονται όρια για την παρουσία του σε ορισμένες κατηγορίες τροφίμων. Συγκεκριμένα στον Κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 2073/2005 (όπως τροποποιήθηκε και ισχύει) απαιτείται απουσία της *Salmonellaspp.* σε 10 g ή 25 g τροφίμου σε προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια διατήρησής τους. Επίσης, σύμφωνα με τους Κανονισμούς (ΕΚ) αριθ. 2073/2005 & αριθ. 1086/2011 απαιτείται απουσία της *S. Enteritidis* και της *S. Thyphimurium* σε 25 g νωπού κρέατος πουλερικών που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια διατήρησής τους.

### 2.2 *Staphylococcus aureus*

Ο *S. aureus* είναι ένα από τα πιο σημαντικά τροφιμογενή παθογόνα και το αίτιο της σταφυλοκοκκικής τοξίνωσης. Η τοξίνωση αυτή προκαλείται από την κατανάλωση τροφίμων που περιέχουν μία ή περισσότερες προσχηματισμένες εξωτοξίνες (εντεροτοξίνες) που παράγονται από ορισμένα είδη και στελέχη σταφυλόκοκκων (Genigeorgis, 1989). Το γένος *Staphylococcus* ανήκει στην οικογένεια των *Staphylococcaceae* και περιλαμβάνει 32 διαφορετικά είδη βακτηρίων. Είναι Gram (+) θετικά σφαιρικά βακτήρια τα οποία στο μικροσκόπιο εμφανίζονται με τη μορφή τσαμπιών σταφυλίου (Μπαλατσούρας, 2006).

Στα τρόφιμα παρουσιάζουν ενδιαφέρον κυρίως τα στελέχη του σταφυλόκοκκου που είναι θετικά στη νουκλεάση και πηκτάση, επειδή συνήθως παράγουν εντεροτοξίνες. Ωστόσο, έχει αποδειχθεί ότι υπάρχουν και ορισμένα νουκλεάση και πηκτάση αρνητικά στελέχη που παράγουν εντεροτοξίνες.

Αν και πολλά είδη σταφυλόκοκκων παράγουν εντεροτοξίνες, τα περισσότερα περιστατικά τοξίκωσης οφείλονται στο *S. aureus*.

### 2.2.1 Χαρακτηριστικά του βακτηρίου

Ο *S. aureus* είναι ένας Gram (+) θετικός κόκκος, μη κινητός. Είναι καταλάση και νουκλεάση θετικό βακτήριο, βάσει του οποίου γίνεται η διαφοροποίηση του από άλλους κατα Gram (+) θετικούς κόκκους, όπως ο στρεπτόκοκκος. Διασπά τη μαννιτόλη προς παραγωγή γαλακτικού οξέος (Παπαπαναγιώτου και Κυριαζοπούλου-Δαλαινά, 2004).

### 2.2.2 Συνθήκες ανάπτυξης

Οι σταφυλόκοκκοι είναι μεσόφιλοι μικροοργανισμοί, αλλά παρατηρείται ανάπτυξη σε μεγάλο εύρος θερμοκρασιών 7 – 47,8 °C (Smith 1983) με βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 37°C.

Γενικά, πρόκειται για αερόβιο μικρόβιο, ωστόσο μπορεί να αναπτυχθεί και σε αναερόβιες συνθήκες. Σε ατμόσφαιρα 80% CO<sub>2</sub> η ανάπτυξη του *S. Aureus* επιβραδύνεται. Ο *S. aureus* αναπτύσσεται σε pH 4.2 – 9.8 (Pexara et al., 2010).

Το εύρος τιμών ανάπτυξης ενεργότητας νερού για τον *S. aureus* κυμαίνεται από 0.83 – 0.99 (Μπαλατσούρας, 2006).

Γενικά, μπορούν να αναπτυχθούν σε τιμές a<sub>w</sub> χαμηλότερες από άλλα αλόφιλα βακτήρια. Μπορούν να αναπτυχθούν σε τιμή a<sub>w</sub> κάτω από 0.83 κάτω από ιδανικές συνθήκες. Ωστόσο η τιμή a<sub>w</sub> 0.86 αναγνωρίζεται ως η ελάχιστη.

Πρόκειται για αλόφιλο βακτήριο που μπορεί να αναπτύσσεται σε παρουσία NaCl 7 – 10%, ενώ ορισμένα στελέχη έχει παρατηρηθεί ότι μπορούν να αναπτυχθούν και σε συγκέντρωση NaCl 20% (Pexara et al., 2010).

Γενικά, ισχύει πως όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του NaCl, αυξάνται και ελάχιστη τιμή pH ανάπτυξης. Σε υποστρώματα χωρίς προσθήκη άλατος παρατηρήθηκε ανάπτυξη του μικροβίου σε pH 4.00 – 9.83. Ενώ μετά από προσθήκη 4% NaCl το εύρος pH μειώθηκε στο 4.4 – 9.43 και σε υποστρώματα με τιμή pH 4.8 και συγκέντρωση 5% NaCl παρατηρήθηκε αναστολή της ανάπτυξης. Αναστολή επίσης, παρατηρήθηκε σε συνδυασμό παραγόντων a<sub>w</sub> 0.90, θερμοκρασία 12<sup>0</sup> C και pH<5.5 (Pexara et al., 2010).

### 2.2.3 Επιβίωση

Οι τιμές D στους 60<sup>0</sup> C παρουσιάζουν ποικιλία από 2 έως 50 λεπτά, ανάλογα με το τρόφιμο. Τα βακτήρια είναι ευαίσθητα σε pH 7.2 και τιμή D<sub>140</sub>. Σε αλλαντικά Φρανκφούρτης θέρμανση σε θερμοκρασία 71,1<sup>0</sup> C ήταν καταστροφική για τα περισσότερα στελέχη (Pexara et al., 2010).

## 2.2.4 Κατανομή

Ο *S. aureus* είναι ευρύτατα διαδεδομένος στο περιβάλλον. Ανευρίσκεται τόσο σε ανθρώπους, όσο και στα ζώα (Pexara et al., 2010). Στον άνθρωπο οι σταφυλόκοκκοι ανευρίσκονται συχνά στο δέρμα, τη ρινική κοιλότητα και το φάρυγγα (Παπαπαναγιώτου και Κυριαζοπούλου-Δαλαινά, 2004). Κύρια πηγή πολλαπλασιασμού του μικροβίου είναι η μύτη. Στον υγιή πληθυσμό ανευρίσκεται στο 10 – 50% και στους ασθενείς στο 60 – 80% (Noble, 1981). Παρατηρείται στο 30% των εργαζόμενων σε νοσοκομεία, γεγονός που αποτελεί κίνδυνο για πρόκληση σταφυλοκοκκικών λοιμώξεων στους νοσηλευόμενους (Παπαπαναγιώτου και Κυριαζοπούλου-Δαλαινά, 2004). Ένα ποσοστό 5 -10% υγιών ανθρώπων αποβάλλει το μικροοργανισμό με τα κόπρανα (Pexara et al., 2010).

Στα ζώα τη δεξαμενή του μικροβίου αποτελούν το δέρμα και οι βλεννογόνοι των γαλακτοπαραγωγικών ζώων (Jablonski et al., 1997), στα οποία προκαλεί ενδομαστικές λοιμώξεις και μαστίτιδες (Akineden et al., 2001) συμβάλλοντας στη μόλυνση του γάλακτος και των γαλακτοκομικών προϊόντων.

Στο περιβάλλον βρίσκεται παντού, στη σκόνη, το νερό, τα ρούχα, τον εξοπλισμό στις βιομηχανίες.

## 2.2.5 Σταφυλοκοκκικές τοξίνες

Οι σταφυλοκοκκικές τοξίνες είναι εξωκυττάρια διαλυτές πρωτεΐνες, σχηματίζονται από απλή πεπτιδική αλυσίδα μοριακού βάρους 26.000 – 29.600 Da (Παπαπαναγιώτου και Κυριαζοπούλου-Δαλαινά, 2004; Normanno et al., 2005). Ανήκουν σε μια μεγάλη ομάδα αντιγόνων, η παραγωγή των οποίων ελέγχεται από γονίδια στους φάγους, χρωμόσωμα και πλασμίδια (Johnson et al., 1991; Zhang et al., 1998; Balaban and Rasooly, 2000; Proft and Fraser, 2003). Οι εντεροτοξίνες έχουν ιδιότητες υπεραντιγόνων που συνδέονται με μόρια MHC της τάξεως II και προκαλούν την ενεργοποίηση των T – λεμφοκυττάρων (Παπαπαναγιώτου και Κυριαζοπούλου-Δαλαινά, 2004). Παράγονται ιδιαίτερος από στελέχη του *S. aureus* τα οποία αναπτύσσονται σε τρόφιμα πλούσια σε υδατάνθρακες και πρωτεΐνες, και αποτελούν από τα σπουδαιότερα αίτια σταφυλοκοκκικής τοξίνωσης (Dinges et al., 2000; Παπαπαναγιώτου και Κυριαζοπούλου-Δαλαινά, 2004).

Έχουν αναγνωριστεί 6 κλασικοί τύποι σταφυλοκοκκικών εντεροτοξινών SEA, SEB, SEC (SEC<sub>1</sub>, SEC<sub>2</sub>, SEC<sub>3</sub>), SED, SED και TSST-1 (toxicshocksyndrometoxin – 1). Πρόσφατα περιγράφηκαν επιπλέον νέες σταφυλοκοκκικές τοξίνες, ο ρόλος των οποίων δεν έχει διευκρινιστεί (Omoe et al., 2003; Boerema et al., 2006). Για το λόγο αυτό προτάθηκε να καλούνται ως "τοξίνες όμοιες με τις σταφυλοκοκκικές" (Morandi et al., 2007).

Από τα στελέχη *S. aureus* ζωϊκής προέλευσης παράγονται όλες οι σταφυλοκοκκικές εντεροτοξίνες (εκτός της SEE), γεγονός που καταδεικνύει το ρόλο που παίζουν τα ζώα στην πρόκληση της σταφυλοκοκκικής τροφικής δηλητηρίασης και την ανάγκη τήρησης των κανόνων υγιεινής στην πρωτογενή παραγωγή (Smyth et al., 2004).

Οι εντεροτοξίνες είναι ανθεκτικές στην πρωτεολυτική πέψη που πραγματοποιείται από τα ένζυμα θρυψίνη, χυμοθρυψίνη, πεψίνη, ρενίνη και παπαΐνη. Η ανθεκτικότητα αυτή τις επιτρέπει να περνούν άπεπτες από το στομάχι, αν και είναι πρωτεϊνικής φύσης, και να δρουν ως εντεροτοξίνες. Είναι αρκετά θερμοανθεκτικές. Η βιολογική δράση της SEB διατηρείται μετά από θέρμανση για 16 ώρες στους 60°C σε τιμή pH 7,3 (Schantzetal., 1965). Η θέρμανση της SEA στους 80°C για 3 min ή στους 100°C για 1 min είχε ως αποτέλεσμα την απώλεια της ικανότητάς της να αντιδρά ορολογικά (Bergdoll, 1967). Οι σταφυλοκοκκικές τοξίνες έχουν μια ενδεικτική τιμή D στους 121°C, 3-8 min (Asperger and Zangerl, 2003). Το γεγονός ότι οι εντεροτοξίνες είναι περισσότερο θερμοανθεκτικές από ότι τα κύτταρα του σταφυλοκόκκου από τα οποία προήλθαν είναι ιδιαίτερα σημαντικό, γιατί μπορεί να είναι παρούσες στο τρόφιμο όταν οι σταφυλόκοκκοι δεν ανιχνεύονται στο τρόφιμο (Jorgensen et al., 2005).

Ο μικρότερος αριθμός *S. aureus* που απαιτείται για την παραγωγή της ελάχιστης δόσης εντεροτοξίνης ικανής να προκαλέσει νόσο στον άνθρωπο εξαρτάται από το υπόστρωμα ανάπτυξης του μικροβίου και την εντεροτοξίνη. Όταν τα επίπεδα *S. aureus* είναι  $>10^5$  κύτταρα/g τροφίμου, τότε υπάρχει αρκετή εντεροτοξίνη να προκαλέσει ασθένεια. Το τυπικό εύρος κυμαίνεται από  $10^5 - 10^8$  κύτταρα, ωστόσο σε μερικές περιπτώσεις ενοχοποιούνται και μικρότεροι πληθυσμοί. Ανιχνεύσιμη SEA σε θρεπτικό υπόστρωμα βρέθηκε όταν ο πληθυσμός ήταν  $10^4$ cfu/g (Hirookaetal., 1987). Σε γάλα SEA και SED ανιχνεύθηκαν σε πληθυσμούς μόνο πάνω από  $10^7$  (Noletto and Bergdoll, 1980).

Γενικά η παραγωγή εντεροτοξινών ευνοείται από συνθήκες που σχετίζονται με τα ενδογενή χαρακτηριστικά του τροφίμου. Η ανάπτυξη των σταφυλόκοκκων δεν συνεπάγεται και την παραγωγή τοξινών, καθώς μπορούν να αναπτύσσονται και σε συνθήκες που γενικά δεν ευνοούν την παραγωγή εντεροτοξινών.

Η βέλτιστη θερμοκρασία για την παραγωγή τοξίνης είναι μεταξύ 40-45°C, με ένα εύρος 10-46°C και ευνοείται σε τιμές pH μεταξύ 5,3-7,0. Η ελάχιστη τιμή που επιτρέπεται η παραγωγή είναι 4,8 ενώ η μέγιστη περίπου 9,0 (Pexara et al., 2010).

Η παραγωγή εντεροτοξίνης γενικά παρατηρείται σε στενότερο εύρος τιμών  $a_w$  από ό,τι η ανάπτυξη του μικροοργανισμού. Ιδανική τιμή  $a_w$  για παραγωγή τοξίνης είναι 0,90, ενώ παραγωγή παρατηρείται σε ένα εύρος 0,86 έως 0,99 (Pexara et al., 2010).

Τοξίνη παράχθηκε σε συγκέντρωση NaCl 10% ή υψηλότερη σε pH 5,45, αλλά δεν είναι δυνατή παραγωγή τοξίνης σε συγκέντρωση NaCl 12% (Genigeorgis et al., 1971).

Πρόσληψη με τα τρόφιμα 20 ng έως 1 μg σταφυλοκοκκικής εντεροτοξίνης επαρκεί για την εκδήλωση συμπτωμάτων στον άνθρωπο (Berdgoll, 1989). Η συχνότητα εκδήλωσης εξαρτάται από την ποσότητα του υπεύθυνου τροφίμου που καταναλώνεται και εν μέρει από την ηλικία. Οι ηλικιωμένοι και τα παιδιά (5-9 ετών) είναι περισσότερο ευαίσθητα.

## 2.2.6 Υπεύθυνα τρόφιμα – Τρόπος μετάδοσης

Η μόλυνση από τον άνθρωπο αποτελεί την πρωταρχική αιτία της σταφυλοκοκκικής τοξίκωσης (Devriese, 1984). Όπως είπαμε, ο σταφυλόκοκκος αποικίζει τη ρινική

κοιλότητα από όπου μολύνονται τα χέρια. Από τα μολυσμένα χέρια ο μικροοργανισμός φτάνει στα τρόφιμα και αν οι συνθήκες είναι ευνοϊκές, ο σταφυλόκοκκος πολλαπλασιάζεται και παράγει τις τοξίνες που είναι υπεύθυνες για την πρόκληση σταφυλοκοκκικής τοξίνωσης (Dinges et al., 2000). Συχνότερα εμπλέκονται μαγειρεμένα τρόφιμα που επιμολύνονται κατά τους χειρισμούς τους μετά τη θερμική επεξεργασία και αφήνονται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για αρκετές ώρες (Genigeorgis et al., 1971). Ο σταφυλόκοκκος μπορεί να επιμολύνει τα τρόφιμα μέσω των μηχανών άλεσης του κρέατος, μαχαιριών, επιφανειών τεμαχισμού τροφίμων, αποθηκευτικών δοχείων κ.α (Montville and Matthews, 2010).

Οι συνθήκες που συχνά συνδέονται με κρούσματα τοξίνωσης από σταφυλόκοκκο είναι:

- η ανεπαρκής ψύξη
- η παρασκευή των φαγητών πολύ πριν καταναλωθούν
- η ελλιπής προσωπική υγιεινή
- το ανεπαρκές μαγείρεμα και η ανεπαρκής θέρμανση του τροφίμου
- διατήρηση των έτοιμων τροφίμων σε με ενδεδειγμένες συνθήκες θερμοκρασίας που ευνοούν την ανάπτυξη του βακτηρίου

Τρόφιμα που συχνά συσχετίζονται με τη σταφυλοκοκκική τροφική τοξίνωση περιλαμβάνουν τα κρέατα και τα προϊόντα κρέατος, το γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα, πουλερικά και αυγά, σαλάτες με αυγά, τόνο, κοτόπουλο και πατάτες, μακαρόνια και προϊόντα αρτοποιίας (Μπαλατσούρας, 2006).

Το γάλα αποτελεί ιδανικό υπόστρωμα για την ανάπτυξη του σταφυλόκοκκου και τα γαλακτοκομικά προϊόντα είναι τα τρόφιμα που πιο συχνά προκαλούν σταφυλοκοκκική τοξίνωση (De Buyser et al., 2001, Jorgensen et al., 2005). Τα γαλακτοπαραγωγά ζώα είναι πιθανώς η κύρια αιτία της μόλυνσης του νωπού γάλακτος με *S. aureus* (Asperger et al., 2003; Vautor et al., 2003). Ωστόσο, η μόλυνση του γάλακτος και των γαλακτοκομικών προϊόντων προέρχεται αρκετά συχνά από τον ανθρώπινο χειρισμό ή από το περιβάλλον κατά την επεξεργασία. Τα χέρια των αμελετών διαπιστώθηκε ότι έχουν ιδιαίτερη σημασία στην μετάδοση του *S. aureus* στα γαλακτοπαραγωγά ζώα αλλά και στην μόλυνση του γάλακτος (Pexara et al., 2010).

Αν και η παστερίωση καταστρέφει το *S. aureus*, οι τοξίνες είναι θερμοανθεκτικές και δεν καταστρέφονται (Morandi et al., 2007). Από τα τυριά, ιδιαίτερη σημασία παρουσιάζουν τα τυρογάλακτος (μανούρι, ανθότυρο, μυζήθρα), καθώς αποτελούν ιδανικό περιβάλλον (υψηλό pH, υψηλό ποσοστό υγρασίας, έλλειψη οξυγαλακτικής καλλιέργειας) για την ανάπτυξη του σταφυλόκοκκου (Pexara et al., 2010).

Γενικά, οι σταφυλόκοκκοι είναι ευαίσθητοι στο ανταγωνισμό σε σχέση με τους μικροοργανισμούς που βρίσκονται στα τρόφιμα. Η φυσιολογική χλωρίδα του τροφίμου, δρα ανταγωνιστικά στην ανάπτυξη του σταφυλόκοκκου μέσω της διεκδίκησης των θρεπτικών συστατικών ή διαμορφώνοντας συνθήκες που δεν ευνοούν την ανάπτυξη του σταφυλόκοκκου (Pexara et al., 2010). Για το λόγο αυτό, τρόφιμα που έχουν υποστεί θερμική επεξεργασία που μειώνουν τη φυσιολογική χλωρίδα αποτελούν ιδανικό περιβάλλον για την ανάπτυξη του σταφυλόκοκκου.

### 2.2.7 Προκαλούμενη νόσος-Συμπτώματα

Τα συμπτώματα της σταφυλοκοκκικής τοξίνωσης εμφανίζονται μέσα σε λίγες ώρες (1-6 ώρες) μετά την κατανάλωση του μολυσμένου τροφίμου. Ο σύντομος χρόνος που παρεμβάλλεται μεταξύ της πρόσληψης της προσχηματισμένης τοξίνης με το τρόφιμο και της εκδήλωσης των συμπτωμάτων είναι ένα χαρακτηριστικό της τοξίνωσης (Pexara et al., 2010). Τα συμπτώματα περιλαμβάνουν εμετό και διάρροια χωρίς πυρετό. Η πρόκληση του εμετού οφείλεται στον ερεθισμό του κέντρου του εμετού του κεντρικού νευρικού συστήματος μετά τη δράση της τοξίνης σε νευρικούς υποδοχείς του εντέρου (Παπαπαναγιώτου και Κυριαζοπούλου-Δαλαινά, 2004). Τα συμπτώματα υποχωρούν μέσα σε 24-48 ώρες, ενώ θάνατοι παρατηρούνται σπάνια, κυρίως σε ηλικιωμένους και λόγω επιπλοκών (Martin and Iandolo, 2000).

### 2.2.8 Πρόληψη

Σημαντικό για την πρόληψη της σταφυλοκοκκικής τοξίνωσης είναι η κατάλληλη θερμική επεξεργασία των τροφίμων και η τήρηση των θερμοκρασιών κατά την συντήρησή τους. Ο μεγαλύτερος κίνδυνος είναι η διασταυρούμενη επιμόλυνση, όπου το μαγειρεμένο υλικό έρχεται σε επαφή με νωπά ή μολυσμένα υλικά (π.χ σανίδες τεμαχισμού). Ο ανάρμοστος χειρισμός και διατήρηση τροφίμων προκαλούν τον πολλαπλασιασμό του βακτηρίου και την παραγωγή τοξινών, ενώ η μετέπειτα θέρμανση του τροφίμου δεν καταστρέφει την τοξίνη.

Δεδομένου ότι η επιμόλυνση των τροφίμων από τους χειριστές δεν μπορεί να αποφευχθεί ολοκληρωτικά, η καλύτερη μέθοδος πρόληψης από σταφυλόκοκκο είναι η επαρκής ψύξη των τροφίμων μέχρι την κατανάλωσή τους, ώστε να αποφευχθεί ο σχηματισμός τοξίνης (Γκόβαρης, 2007).

Η εφαρμογή των ορθών παρασκευαστικών πρακτικών (GMP) και της ανάλυσης κινδύνων και κρίσιμων σημείων ελέγχου (HACCP) στις γραμμές επεξεργασίας τροφίμων μπορούν να αποτρέψουν τη μόλυνση των τροφίμων με παθογόνα όπως *S. aureus*. Η βιομηχανία τροφίμων θα πρέπει να εφαρμόζει ελέγχους και μέτρα για την αποφυγή της μόλυνσης κατά την παραγωγή των τροφίμων με αυτό το παθογόνο (Pexara et al., 2010).

Μερικά μέτρα πρόληψης είναι :

- η αποφυγή ατελούς ψησίματος ή ατελούς επαναθέρμανσης του φαγητού
- η τήρηση των βασικών κανόνων υγιεινής όπως το πλύσιμο των χεριών με σαπούνι και νερό και το πλύσιμο κουζινικών εργαλείων με ζεστό νερό και απορρυμαντικό
- η κατάλληλη διατήρηση και σε ενδεδειγμένες θερμοκρασίες των τροφίμων στο ψυγείο, προσέχοντας την επαφή μεταξύ τους, ειδικά των λαχανικών με υγρά από νωπό κρέας ή πουλερικά.

## 2.2.9 Νομοθεσία

Μεταξύ των μικροβιολογικών κριτηρίων για τα τρόφιμα, η Ευρωπαϊκή Ένωση έχει θέσει κριτήρια για την παρουσία των σταφυλοκοκκικών τοξινών σε τυριά, γάλα σε σκόνη και σκόνη ορού γάλακτος. Σύμφωνα με τον Κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 2073/2005 της Ευρωπαϊκής Επιτροπής της Ευρωπαϊκής Ένωσης, δείγματα με κοαγκουλάση θετικό σταφυλοκόκκο που υπερβαίνουν τα  $10^5$  cfu/g θα πρέπει να ελεγχθούν περαιτέρω για τη παρουσία της σταφυλοκοκκικής τοξίνης. Σε αυτή την περίπτωση, η σταφυλοκοκκική τοξίνη δεν πρέπει να ανιχνεύεται σε 25 g τροφίμου.

## 2.3 *Listeria monocytogenes*

Η *Listeria monocytogenes* ως τροφιμογενές παθογόνο βακτήριο προκαλεί στον άνθρωπο την λιστερίωση, ένα πολύ σημαντικό για την Δημόσια υγεία τροφιμογενές νόσημα. Εκδηλώνεται κατά κανόνα σε εγκύους, νεογέννητα, ηλικιωμένους, καθώς και σε ανοσοκατεσταλμένα άτομα. Το βακτήριο είναι υπεύθυνο κυρίως για την εμφάνιση μεμονωμένων κρουσμάτων, ωστόσο τα τελευταία χρόνια έχουν περιγραφεί και επιδημικές εξάρσεις.

*HL.monocytogenes* ανήκει στην οικογένεια *Listeriaceae*. Η οικογένεια περιλαμβάνει και άλλα πέντε είδη : *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. welshimeri*, *L. seelingeri* και *L. grayi* (Rocourt et al., 2007). Από τα παραπάνω είδη, η *L. monocytogenes* και *L. ivanovii* θεωρούνται παθογόνα, εκ των οποίων η *L. monocytogenes* θεωρείται παθογόνος για τον άνθρωπο και η *L. ivanovii* για τα ζώα (Pexara et al., 2010)

Η *L. monocytogenes* είναι ένα Gram (+) βακτήριο, κινητό με περίτριχες βλεφαρίδες. Είναι ενδοκυττάριο βακτήριο που αναπτύσσεται μέσα στα μονοπύρνα μακροφάγα και τα επιθηλιακά κύτταρα (Παπαπαναγιώτου και Κυριαζοπούλου-Δαλαινά, 2004).

Βιοχημικά, η *L. monocytogenes* δίνει θετική την αντίδραση καταλάσης, αρνητική την οξειδάση, δεν παράγει ινδόλη και δεν υδρολύει την ουρία και την πηκτή. Υδρολύει την εσουλίνη. Διασπά τη γλυκόζη με παραγωγή οξέος, όχι όμως και αερίου. Δεν ανάγει τα νιτρικά σε νιτρώδη, δίνει θετική τη δοκιμασία ραμνόζης και αρνητική τη δοκιμασία ξυλόζης (Ryser, 2002).

Ορολογικά, βάσει του σωματικού Ο αντιγόνου και του βλεφαριδικού Η αντιγόνου η *L. monocytogenes* διακρίνεται σε 13 ορολογικούς τύπους, από τους οποίους οι ορολογικοί τύποι 1a, 1b και 4b προκαλούν στο 95% λοιμώξεις στον άνθρωπο (Montville and Matthews, 2010).

### 2.3.1 Κατανομή

Η *L. monocytogenes* έχει ευρεία κατανομή στο περιβάλλον βρίσκεται παντού στο περιβάλλον και μολύνει τους ανθρώπους με πολλούς τρόπους. Βρίσκεται στο νερό, το έδαφος, τα φυτά, τα ζώα και τον άνθρωπο. Επίσης, έχει απομονωθεί από φυτείες, στις οποίες έγινε χρήση περιττωμάτων και υλικών υπονόμων ως λιπάσματα (Schlech et al., 1983; Swaminathan 2001). Πολλά ζώα προσβάλλονται από λιστερίωση. Στα τρωκτικά και τα μικρά ζώα προκαλεί σηψαιμία με νεκρωτικές εστίες στο ήπαρ. Μεγαλύτερα υγιή ζώα μπορεί να είναι εντερικοί φορείς του μικροβίου, ενώ στα ευπαθή ζώα εμφανίζεται ως λοίμωξη του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος με τη μορφή εγκεφαλομυελίτιδος και αποβολών στα κυοφορούντα ζώα (Παπαπαναγιώτου και Κυριαζοπούλου-Δαλαινά, 2004).

Η κύρια δεξαμενή της *L. monocytogenes* είναι τα ζώα για αυτό και θεωρείται ζωοανθρωπονόσος (Bojsen-Moller et al., 1972). Έχει απομονωθεί από χοίρους, βοειδή, πρόβατα, κοτόπουλα και γαλοπούλες. Στον άνθρωπο μπορεί να προκαλέσει τοπική λοίμωξη του δέρματος ή των βλεννογόνων, με συμπτώματα από το αναπνευστικό σύστημα και προσβολή των επιχώριων λεμφαδένων, Κυρίως όμως, προκαλεί μηνιγγοεγκεφαλίτιδα με μικροβιαμία και σπανιότερα μόνο μικροβιαμία. Στις εγκυμονούσες προκαλεί αποβολές. Στους νοσούντες ή/και υγιείς φορείς ο μικροοργανισμός αποβάλλεται από τα κόπρανα στο περιβάλλον από όπου οι άνθρωποι μολύνονται εκ νέου (Παπαπαναγιώτου και Κυριαζοπούλου-Δαλαινά, 2004; McLauchlin et al., 2004). Στους ασυμπτωματικούς φορείς ανήκουν οι υγιείς άνθρωποι, οι εργαζόμενοι σε σφαγεία, οι εργαζόμενοι σε εργαστήρια που χειρίζονται το μικροοργανισμό (Montville and Matthews, 2010).

### 2.3.2 Ανάπτυξη

Η *L. monocytogenes* είναι ψυχρόφιλο βακτήριο και αναπτύσσεται σε μεγάλο εύρος θερμοκρασιών από 0 – 45<sup>0</sup>C, με βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 30 – 37<sup>0</sup>C (Montville. And Matthews, 2010). Μπορεί να αναπτυχθεί σε θερμοκρασίες ψύξης με αργή όμως ανάπτυξη.

Η *L. monocytogenes* αναπτύσσεται σε τιμές 5.6 - 9.5, με βέλτιστη τιμή ανάπτυξης στο ουδέτερο pH. Έχει όμως τη δυνατότητα να πολλαπλασιάζεται σε τιμές pH μέχρι και 4.4, ενώ σε pH<4.3 τα κύτταρα επιβιώνουν αλλά δεν πολλαπλασιάζονται. Τα οργανικά οξέα (οξικό, κιτρικό, γαλακτικό οξύ) παρεμποδίζουν την ανάπτυξη της *L. monocytogenes* ανάλογα με το βαθμό διάσπασής τους. Για παράδειγμα, το κιτρικό και γαλακτικό οξύ είναι λιγότερο δραστικά έναντι των μικροβίων σε συγκεκριμένη τιμή pH (Pexara et al., 2010).

Αναπτύσσεται σε ενεργότητα νερού  $a_w \geq 0,97$ . Τα περισσότερα στελέχη παρουσιάζουν ελάχιστη τιμή  $a_w$  0.90, ενώ μπορούν να επιβιώσουν χωρίς να πολλαπλασιάζονται σε τιμή  $a_w$  έως και 0,83 (Swaminathan, 2001).

Η *L. monocytogenes* παρουσιάζει βέλτιστη ανάπτυξη σε μέτριες συγκεντρώσεις άλατος



(Pexara et al., 2010). Μπορεί να αναπτυχθεί και παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων άλατος 10 -12% NaCl, ενώ μπορεί να επιβιώσει και σε υψηλότερες συγκεντρώσεις αλάτων. Όσο η θερμοκρασία μειώνεται η ανθεκτικότητα του μικροβίου σε περιβάλλοντα υψηλής αλατότητας αυξάνεται. Έτσι, τα τρόφιμα όπως, τα λουκάνικα αποτελούν φιλόξενο περιβάλλον για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού (Mackey et al., 1990).

Ο μικροοργανισμός έχει τη δυνατότητα να αναπτύσσεται τόσο σε αερόβιες, όσο και αναερόβιες συνθήκες.

### 2.3.3 Επιβίωση

Θανατώνεται σε θερμοκρασία  $>50^{\circ}\text{C}$ , ωστόσο εμφανίζει μεγαλύτερη θερμοανθεκτικότητα όταν υφίσταται θερμική επεξεργασία υπό αναερόβιες συνθήκες σε σχέση με όταν υφίσταται θερμική επεξεργασία υπό αερόβιες συνθήκες. Το γεγονός αυτό δημιουργεί ανησυχία για τα συσκευασμένα τρόφιμα που υφίστανται θερμική επεξεργασία υπό κενό (Knabel et al., 1990). Η ψύξη δε μειώνει το μέγεθος του μικροβιακού πληθυσμού, ενώ η επιβίωση της κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης στην κατάψυξη εξαρτάται από το τρόφιμο και το ρυθμό κατάψυξης (Tomrkin, 2002). Ο Augustin 1996, έδειξε ότι 3kGy ακτινοβολίας σε επιφάνεια κρέατος μειώνει τον πληθυσμό του μικροοργανισμού κατά 6 λογάριθμους.

Γενικά, η *L. monocytogenes* παρουσιάζει ιδιαίτερη αντοχή στα κοινά απολλυμαντικά, ενώ έχει τη δυνατότητα να σχηματίζει βιομεμβράνη σε εξοπλισμούς και σωληνώσεις βιομηχανιών κρέατος και γάλακτος (Joeng et al., 1994).

### 2.3.4 Επιδημιολογικά στοιχεία Λιστερίωσης στην Ελλάδα

Η αληθινή επίπτωση της λιστερίωσης στον άνθρωπο δεν είναι πλήρως γνωστή, καθώς στο μέσο υγιή άνθρωπο η μόλυνση είναι συνήθως ασυμπτωματική ή προκαλεί μια ήπιας μορφή γρίπη, ενώ τα περισσότερα περιστατικά είναι σποραδικά και εμφανίζονται στο τέλος της άνοιξης και το καλοκαίρι.

Η συχνότητα της λοίμωξης τα τελευταία χρόνια έχει αυξηθεί. Στις μη περιγεννητικές περιπτώσεις ενοχοποιούνται κυρίως τα τρόφιμα, κυρίως τα μαλακά τυριά, το γάλα, τα πουλερικά, τα τρόφιμα έτοιμα προς κατανάλωση και τα τρόφιμα με μακρά διάρκεια ζωής (Ιωάννης Κ. Παπαπαναγιώτου και Βασιλική Κυριαζοπούλου-Δαλαϊνά, 2004).

Η *L. monocytogenes* προκαλεί ασθένεια σε ευπαθείς, κατα κύριο λόγο ομάδες ανθρώπων, όπως οι έγκυες, τα νεογνά, οι ανοσοκατασταλμένοι και οι ηλικιωμένοι. Το ποσοστό της θνησιμότητας είναι 20 – 25%.

Στην Ελλάδα, σύμφωνα με το Σύστημα Υποχρεωτικής Δήλωσης Νοσημάτων στο ΚΕΕΛΠΝΟ, κατά το διάστημα 2004 – 2013 δηλώθηκαν 73 κρούσματα λιστερίωσης. Η ηλικιακή ομάδα με την υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης της νόσου ήταν η ομάδα 65

ετών και άνω και ακολουθεί η ηλικιακή ομάδα 0 – 4. Επίσης, η επίπτωση στους άνδρες ήταν μεγαλύτερη σε σχέση με τις γυναίκες. Η εποχικότητα της νόσου ήταν αυξημένη το Μάρτιο και τους θερινούς μήνες, ενώ το 51,4% των περιπτώσεων αφορούσε ανοσοκατασταλαμένους ασθενείς. Από τα 73 κρούσματα το διάστημα αυτό, οι 12 περιπτώσεις κατέληξαν σε θάνατο (31,6%).

### 2.3.5 Τρόπος μετάδοσης – Κλινικές εκδηλώσεις

Όταν η *L. monocytogenes* προσλαμβάνεται μέσω της τροφής, διαπερνά τον εντερικό φραγμό και εισχωρεί στα κύτταρα. Εν συνεχεία, τα βακτήρια προσλαμβάνονται από τα μακροφάγα μέσα στα οποία πολλαπλασιάζονται. Μέσω της κυκλοφορίας του αίματος φτάνουν στα μακροφάγα του ήπατος και του σπλήνα τα οποία καταστρέφει με τη βοήθεια της πρωτεΐνης λιστεριολυσίνη, η οποία είναι μια αιμολυσίνη που προσκολλάται στα λιπίδια της μεμβράνης των κυττάρων του ξενιστή. Τις πρώτες ημέρες μετά τη μόλυνση, το βακτήριο διασπείρεται μέσω της κυκλοφορίας σε διάφορα όργανα και ιστούς, όπως ο εγκέφαλος (Swaminathan, 2001).

Στους ενήλικες προκαλεί κυρίως σηψαιμία, μηνιγγίτιδα και μηνιγγοεγκεφαλίτιδα, με χρόνο επώασης 11 – 70 ημέρες. Πιο σπάνια μπορεί να προκαλέσει ενδοκαρδίτιδα, τοπικές μολύνσεις, ενδοφθαλμίτιδα, σηπτική αρθρίτιδα, περιτονίτιδα και οστεομυελίτιδα (Slutsker et al., 99), με μια πληθώρα συμπτωμάτων, όπως πυρετό, ρίγος, διάρροια, έμετο (Sutherland, 1989). Η μολυσματική δόση κυμαίνεται από  $10^2$  -  $10^9$  κύτταρα ανάλογα με το στέλεχος του μικροοργανισμού και το νοσούνα.

Ιδιαίτερος επικίνδυνος θεωρείται η νόσος για τις έγκυες γυναίκες. Το βακτήριο διαμέσου του πλακούντα, μεταδίδεται στο έμβρυο και προκαλείται λοίμωξη, η οποία ονομάζεται περιγεννητική σηψαιμία από *Listeria*. Τα έμβρυα αποβάλλονται, γεννιούνται νεκρά ή παρουσιάζουν μηνιγγίτιδα μερικές μέρες μετά από τη γέννηση τους (Παπαπαναγιώτου και Κυριαζοπούλου-Δαλαινά, 2004).

Επίσης, δύναται να προκαλέσει μια δεύτερη μορφή ασθένειας, την εμπύρετη γαστρεντερίτιδα. Τα κρούσματα της γαστρεντερίτιδας διαφέρουν από αυτά της επιθετικής λιστερίωσης. Η μολυσματική δόση είναι μικρότερη από αυτή της επιθετικής μορφής και πλήττονται και άνθρωποι χωρίς κανένα προδιαθεσιακό παράγοντα. Τα συμπτώματα εμφανίζονται σε μερικές ώρες (Παπαπαναγιώτου και Κυριαζοπούλου-Δαλαινά, 2004, Montville and Matthews, 2010).

### 2.3.6 Υπεύθυνα τρόφιμα

Τρόφιμα υψηλού κινδύνου αποτελούν τα τρόφιμα έτοιμα προς κατανάλωση που διατηρούνται για σχετικά μεγάλο διάστημα στην ψύξη και τρόφιμα που είναι μολυσμένα με *L. monocytogenes* με  $>100$  cfu/gr/ml. Τα τρόφιμα που ενοχοποιούνται είναι το γάλα και τα τυριά, το κρέας και τα αλιεύματα.

Το νωπό γάλα είναι η κύρια πηγή της *L. monocytogenes*. Οι Beans και Gerard, 1958

υποστηρίζουν ότι το παθογόνο βακτήριο δεν αδρανοποιείται πλήρως κατά την παστερίωση, σε αντίθεση με την υψηλή παστερίωση (71,6°C) κατά την οποία αδρανοποιείται το μικρόβιο. Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας δηλώνει “ Η παστερίωση είναι μια ασφαλής διαδικασία, η οποία μειώνει τον αριθμό της *L. monocytogenes* στο γάλα σε επίπεδα τέτοια ώστε να μην αποτελεί έναν υπολογίσιμο κίνδυνο για την ανθρώπινη υγεία”. Ωστόσο, η ικανότητα της *L. monocytogenes* να αναπτύσσεται στο παστεριωμένο γάλα αποτελεί το κύριο πρόβλημα. Σε γάλα παστεριωμένο παρατηρήθηκε αύξηση του πληθυσμού των κυττάρων κατά 10 φορές σε 7 ημέρες στους 4°C (Northholt et al., 1988). Για αυτό ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δίνεται στη θερμοκρασία διατήρησης του γάλακτος και στις επιμολύνσεις μετά τη θερμική επεξεργασία (Dalton et al., 1997).

Λόγω της ανθεκτικότητας στις διακυμάνσεις της θερμοκρασίας και της ανθεκτικότητας στις υψηλές συγκεντρώσεις άλατος, η *L. monocytogenes* μπορεί να επιβιώσει κατά την παραγωγική διαδικασία του τυριού, όπου συγκεντρώνεται κυρίως στο τυρόπηγμα. Η ανάπτυξη της επιβραδύνεται λόγω της οξυγαλακτικής καλλιέργειας αλλά δεν αναστέλλεται (Farber et al., 1999).

Η *L. monocytogenes* έχει ιδιαίτερη σημασία γιατί είναι ψυχρόφιλο παθογόνο βακτήριο και μπορεί να αναπτύσσεται σε διάφορα προϊόντα κρέατος όταν συντηρούνται στην ψύξη (0-4°C) (Walker et al., 1990).

Ο μικροοργανισμός αναπτύσσεται καλύτερα στα πουλερικά σε σχέση με οποιοδήποτε άλλο κρέας. Η ανάπτυξη της *L. monocytogenes* στο κρέας εξαρτάται από τον τύπο του κρέατος, το pH και την παρουσία άλλων μικροοργανισμών. Η μόλυνση του μυϊκού ιστού προκαλείται κατά τη διάρκεια της σφαγής, του τεμαχισμού και των χειρισμών του. Το βακτήριο προσκολλάται στην επιφάνεια του κρέατος και δύσκολα αφαιρείται. Ωστόσο, με τη συνήθη θερμική επεξεργασία οι πληθυσμοί του βακτηρίου μειώνονται και ο κίνδυνος της επιβίωσης του θεωρείται απίθανος (Nyati, 2000).

Προϊόντα θερμικής επεξεργασίας κρέατος και πουλερικών που προορίζονται για ωμή κατανάλωση έχουν ενοχοποιηθεί για τροφολοιμώξεις. Όπως επίσης και τα λουκάνικα που δε θερμάνθηκαν επαρκώς και κοτόπουλα που δεν είχαν υποστεί την κατάλληλη θερμική επεξεργασία (Swaminathan, 2001).

Μερικά από τα αλιεύματα που αποτελούν τρόφιμα υψηλού κινδύνου για λιστερίωση είναι τα μαλάκια, το ωμό ψάρι, τα προϊόντα ψαριών που έχουν υποστεί επεξεργασία όπως αλίπαστα, τα ελαφρώς θερμασμένα προϊόντα ψαριών και οστρακοειδών (Huss et al., 2000).

### 2.3.7 Πρόληψη

Ιδιαίτερη σημασία πρέπει να δοθεί στην εφαρμογή του συστήματος Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP) στα εργοστάσια επεξεργασίας τροφίμων, στην αποφυγή κατανάλωσης τροφίμων που ευνοούν τον πολλαπλασιασμό της *Listeria* από τις ευπαθείς ομάδες ανθρώπων, τη σωστή θερμική επεξεργασία των τροφίμων πριν την κατανάλωση τους.

Άλλα μέτρα πρόληψης είναι:

- η αποφυγή κατανάλωσης τροφών μολυσμένων από ζώα
- η τήρηση των κανόνων υγιεινής
- η αποτελεσματική αποστείρωση των επιφανειών επαφών τροφίμων
- να μην έρχονται σε επαφή τα ωμά τρόφιμα με τα μαγειρεμένα τρόφιμα για την αποφυγή διασταυρούμενης μόλυνσης
- το γάλα που προορίζεται για κατανάλωση να είναι παστεριωμένο
- η σωστή θερμική επεξεργασία των τροφίμων ζωϊκής προέλευσης
- για τα έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα απαραίτητος είναι ο έλεγχος της θερμοκρασίας (National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods, 1991).

### 2.3.8 Νομοθεσία

Στην κοινοτική νομοθεσία για τα τρόφιμα, η *L. monocytogenes* συγκαταλέγεται μεταξύ των μικροβιολογικών κριτηρίων για ορισμένες κατηγορίες τροφίμων (Πίνακας 1). Συγκεκριμένα στον Κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 2073/2005 (όπως τροποποιήθηκε και ισχύει) καθορίζονται τα μικροβιολογικά κριτήρια ασφάλειας των τροφίμων και τα μικροβιολογικά κριτήρια υγιεινής της παραγωγικής διαδικασίας. Τα τρόφιμα κατηγοριοποιούνται με βάση τον κίνδυνο ανάπτυξης της *L. monocytogenes*. Τα τρόφιμα υψηλού κινδύνου, δηλαδή τρόφιμα έτοιμα για κατανάλωση ικανά να υποστηρίξουν την ανάπτυξη της (με βάση ιδιότητες όπως pH,  $a_w$  και διάρκεια ζωής >5 μέρες) θα πρέπει να είναι αρνητικά για *L. monocytogenes* σε ένα δείγμα 25g στο σημείο της αποδέσμευσης από τον παρασκευαστή, αλλά επιτρέπει να περιέχουν ως 100cfu/g μέχρι το τέλος της διάρκειας ζωής του προϊόντος. Το όριο των 100cfu/g ισχύει επίσης σε όλη τη διάρκεια ζωής των τροφίμων, που διατίθενται στην αγορά ως έτοιμα για κατανάλωση τρόφιμα (RTE), μη ικανά να υποστηρίξουν την ανάπτυξη της *L. monocytogenes*.

Ο παραγωγός ενός τροφίμου πρέπει να αποφασίσει αν το τρόφιμο που προορίζεται για ανθρώπινη κατανάλωση είναι «έτοιμο να καταναλωθεί ως έχει», χωρίς να χρειάζεται να μαγειρευτεί ή να υποστεί άλλη επεξεργασία αποτελεσματική για να εξαλείψει ή να μειώσει σε αποδεκτό επίπεδο τους επικίνδυνους μικροοργανισμούς προκειμένου να εξασφαλιστεί η ασφάλειά του και η συμμόρφωσή του προς τα μικροβιολογικά κριτήρια (Κοντοπούλου και συν., 2015).

**Πίνακας 1.** Κριτήρια για τη *L. monocytogenes* ανάλογα με το τρόφιμο, όπως ορίζονται στον Κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 2073/2005 (και στον Κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 1441/2007 που τον τροποποιεί)

<b>Κατηγορία τροφίμων</b>	<b>Όρια</b>	<b>Που εφαρμόζεται το κριτήριο</b>
Τρόφιμα έτοιμα για κατανάλωση για βρέφη & ειδικούς ιατρικούς σκοπούς	Να μην ανιχνεύεται σε 25 g	Προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια διατήρησής τους
Έτοιμα για κατανάλωση τροφίμα διαφορετικά κατηγορίας 1 ικανά να υποστηρίξουν την ανάπτυξη της <i>L. monocytogenes</i>	Να μην ανιχνεύεται σε 25 g <100cfu/g	Πριν το τρόφιμο αποδεσμευτεί από τον άμεσο έλεγχο του υπεύθυνου της επιχείρησης που το παρήγαγε  Προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια της διατήρησής τους
Τρόφιμα έτοιμα για κατανάλωση μη ικανά να υποστηρίξουν την ανάπτυξη της <i>L. monocytogenes</i> διαφορετικά απο αυτά της κατηγορίας 1	Να μην ανιχνεύεται σε 25 g	Προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια της διατήρησής τους

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3:**

### **Σαλάτες έτοιμες προς κατανάλωση (Μαγιονέζα-Σάλτσες και Παρεμφερή Προϊόντα, άρθρο 41, ΚΤΠ, 2014)**

Σύμφωνα με το Κώδικα Τροφίμων και Ποτών (ΚΤΠ 2014) οι σαλάτες αυτές συμπεριλαμβάνονται στο άρθρο 41 (Μαγιονέζα-Σάλτσες και Παρεμφερή Προϊόντα).

Οι πωλήσεις στις παραδοσιακές σαλάτες έχουν αυξηθεί τις δυο τελευταίες δεκαετίες τόσο στην Ευρώπη, όσο και στην Αμερική. Η παρασκευή τους βασίζεται σε μια ποικιλία συνταγών. Συνήθως αποτελούνται από μια βάση (μαγιονέζα, γιαούρτι, τυρί), στην οποία προστίθενται μικρά κομμάτια ζωϊκής ή φυτικής προέλευσης.

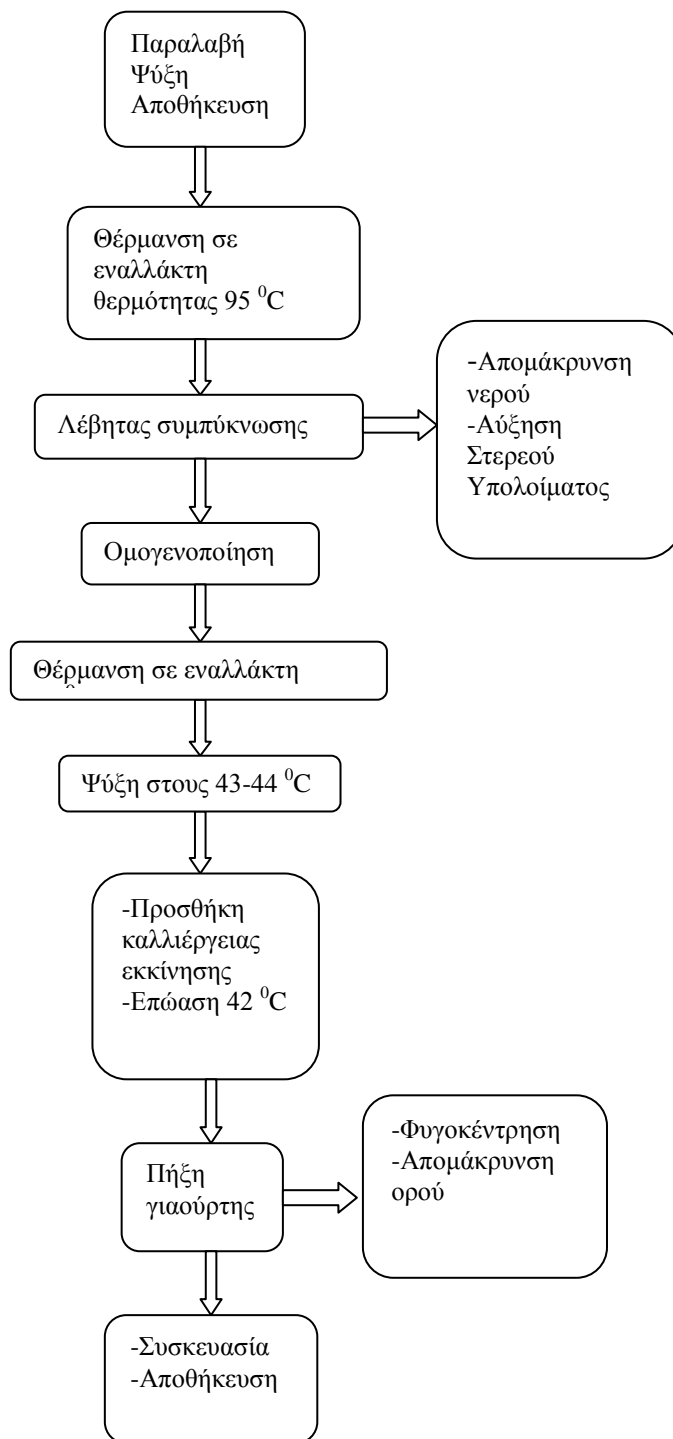
#### **3.1 Τζατζίκι**

Το τζατζίκι είναι η πιο χαρακτηριστική ελληνική συνταγή και αποτελείται από στραγγιστή γιαούρτη, συνήθως από πρόβειο ή αίγιο γάλα και παρασκευάζεται αναμειγνύοντας τη γιαούρτη με σκόρδο, αγγούρι, αλάτι, ελαιόλαδο, πιπέρι και μερικές φορές χυμό λεμονιού, άνηθο, μαϊντανό και δυόσμο.

##### **3.1.1 Γιαούρτη**

Το κύριο συστατικό του τζατζικιού είναι η στραγγιστή γιαούρτη. Το διάγραμμα ροής παραγωγής της στραγγιστής γιαούρτης είναι το εξής (Σχήμα 1) (Τσιράκη, 2012) :

- Το γάλα παραλαμβάνεται, ψύχεται και αποθηκεύεται σε δεξαμενές
- Στη συνέχεια το γάλα θερμαίνεται στους 95<sup>0</sup>C σε εναλλάκτη θερμότητας και φέρεται σε λέβητα συμπύκνωσης υπό κενό, όπου απομακρύνεται περίπου το 20% του νερού ή αυξάνεται το Στερεό Υπόλοιμα (ΣΥ) από 12,5% σε 15,5%
- Από το λέβητα, το νερό που απομακρύνεται μεταφέρεται στον εναλλάκτη θερμότητας για τη θέρμανση του εισερχόμενου γάλακτος, ενώ το συμπυκνωμένο γάλα θερμοκρασίας 70<sup>0</sup>C φέρεται για ομογενοποίηση
- Το ομογενοποιημένο γάλα θερμαίνεται στον εναλλάκτη στους 95<sup>0</sup>C 5 min
- Το γάλα ψύχεται στον εναλλάκτη θερμότητας στους 43 – 44<sup>0</sup>C
- Στη συνέχεια το γάλα μεταβιβάζεται σε δεξαμενή αναμονής, όπου προστίθεται η καλλιέργεια της γιαούρτης. Το γάλα επωάζεται στους 42<sup>0</sup>C μέχρι να φτάσει οξύτητα 85<sup>0</sup> D
- Μετά την πήξη της γιαούρτης, γίνεται στράγγισμα του ορού σε φυγοκεντρική μηχανή στους 20<sup>0</sup>C
- Συσκευασία και αποθήκευση



### Διάγραμμα 1. Διάγραμμα ροής παραγωγής γιαούρτης

Η καλλιέργεια της γιαούρτης αποτελείται από τα μικρόβια *Streptococcus thermophilus* και *Lactobacillus bulgaricus* σε αναλογία 1:1. Η πήξη του γάλακτος πραγματοποιείται αρχικά από το οξύ που παράγεται από τον στρεπτόκοκκο σε pH 5-5,5 και στη συνέχεια με τη δράση του οξέος που παράγεται από το λακτοβάκιλλο σε pH 3,8 – 4,4. Στο τέλος της πήξεως το γαλακτικό οξύ είναι σε ποσοστό 0,9 – 0,95% και ο βακτηριακός πληθυσμός σε  $10^9$  cfu/ml (Τσιράκη, 2012)

### 3.1.2 Μικροβιακή γλωρίδα και Ανάπτυξη μικροοργανισμών

Το τζατζίκι λόγω της φύσης του αποτελεί ένα αφιλόξενο περιβάλλον για την ανάπτυξη μικροοργανισμών. Το χαμηλό pH συντελεί στην εξυγίανση της γιαούρτης, ενώ η χαμηλή οξύτητα αποτελεί δυσμενές περιβάλλον για τους μικροοργανισμούς. Τα ενεροβακτηριακά και τα μη σπορογόνα βακτήρια δεν αναπτύσσονται στο pH της γιαούρτης, ωστόσο πρόβλημα αποτελούν οι ζύμες και οι μύκητες οι οποίοι μπορούν να αναπτύσσονται σε χαμηλότερο pH (Κοντοπούλου και συν., 2015). Γνωστή είναι επίσης, η αντιμικροβιακή δράση του σκόρδου σε invitro καλλιέργειες έναντι βακτηρίων όπως ο *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*, *E. Coli* (Τσιράκη, 2012).

Κύριο πρόβλημα αποτελούν οι ζύμες και οι μύκητες. Το χαμηλό pH ευνοεί την ανάπτυξη των ζυμών, οι οποίες μπορούν να προκαλέσουν φούσκωμα, αποβολή ορού και μυρωδιά φρούτου (Λιτοπούλου – Τζανετάκη, 2003). Τα πρόσθετα υλικά του τζατζικιού, όπως το σκόρδο, άνηθο, αγγούρι ενισχύουν την ανάπτυξη των ζυμών. Επίσης, μπορεί να είναι μολυσμένα με παθογόνα μικρόβια όπως, η *L. monocytogenes* (Francis et al., 1999). Η μικροβιολογική γλωρίδα της γιαούρτης πρέπει να αποτελείται μόνο από τα μικρόβια *Streptococcus thermophilus* και *Lactobacillus bulgaricus*, τα οποία χρησιμοποιούνται για την παρασκευή της γιαούρτης (Μαντής 1991). Σταφυλόκοκκοι και κολοβακτηριοειδή μπορούν να απομονωθούν λόγω επιμόλυνσης μετά την παστερίωση (Καλογρίδου – Βασιλειάδου, 1995).

## 3.2 Τυροσαλάτα – Τυροκαυτερή

Για την παρασκευή της Τυροσαλάτας ως πρώτες ύλες χρησιμοποιούνται το τυρί φέτα, το ανθότυρο ή μυζήθρα και η γιαούρτη. Για την παρασκευή της αναμειγνύονται οι πρώτες ύλες με αλάτι, ελαιόλαδο και χυμό λεμονιού. Στην τυροκαυτερή προστίθεται επιπλέον πράσινη καυτερή πιπεριά.

### 3.2.1 Τυρί Φέτα

Το τυρί που συνήθως χρησιμοποιείται στην παρασκευή της τυροσαλάτας είναι η φέτα, το λευκό τυρί και η μυζήθρα. Το διάγραμμα ροής του τυριού φέτα περιλαμβάνει τα εξής στάδια (Σχήμα)) Κυριακοπουλος, 1995):

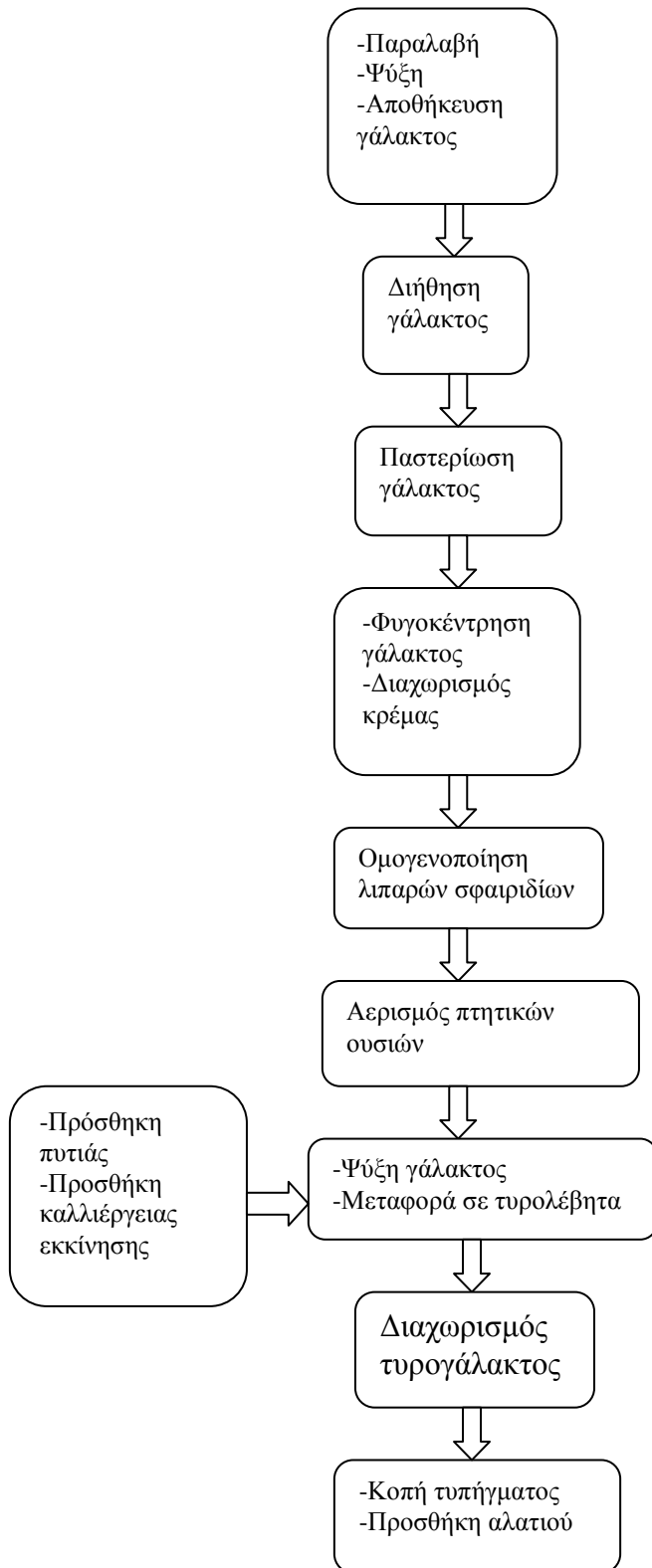
- Παραλαβή ψύξη και αποθήκευση γάλακτος
- Διήθηση γάλακτος
- Μεταφορά γάλακτος σε δεξαμενές και αποθήκευση υπό ψύξη
- Παστερίωση του γάλακτος, είτε με χαμηλή παστερίωση στους 63 – 65<sup>0</sup>C/30min, είτε υψηλή παστερίωση στους 72 - 75<sup>0</sup>C /15 sec για την αδρανοποίηση των μικροοργανισμών
- Τυποποίηση όπου πραγματοποιείται με φυγοκέντρηση ο διαχωρισμός ενός κλάσματος του γάλακτος του γάλακτος με απομάκρυνση της παραγόμενης



- κρέμας.
- Ομογενοποίηση, όπου μειώνεται το μέγεθος των περιεχομένων στο γάλα λιπαρών σφαιριδίων, έτσι ώστε να παραμένουν διασκορπισμένα στο υγρό διάλυμα και να μην δημιουργούν στρώμα κρέμας στην επιφάνεια.
  - Αερισμός, όπου επιτυγχάνεται η απομάκρυνση των αερίων και των δύσοσμων πτητικών ουσιών που μπορεί να περιέχονται στο γάλα.
  - Ψύξη του γάλακτος και μεταφορά στο τυρολέβητα σε θερμοκρασία 32 – 37 °C. Στο στάδιο αυτό προστίθεται η πυτιά και η καλλιέργεια εκκίνησης πήξης του γάλακτος.
  - Διαχωρισμός τυρογάλακτος
  - Κοπή τυροπήγματος και προσθήκη αλατιού για να σταματήσει η ενζυμική δραστηριότητα και τοποθέτηση σε δοχεία στους 22 – 25 °C για 5 - 15 μέρες. Αυτό είναι και το στάδιο που το τυρί αποκτά τις χαρακτηριστικές του ιδιότητες όπως οσμή, γεύση, χρώμα και υφή. Οι πρωτεΐνες διασπώνται σε αμινοξέα και αζωτούχες ενώσεις, η λακτόζη σε γλυκόζη και γαλακτόζη και αυτές μέσω της ζύμωσης δίνουν γαλακτικό οξύ. Το λίπος υδρολύεται σε ελεύθερα λιπαρά οξέα. Όταν η ωρίμανση ολοκληρωθεί το τυρί μεταφέρεται σε ψυκτικούς θαλάμους με θερμοκρασία 2-5°C και σχετική υγρασία 75% και διατηρείται εκεί για τουλάχιστον 2 μήνες πριν τη διανομή προς πώληση.

Η καλλιέργεια εκκίνησης αποτελείται από οξυγαλακτική καλλιέργεια (*Lactococcus lactis* και *Lactobacillus bulgaricus* σε αναλογία 1:3). Έχει τιμή pH 4,6, υγρασία 52%, λίπος 24%, πρωτεΐνες 20% και αλάτι 2,5% (Μάντης, 1991). Παρόμοιο με τη φέτα είναι το λευκό τυρί, που παρασκευάζεται όμως αποκλειστικά από αγελαδινό γάλα. Για τα δύο αυτά προϊόντα η μέγιστη επιτρεπόμενη περιεκτικότητα σε υγρασία είναι 54% και η ελάχιστη περιεκτικότητα σε λιπαρά είναι 46% επί της ξηρής ουσίας (Zerfiridis, 2001).

Η μυζήθρα λαμβάνεται με ισχυρή θέρμανση τυρογάλακτος, με ή χωρίς οξίνιση και την προσθήκη ή όχι γάλακτος, κρέμας γάλακτος και αλατιού. Παρασκευάζεται από το τυρόγαλα φέτας, σκληρών τυριών, όπως το κεφαλοτύρι. Έχει μέγιστη περιεκτικότητα υγρασίας 60 -70%, ελάχιστη περιεκτικότητα σε λιπαρά 50 – 70% επί ξηράς ουσίας. Καταναλώνεται φρέσκια μέσα σε λίγες μέρες ή βδομάδες από την παραγωγή της (Κοντοπούλου και συν., 2015).



**Διάγραμμα 2. Διάγραμμα ροής παραγωγής τυριού**

### 3.2.2 Μικροβιακή χλωρίδα και Ανάπτυξη μικροοργανισμών στο τυρί

Κατά την παραλαβή του γάλακτος ο αριθμός της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας είναι αυξημένος και ο πληθυσμός τους είναι της τάξεως  $10^6$  cfu/ml και κυρίως οφείλετε σε επιμολύνσεις κατά την άλμεξη και την αποθήκευση του γάλακτος στις παγολεκάνες (Nunez et al., 1984). Τα επίπεδα των *Enterobacteriaceae* είναι περίπου της τάξης  $10^2$ - $10^3$  cfu/ml στην φάρμα και περίπου ένα λογάριθμο πάνω κατά την παραλαβή του γάλακτος στη βιομηχανία. *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *E. agglomerans*, *Hafnia alveikai* και *Klebsiella oxytoca* είναι τα κυρίαρχα είδη, ενώ είδη *Salmonellae* δεν ανιχνεύθηκαν (Gaya et al, 1987). Οι *Staphylococci* φθάνουν πληθυσμούς  $10^4$ - $10^5$  cfu/ml κατά την παραλαβή του γάλακτος στη βιομηχανία (Bautista et al., 1986). Ο *S. aureus*, αποτελεί το 42% των απομονώσεων των σταφυλοκόκκων από δείγματα γάλακτος από τη φάρμα, ενώ ανιχνεύθηκαν και ο *S. haemolyticus* and *S. epidermidis* (Bautista et al., 1986).

Στα πρώτα στάδια παραγωγής των τυριών παρατηρείται αυξημένος πληθυσμός της καλλιέργειας εκκίνησης αλλά κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης, την θέση της παίρνει η δευτερεύουσα μικροχλωρίδα (λακτοβάκιλλοι και εντερόκοκκοι). Βέβαια, η σύνθεση της δευτερεύουσας μικροχλωρίδας εξαρτάται ουσιαστικά από τον τύπο του κάθε τυριού καθώς και από την ηλικία του και μπορεί να αποτελείται από διάφορα είδη γαλακτικών βακτηρίων. Τα στελέχη αυτά με τη πρωτεολυτική και πιθανόν λιπολυτική τους δράση διαμορφώνουν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τυριού (Williams and Banks, 1997).

Κατά τη διάρκεια της πήξης, η μείωση του pH που οφείλεται στη δράση των μικροοργανισμών που ζυμώνουν τη λακτόζη, παρατηρείται αύξηση των σταφυλοκόκκων, των εντεροκόκκων και των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων, στη δράση των οποίων οφείλεται η μείωση του pH. Οι σταφυλλόκοκκοι αυξάνονται σε αριθμό ( $10^7$  cfu/g) κατά τον πρώτο μήνα. Ο αριθμός των ολικών κολοβακτηριοειδών αυξάνεται σε πληθυσμό  $10^5$ /g και στη συνέχεια παρατηρείται μείωση (Λιτοπούλου-Τζανετάκη Ε. 1993). Η παρουσία αυξημένου συντελεστή άλατος βοηθά στη μείωση μικροοργανισμών όπως *Staphylococci* και *Clostridia* (Gaya et al., 1988).

Για τα τυριά που ωριμάζουν, η ωρίμανση αποτελεί μηχανισμό εξυγίανσης κυρίως από Gram αρνητικά βακτήρια. Οι σπόροι βακτηρίων, τα οξεάντοχα βακτήρια, οι τοξίνες βακτηρίων και μυκήτων δεν βλέπτονται από τις δυσμενείς συνθήκες που αναπτύσσονται κατά την ωρίμανση. Η σταφυλοκοκκική τοξίνωση θεωρείται η πιο συχνή τροφική δηλητηρίαση από τυριά. Μεγάλος πληθυσμός εντεροτοξινογόνων στελεχών σταφυλοκόκκων στο γάλα πριν από την πήξη οδηγεί σε παραγωγή εντεροτοξίνης, που παραμένει δραστική για πολλούς μήνες. Ο πληθυσμός εντεροπαθογόνων στελεχών *E. coli* και σαλμονελλών μειώνεται κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης. Τα τυριά που ωριμάζουν φέρουν σχετικά μεγάλους πληθυσμούς των οξυγαλακτικών βακτηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για τη ζύμωση και την ωρίμανσή τους. Επίσης βακτήρια επιμόλυνσης, όπως κολοβακτηριοειδή, είδη *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Proteus* καθώς και ζύμες και μύκητες μπορεί να προέλθουν από το αλάτι, την πτυιά, άλλα πρόσθετα και κυρίως από σκεύη, μηχανήματα και το περιβάλλον. Επίσης οι εντερόκοκοι, αντίθετα από τους στρεπτοκόκκους, επειδή είναι ιδιαίτερα ανθεκτικοί,

απομονώνονται από την αρχή μέχρι το τέλος της ωρίμανσης των τυριών. Αυξάνονται σταδιακά ως τον πρώτο μήνα και διατηρούνται έπειτα σε υψηλά επίπεδα (Litoroulou-Tzanetaki, 1990).

Η χλωρίδα των τυριών που δεν ωριμάζουν και ιδιαίτερα αυτών που παρασκευάζονται χωρίς την προσθήκη οξυγαλακτικής καλλιέργειας (μυζήθρα) είναι κυρίως αποτέλεσμα επιμολύνσεων. Τα ψυχρότροφα είδη της χλωρίδας αυτής πολλαπλασιάζονται κατά τη συντήρησή τους και επιφέρουν την αλλοίωσή τους (Μάντης, 1991).

### 3.3 Ουγγαρέζα - Μαγιονέζα

Η ουγγαρέζα ανήκει στις σαλάτες με βάση τη μαγιονέζα. Η μαγιονέζα είναι το προϊόν με μορφή ομοιογενούς πολτού που παρασκευάζεται από εδώδιμο έλαιο με προσθήκη κρόκου αυγού, μαγειρικού αλατιού, αρτυμάτων, χυμού λεμονιών ή κιτρικού οξέος και μερικές φορές ζάχαρης και ξυδιού (άρθ. 41, ΚΤΠ, 2014). Στην παρασκευή της ουγγαρέζας στη μαγιονέζα προστίθεται επιπλέον ζαμπόν και καρυκεύματα. Γενικά, η μαγιονέζα αποτελείται από φυτικό έλαιο 65 – 80%, ξύδι το λιγότερο 6%, κρόκο αυγού. Στις ΗΠΑ η βιομηχανική μαγιονέζα περιέχει 80% έλαιο, 0,29 – 0,5% οξικό οξύ, pH 3.6 – 4.0, 9-12% αλάτι και 7-10% ζάχαρη (Smittle., 2000). Η περιεκτικότητα σε έλαιο δεν πρέπει να είναι μικρότερη από 65% και τουλάχιστον 2,5% οξικό οξύ. Στη θέση του οξικού οξέος μπορεί να χρησιμοποιηθεί κιτρικό οξύ στη μορφή χυμού λεμονιού. Ο κρόκος αυγού μπορεί να είναι μόνο κρόκος, ολόκληρο αυγό ή αυγό σε σκόνη (Κοντοπούλου και συν., 2014).

#### 3.3.1 Μικροβιακή Χλωρίδα και Ανάπτυξη μικροοργανισμών στη μαγιονέζα

Τα κύρια συστατικά της μαγιονέζας, έλαιο, νερό, αλάτι, ξύδι δεν ευνοούν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Τα συστατικά που χρησιμοποιούνται σε μικρότερες ποσότητες, όπως το αυγό, η ζάχαρη, τα μπαχαρικά μπορεί να φέρουν μικροοργανισμούς με αποτέλεσμα τη μόλυνση της μαγιονέζας (Sperber., 2009). Τα αυγά μπορεί να είναι φορείς σαλμονέλλας και άλλων παθογόνων μικροοργανισμών (Smittle., 2000).

Σε βιομηχανικό επίπεδο για την παρασκευή της μαγιονέζας χρησιμοποιούνται παστεριωμένα αυγά γεγονός που δεν αποτελεί σημαντικό κίνδυνο για τη δημόσια υγεία. Οι Spender και Okada (1972) βρήκαν μείωση κατά 6 log της *S.typhimurium* και *S.aureus*, όταν εμβολιάστηκαν σε βιομηχανικά παρασκευασμένη μαγιονέζα. Η σπιτική μαγιονέζα, ωστόσο, έχει συνδεθεί με διάφορα κρούσματα τροφικών δηλητηριάσεων κυρίως από σαλμονέλα λόγω της χρήσης μολυσμένων νωπών αυγών (Litoroulou-Tzanetaki, 1990).

Λόγω της συνδυαστικής δράσης του χαμηλού pH, του οξικού οξέος και τη χαμηλής ενεργότητας ύδατος η μαγιονέζα αποτελεί δυσμενές περιβάλλον για την ανάπτυξη μικροοργανισμών. Για το λόγο αυτό δε δημιουργείται η ανάγκη προσθήκης συντηρητικών (Gaya e tal., 1987).

Τέλος η προσθήκη του ζαμπόν στη μαγιονέζα μπορεί να αποτελεί πιθανή πηγή *L. monocytogenes* (Smittle, 2000).

### 3.4 Μικροβιολογική ποιότητα των έτοιμων προς κατανάλωση σαλατών

Υπάρχουν κάποια δεδομένα από ελέγχους έτοιμων προς κατανάλωση σαλατών από τη διεθνή βιβλιογραφία. Ωστόσο, ελάχιστα δεδομένα υπάρχουν στην βιβλιογραφία για την μικροβιολογική κατάσταση των προϊόντων αυτών στην χώρα μας γενικότερα και ειδικότερα στην περιοχή της Θεσσαλίας.

Η Κοντοπούλου και συν. (2015) εξέτασαν 52 δείγματα έτοιμων προς κατανάλωση σαλατών (13 δείγματα από τυροσαλάτα, τζατζίκι, ουγγαρέζα, κηπουρού), που πωλούνται χύμα σε ταχυφαγεία και υπεραγορές της πόλης της Λάρισας. Από τα 26 δείγματα σαλατών κηπουρού και ουγγαρέζας που εξετάστηκαν στην παρούσα μελέτη τα 19 (73,1%) είχαν πληθυσμούς O.M.X.  $< 10^6$  και τα 7 (26,9%)  $> 10^6$  cfu/g. Επίσης, από τα 52 δείγματα που εξετάστηκαν, τα 47 (90,4%) είχαν πληθυσμούς εντεροβακτηριοειδών  $< 10^2$  και 5 δείγματα τυροσαλάτας (9,6%)  $> 10^2$  cfu/g. Σε κανένα από τα δείγματα σαλατών δεν καταγράφηκε παρουσία της *Salmonella* spp. Τέλος, 2 από το σύνολο των 52 δειγμάτων (3,85%) που εξετάστηκαν βρέθηκαν θετικά στην παρουσία της *L. monocytogenes*. Το ένα δείγμα σαλάτας που απομονώθηκε το παθογόνο ήταν ουγγαρέζα και το άλλο δείγμα ήταν τυροσαλάτα, ενώ και τα δύο δείγματα προέρχονταν από ταχυφαγεία. Στα δύο αυτά δείγματα, τα οποία βρέθηκαν θετικά στην παρουσία του παθογόνου, οι πληθυσμοί της *L. monocytogenes* ήταν χαμηλότεροι από το κριτήριο ασφαλείας (100 cfu/g) που ορίζεται από τη νομοθεσία για τα έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα. Οι Angelidis et al. (2006) σε εργασία που πραγματοποιήθηκε επίσης στη χώρα μας εξέτασαν 7 δείγματα σαλατών έτοιμων προς κατανάλωση (τζατζίκι, κηπουρού, ρωσική) και οι πληθυσμοί της OMX βρέθηκαν  $5,1 \pm 2,2 \log$  cfu/g. Σε κανένα από τα δείγματα δεν ανιχνεύτηκε *Salmonella* spp και *Listeriamonocytogenes*. Στην Ελλάδα επίσης πραγματοποιήθηκε εξέταση έτοιμων σαλατών στο εργοστάσιο παρασκευής τους και ανιχνεύτηκε *Staphylococcus aureus* σε 9 από τα 20 δείγματα στην τυροσαλάτα και σε 3 από τα 20 δείγματα στο τζατζίκι. Επίσης εξετάστηκαν τα βασικά συστατικά τους (τυρί φέτα, μυζήθρα, μαγιονέζα) και βρέθηκαν θετικά στον *S. aureus* 4 δείγματα τυριού φέτας (40%), 4 δείγματα μυζήθρας (40%) και 3 δείγματα μαγιονέζας (30%) (Sergelidis et al., 2012)

Στη Νότια Αφρική (Γιοχάνεσμπουργκ) σε 12 δείγματα σαλατών έτοιμων προς κατανάλωση από σημεία λιανικής πώλησης ο πληθυσμός της OMX ήταν  $7 \pm 1,2 \log$  cfu/g ενώ οι πληθυσμοί των κολοβακτηριοειδών ήταν  $5,1 \pm 0,9 \log$  cfu/g. Στην έρευνα αυτή 4 από τα 35 δείγματα βρέθηκαν θετικά για *Salmonella* spp, ενώ 1 βρέθηκε θετικό για *L. Monocytogenes* (Christison et al., 2008).

Στην Τουρκία εξετάστηκαν 261 δείγματα έτοιμων προς κατανάλωση σαλατών (τύπου «ρώσικης», τύπου «καίσαρα» τύπου «τονοσαλάτας») και βρέθηκαν πληθυσμοί κολοβακτηριοειδών και *E. coli* στο 59,3% και στο 3,8% των δειγμάτων αντίστοιχα ενώ 21 δείγματα βρέθηκαν θετικά για *Salmonella* spp και 15 δείγματα για *L. monocytogenes* (Gurler et al., 2006).

Στη Μεγάλη Βρετανία εξετάστηκαν 1418 δείγματα έτοιμων προς κατανάλωση σαλατών με βάση τη μαγιονέζα από υπεραγορές και καταστήματα εστίασης από τα οποία 54 ήταν θετικά για *L. monocytogenes* (Little et al., 2007). Στις ΗΠΑ το 2,36% των 8549 δειγμάτων έτοιμων προς κατανάλωση σαλατών βρέθηκε θετικό για το παθογόνο (Gombas et al., 2003). Και στο Βέλγιο, από τα 1187 δείγματα έτοιμων προς κατανάλωση με βάση τη μαγιονέζα, τα 80 (6,7%) βρέθηκαν θετικά, όμως σε πληθυσμό που δεν υπερέβαινε το όριο 100 cfu/g που τίθεται ως κριτήριο ασφαλείας από τη νομοθεσία (Uyttendaele et al., 2009).

## ΜΕΡΟΣ 2<sup>ο</sup>

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: Υλικά και Μέθοδοι

#### 4.1 Συλλογή Δειγμάτων

Εξετάστηκαν 90 δείγματα έτοιμων προς κατανάλωση σαλατών, 30 δείγματα τυροσαλάτας-τυροκαυτερής, 30 δείγματα τζατζικιού και 30 δείγματα ουγγαρέζας, τα οποία πωλούνται ταχυφαγείασις πόλεις της Λάρισας και της Καρδίτσας. Το κάθε δείγμα(βάρους περίπου 100 γραμμαρίων) τοποθετούνταν από τους πωλητές των ταχυφαγείων σε πλαστικά δοχεία, τα οποία προορίζονται για τον σκοπό αυτό και μεταφέρονταν σε ισοθερμικό δοχείο υπό συνθήκες ψύξης (4<sup>0</sup>C) στο εργαστήριο Υγιεινής & Επιδημιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και εξετάζονταν άμεσα, μέσα στην επόμενη ώρα. Στα δείγματα έγινε μικροβιολογικός έλεγχος και μέτρηση της τιμής του pH.

#### 4.2 Μικροβιολογική ανάλυση

Τα δείγματα εξετάστηκαν για τον έλεγχο της υγιεινής κατάστασής τους λαμβάνοντας υπόψη τα κριτήρια υγιεινής και ασφάλειας που περιγράφονται στον Κανονισμό (ΕΚ) 2073/2005 περί μικροβιολογικών κριτηρίων στα τρόφιμα, όπως τροποποιήθηκε και ισχύει.

Στα δείγματα πραγματοποιήθηκαν οι εξής μικροβιολογικές εξετάσεις:

- Καταμέτρηση Ολικής ΜεσόφιληςΧλωρίδας
- Καταμέτρηση *Enterobacteriaceae*
- Καταμέτρηση *L. monocytogenes*
- Ανίχνευση *Salmonellas* pp
- Καταμέτρηση *S. aureus*

##### **4.2.1 Καταμέτρηση των *Enterobacteriaceae* σύμφωνα με τη μέθοδο BS 5763 Part:10 1993, ISO 7402:1993**

Για κάθε δείγμα σαλάτας γινόταν αραιώση 1/10 τοποθετώντας σε σακούλα stomacher 25g σαλάτας και 225 ml BufferPeptoneWater. Ακολουθούσε ομογενοποίηση στη συσκευή stomacher για 1 min. Στη συνέχεια γίνονται διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις σε MaximumRecoveryDiluent MRD. Από κάθε αραιώση ενοφθαλμίζονταν 1 ml σε τρυβλία και προστίθονταν 10 – 15 ml VioletRedBrilliantGreenAgar (VRBGA). Ακολουθούσε ανάδευση για να επιτευχθεί ομογενοποίηση και στην συνέχεια γινόταν επιστιβάνυση με

10 ml VRBGA. Τα τρυβλία επωάζονταν στους 37 °C για 24±4h σε αερόβιες συνθήκες. Καταμετρούνταν οι τυπικές μωβ αποικίες και γινόταν επιβεβαίωση με επιβεβαιωτικές δοκιμές σε τουλάχιστον 5 αποικίες (PurpleGlucose και παραγωγή αερίου σε δοκιμαστικό σωληνάριο Durham).

#### **4.2.2 Καταμέτρηση της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας (OMX) σύμφωνα με τη μέθοδο ISO 4833**

Ποσότητα 25 γραμμαρίων από κάθε δείγμα σαλάτας τοποθετούνταν σε σακούλα stomacher που περιείχε 225 ml Buffer Peptone Water (LABM, Lot 1118833/228) και ομογενοποιούνταν για 1 min σε συσκευή stomacher. Πραγματοποιήθηκαν οι περαιτέρω δεκαδικές αραιώσεις σε MRD (LABM, Lot 109727/138). 1 ml από κάθε αραιώση ενοφθαλμίζονταν σε διπλή σειρά τρυβλίων στο οποίο γινόταν προσθήκη 15 ml Yeast Extract (LABM, Lot 106811/347) ακολουθούσε ανάμειξη με ήπια ανάδευση και στερεοποίηση. Τα τρυβλία τοποθετούνταν για επώαση στους 30 °C για 48±4 ώρες σε αερόβιες συνθήκες. Μετά την επώαση καταμετρούνταν όλες οι ορατές αποικίες με τη βοήθεια μετρητή αποικιών και το αποτέλεσμα εκφράζονταν σε αριθμό μικροοργανισμών/ g σαλάτας.

Η μικροβιολογική αυτή ανάλυση πραγματοποιήθηκε μόνο για τις σαλάτες συγγραφέας, δεδομένου ότι η τυροσαλάτα και το τζατζίκι περιέχουν οξυγαλακτικούς μικροοργανισμούς, λόγω των πρώτων υλών παρασκευής τους (τυρί και γιαούρτι αντίστοιχα).

#### **4.2.3 Καταμέτρηση της *Listeriamonocytogenes* σύμφωνα με τη μέθοδο ISO 11290-2**

Για κάθε δείγμα σαλάτας γινόταν αραιώση 1/10 τοποθετώντας σε σακούλα stomacher 25g σαλάτας και 225 ml BufferPeptoneWater. Ακολουθούσε ομογενοποίηση στη συσκευή stomacher για 1 min. Οι σακούλες stomacher αφήνονταν στους 20±2°C για 1h±5. Ακολουθούσαν διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις και έπειτα ποσότητα 0,1 ml από κάθε αραιώση επιστρώνονταν επιφανειακά σε τρυβλία με Aloa Agar *Listeria* Ottavi and Agosti, τα οποία επωάζονταν στους 37±1 °C για 24±3 h σε αερόβιες συνθήκες.

Σε θετικό αποτέλεσμα εμφανίζονται γαλαζοπράσινες αποικίες με άλω. Ανακαλλιεργούνταν 5 τουλάχιστον τυπικές αποικίες σε TrypticSoyYeastExtractAgar (TSYEA) και ακολουθούν επιβεβαιωτικές δοκιμές (Δοκιμασία καταλάσης, χρώση Gram, δοκιμασία αιμόλυσης CampT est, API *Listeria* kit).

#### **4.2.4 Ανίχνευση της *Salmonellaspp* σύμφωνα με τη μέθοδο ISO 6579:2002**

Για κάθε δείγμα σαλάτας γίνονταν αραιώση 1/10 τοποθετώντας σε σακούλα stomacher 25g σαλάτας και 225 ml BufferPeptoneWater. Ακολουθούσε ομογενοποίηση στη συσκευή stomacher για 1 min και επωάζεται στους 37±1 °C για 18±2 h σε αερόβιες



συνθήκες. Έπειτα, από τις σακούλες stomacher τοποθετούνταν 0,1 ml σε δοκιμαστικούς σωλήνες με 10 ml Rappaport Vasiliadis Broth που επωάζονται στους  $41,5 \pm 1$  °C για  $24 \pm 3$  h και 1 ml σε δοκιμαστικούς σωλήνες με 10 ml Mueller Kauffman Tetra Thionate Broth που επωάζονταν στους  $37 \pm 1$  °C για  $24 \pm 3$  h. Στη συνέχεια με τη χρήση κρίκου 10 ml γινόταν επίστρωση από κάθε εκλεκτικό ζυμό στα εκλεκτικά υποστρώματα Xylose lysine deoxycholate (XLD) Agar και Brilliant Green Agar (BGA) και ακολουθούσε επώαση στους  $37 \pm 1$  °C για  $24 \pm 3$  h.

Με θετικό αποτέλεσμα εμφανίζονταν μαύρες τυπικές αποικίες στο XLD και κόκκινες στο BGA. Γινόταν ανακαλλιέργεια σε τουλάχιστον 5 τυπικές αποικίες και από τα δυο εκλεκτικά υποστρώματα σε Nutrient Agar, και ακολουθούσαν οι επιβεβαιωτικές βιοχημικές (API 20E kit) και ορολογικές δοκιμές με τη χρήση αντιορών έναντι του σωματικού Ο και βλεφαριδικού Η αντιγόνου για τον προσδιορισμό του ορότυπου *Salmonella*.

#### **4.2.5 Καταμέτρηση του *Staphylococcus aureus* σύμφωνα με τη μέθοδο ISO 6889, 1:1999/A1:2004**

Για κάθε δείγμα σαλάτας γινόταν αραιώση 1/10 τοποθετώντας σε σακούλα stomacher 25g σαλάτας και 225 ml Buffer Peptone Water. Ακολουθούσε ομογενοποίηση των υλικών στη συσκευή stomacher για 1 min. Στη συνέχεια γίνονταν οι διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις σε MRD. Από κάθε αραιώση ενοφθαλμίζονταν 0,1 ml σε εκλεκτικό υπόστρωμα Baird Parker με Egg Yolk tellurite emulsion 20%. Ακολουθούσε επώαση των τρυβλίων στους  $37$  °C για  $44 \pm 4$  h σε αερόβιες συνθήκες.

Σε θετικό αποτέλεσμα εμφανίζονταν μαύρες αποικίες οι οποίες καταμετρούνταν. Γινόταν ανακαλλιέργεια τουλάχιστον 5 ύποπτων αποικιών σε Brain Heart Infusion Broth και επώαση στους  $37 \pm 1$  °C για  $24 \pm 2$  h, ώστε να ελεγχθεί η παραγωγή πηκτάσης με Rabbit plasma σε 4 και 24 ώρες. Στα πηκτάση θετικά στελέχη γίνεται επιβεβαίωση με *Staphylococcus aureus* API kit.

### **4.3 Ταυτοποίηση μικροοργανισμών**

Η ταυτοποίηση των απομονωθέντων μικροοργανισμών έγινε στο εργαστήριο Υγιεινής & Επιδημιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας με τη μέθοδο φασματομετρίας μάζων matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight MALDI-TOF MS.

Η φασματομετρία μάζας είναι μια διαγνωστική μέθοδος, η οποία χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του μοριακού βάρους και της δομής των οργανικών ενώσεων. Ο όρος MALDI αναφέρεται στη διαδικασία με την οποία παράγονται τα ιόντα και ο όρος TOF αναφέρεται στον αναλυτή της μεθόδου (time of flight, αναλυτής χρόνου-πτήσης) (Ελληνική Μικροβιολογική Εταιρεία, 2009).

Βασική αρχή της μεθόδου είναι η μέτρηση της μάζας –για την ακρίβεια η μέτρηση του λόγου μάζας προς φορτίο, mass-to-charge ratio, m/z– μορίων που έχουν μετατραπεί σε

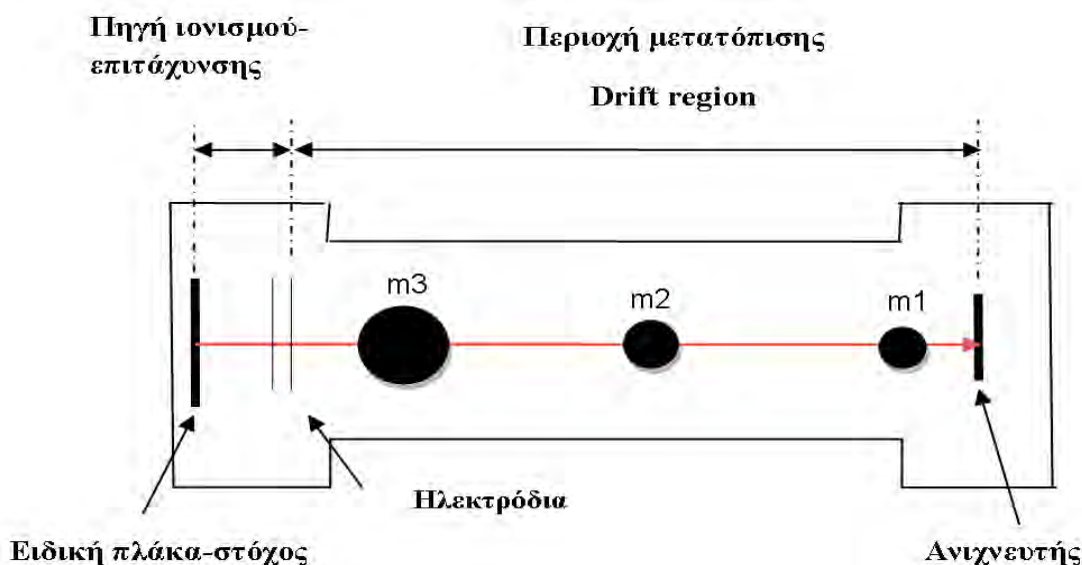
θετικά ή αρνητικά φορτισμένα ιόντα. Ως μονάδα μέτρησης μάζας ( $m$ ) χρησιμοποιείται το Dalton ( $m=Da$ ), που ισούται με το  $1/12$  της μάζας του ατόμου  $^{12}C$ , ενώ ως μονάδα μέτρησης φορτίου ( $z$ ) χρησιμοποιείται το θεμελιώδες φορτίο ενός ηλεκτρονίου ( $z=e^-$ ), ώστε ο λόγος μάζας προς φορτίο ( $m/z$ ) να αντιστοιχεί σε Daltons/θεμελιώδες φορτίο. Είναι ευνόητο ότι στις περιπτώσεις που τα ανιχνευόμενα ιόντα έχουν φορτίο  $z=1$ , ο λόγος  $m/z$  ισούται με το μοριακό βάρος σε Daltons (Ελληνική Μικροβιολογική Εταιρεία, 2009).

Η προετοιμασία του προς εξέταση δείγματος βασίζεται στην ανάμειξή του με ένα χημικό υπόστρωμα (μήτρα, matrix), που είναι ήδη διαλυμένο σε κατάλληλο διαλύτη, και την τοποθέτηση του μείγματος σε ειδική πλάκα από ανοξείδωτο ατσάλι (target plate), ώστε αυτό να περιέλθει σε ξηρή μορφή. Ο διαλύτης του χημικού υποστρώματος πρέπει να είναι συμβατός με την προς εξέταση ουσία, ώστε να προλαμβάνεται η συσσώρευση της και να προάγεται η δημιουργία ομογενούς κρυστάλλου με ομοιόμορφη διασπορά μεταξύ των μορίων της ουσίας και του χημικού υποστρώματος. Με την εφαρμογή του παλμικού Laser (nitrogen Laser, μήκος κύματος 337 nm, διάρκεια παλμού 1–5 ns) προκαλείται μερική ατμοποίηση του υποστρώματος κατά ώσεις, με επακόλουθη μεταφορά ιονισμένων μορίων του δείγματος στην αέρια φάση (Ελληνική Μικροβιολογική Εταιρεία, 2009).

Το κατάλληλο υπόστρωμα έχει τις εξής ιδιότητες: (α) είναι χημικά σταθερό στις συνθήκες υψηλού κενού που λειτουργεί ο φασματογράφος μάζας, (β) απορροφά υπεριώδη ακτινοβολία στο μήκος κύματος λειτουργίας του Laser και εξατμίζεται, συμπαρασύροντας γειτονικά μόρια της ουσίας στην αέρια φάση, (γ) περιορίζει σημαντικά τη χημική αποδόμηση (fragmentation) της προς εξέταση ουσίας καθώς απορροφά το μεγαλύτερο μέρος της ενέργειας της προσπίπτουσας ακτίνας Laser και (δ) συνεισφέρει στον ιονισμό της εξεταζόμενης ουσίας. Τα συνηθέστερα χημικά υποστρώματα είναι τα εξής: sinapinic acid (SA), alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) και 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB) (Ελληνική Μικροβιολογική Εταιρεία, 2009).

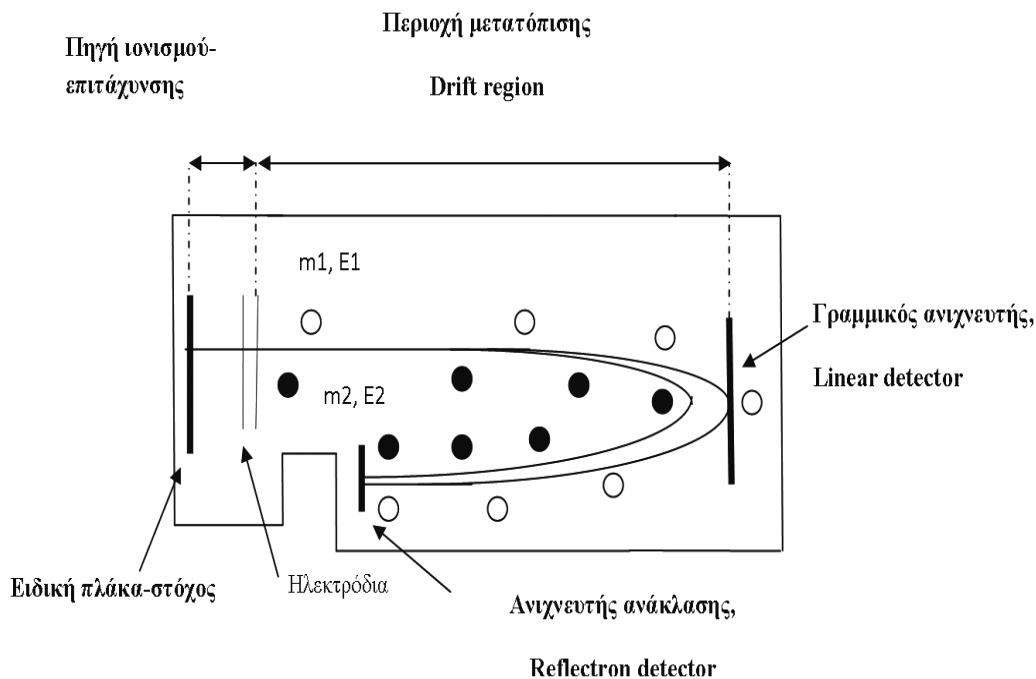
Στη διαδικασία της μεθόδου, το μείγμα δείγματος-υποστρώματος τοποθετείται σε ειδική πλάκα-στόχο (target plate) και εισάγεται στην περιοχή ιονισμού σε συνθήκες υψηλού κενού αερίων. Η εφαρμογή κενού είναι απαραίτητη σε όλη τη διάρκεια της εξέτασης, ώστε να ελαχιστοποιείται η πιθανότητα συγκρούσεων μεταξύ ιονισμένων μορίων του εξεταζόμενου δείγματος και μορίων αέρα. Επίσης, η απουσία αέρα αποτρέπει την εκφόρτιση των υψηλών δυναμικών που χρησιμοποιούνται για την επιτάχυνση και τη μεταφορά των ιόντων στη θέση ανίχνευσης, καθώς επίσης περιορίζει την πιθανότητα επιμόλυνσης ή ανάμειξης διαδοχικών δειγμάτων. Η παλμική μορφή της προσπίπτουσας ενέργειας προκαλεί ιονισμό κατά κύματα και τα παραγόμενα ιόντα αφού επιταχυνθούν με τη βοήθεια ηλεκτρικού πεδίου οδηγούνται στο φίλτρο μαζών (αναλυτής χρόνου-πτήσης, time of flight analyzer, TOF-analyzer). Ο αναλυτής TOF διαχωρίζει τα ιόντα με βάση το λόγο μάζας προς φορτίο (mass-to-charge ratio,  $m/z$ ), υπολογίζοντας το χρόνο που χρειάζεται για να διανύσουν τη διαδρομή εντός σωλήνα ορισμένου μήκους σε απουσία ηλεκτρικού πεδίου (περιοχή μετατόπισης, drift region) κινούμενα ευθύγραμμα και ομαλά μετά από την αρχική επιτάχυνσή τους και εστιάζει τις δέσμες ιόντων στον ανιχνευτή (detector). Εκτός από σταθερές παραμέτρους, ο χρόνος αυτός εξαρτάται από το λόγο μάζα/φορτίο του ανιχνευόμενου ιόντος και ως εκ τούτου επιτυγχάνεται γρήγορα και ικανοποιητικά η διάκριση των ιόντων ανάλογα της μάζας τους σε ένα θεωρητικά

απεριόριστο εύρος  $m/z$  τιμών (γραμμική λειτουργία αναλυτή χρόνου- πτήσης, Linear TOF) (Ελληνική Μικροβιολογική Εταιρεία, 2009).



**Εικόνα 1.** Γραμμική λειτουργία αναλυτή χρόνου-πτήσης, linear TOF ( $m_3 > m_2 > m_1$ ) (Ελληνική Μικροβιολογική Εταιρεία, 2009).

Το θεωρητικό μοντέλο της ισόχρονης ανίχνευσης όλων των ιόντων με τον ίδιο λόγο  $m/z$ , δεν ισχύει στην πράξη, λόγω διαφορών που προκύπτουν από τις συγκεκριμένες συνθήκες παραγωγής του κάθε ιόντος. Το πρόβλημα αυτό αντιμετωπίζεται ικανοποιητικά με την εφαρμογή δύο ειδικών τεχνικών, γνωστών ως delayed ion extraction και reflectron. Με βάση την πρώτη τεχνική (delayed ion extraction), το ηλεκτροστατικό πεδίο επιτάχυνσης των ιόντων ενεργοποιείται και απενεργοποιείται σε συνάρτηση με τον ακριβή χρόνο εφαρμογής του παλμού Laser, ώστε να προσδίδεται περισσότερη ενέργεια σε ιόντα με μικρότερη αρχική ταχύτητα στην περιοχή μετατόπισης, ώστε να αποκτούν μεγαλύτερη ταχύτητα από τα αρχικά ταχέως κινούμενα ιόντα και να φτάνουν ταυτόχρονα στο τέλος της περιοχής αυτής. Η δεύτερη τεχνική (reflectron) αφορά στην εφαρμογή της ανάκλασης ιόντων (ion reflection). Ο ανακλαστήρας αποτελείται από ηλεκτρόδια όμοιας πολικότητας με τα εξεταζόμενα ιόντα. Βάσει των ιδιοτήτων της ανάκλασης, προκαλείται όχι μόνο η εκτροπή των ιόντων προς αντίθετη κατεύθυνση, αλλά επίσης μεταβάλλεται εκ νέου η κινητική τους ενέργεια, με τρόπο ώστε αυτά να συναθροίζονται ακόμα περισσότερο προς τον ανιχνευτή. Με την εφαρμογή αυτής της μεθόδου αυξάνεται σημαντικά η διακριτική ικανότητα του αναλυτή (Ελληνική Μικροβιολογική Εταιρεία, 2009).

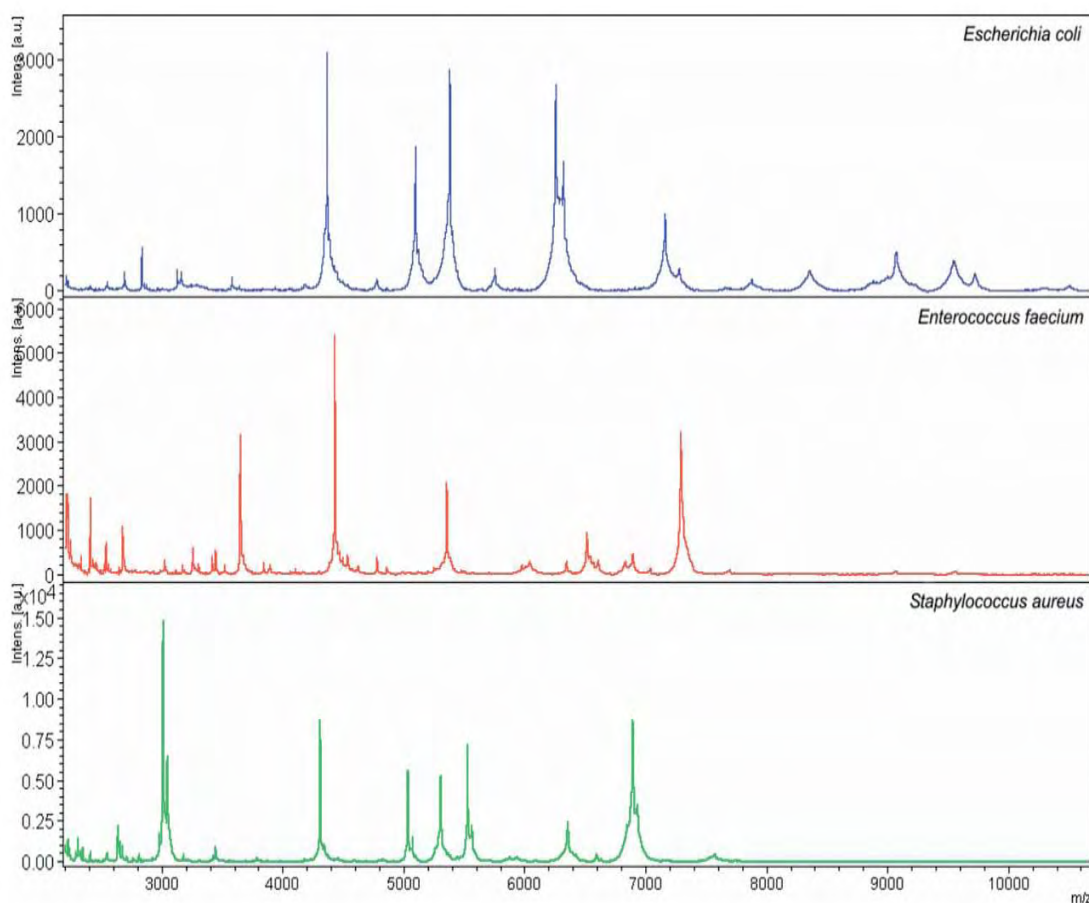


**Εικόνα 2. Εφαρμογή ανάκλασης (reflectron TOF) ( $m_1=m_2$ , κινητική ενέργεια:  $E_1 > E_2$ ) (Ελληνική Μικροβιολογική Εταιρεία, 2009).**

Τα ιόντα, τελικά, καταλήγουν στον ανιχνευτή, αφού διαχωριστούν σε ομάδες ίδιου λόγου  $m/z$ . Ο ανιχνευτής του φασματογράφου μάζας MALDI-TOF-MS είναι μια πλάκα μικροδιοδίων (microchannelplate) και αποτελείται από μια συστοιχία γυάλινων τριχοειδών σωλήνων, τα οποία είναι επιστρωμένα με κατάλληλο υλικό. Κατά την πρόπτωση των ιόντων και, ανάλογα με τον αριθμό τους και την κινητική τους κατάσταση, προκαλείται εκπομπή ηλεκτρονίων από τον ανιχνευτή, επομένως παράγεται ηλεκτρικό ρεύμα, το οποίο, στη συνέχεια, ενισχύεται και παρουσιάζεται τελικά ως φάσμα μάζας (mass spectrum). Όπως είναι φυσικό, η ακρίβεια μέτρησης του ιοντικού ρεύματος εξαρτάται από τον αριθμό των ιόντων που προσπίπτουν στον ανιχνευτή. Για να αυξηθεί ο λόγος σήματος προς θόρυβο (signal to noise ratio, SNR) για το παραγόμενο φάσμα, προηγουμένως το δείγμα σαρώνεται πολλές φορές και υπολογίζεται η μέση τιμή των παραγομένων φασμάτων (Ελληνική Μικροβιολογική Εταιρεία, 2009).

Η καταγραφή και η παρουσίαση του φάσματος μαζών είναι το τελικό στάδιο της τεχνικής. Ο φασματογράφος μάζας είναι εφοδιασμένος με ηλεκτρονικό υπολογιστή και η καταγραφή γίνεται ηλεκτρονικά όπου προκύπτουν κορυφές μικρού εύρους, διαφορετικής σχετικής θέσης και ύψους. Το ύψος της κάθε κορυφής είναι ανάλογο με τη σχετική αφθονία (relative intensity) του ιόντος που αντιπροσωπεύει, ενώ η σχετική θέση στον οριζόντιο άξονα αντιπροσωπεύει τελικά το ζητούμενο λόγο μάζας προς φορτίο του εξεταζόμενου ιόντος. Το πιο άφθονο ιόν χαρακτηρίζεται ως βασική κορυφή του φάσματος και σημειώνεται στον κάθετο άξονα με σχετική αφθονία 100%, ενώ οι άλλες κορυφές λαμβάνουν τιμές ανάλογα με το σχετικό ως προς τη βασική κορυφή ύψος τους. Συνεπώς, η διαδικασία ανίχνευσης μιας ουσίας μέσω του MALDI-TOF-MS χαρακτηρίζεται από την παραγωγή και την αξιόπιστη καταγραφή ενός συγκεκριμένου φάσματος ιόντων, το οποίο συγκρινόμενο με διαθέσιμες ευρείες βάσεις δεδομένων οδηγεί τελικά στην ταυτοποίηση της ουσίας αυτής (Ελληνική Μικροβιολογική Εταιρεία,

2009).



**Εικόνα 3. MALDI-TOF φάσματα διαφορετικών βακτηριακών ειδών (Ελληνική Μικροβιολογική Εταιρεία, 2009).**

Πλεονέκτημα του MALDI-TOF-MS είναι η ικανότητά του να ταυτοποιεί με υψηλή ευαισθησία δείγματα μικροοργανισμών (Gram-αρνητικά και Gram-θετικά βακτήρια, κυανοβακτήρια, μύκητες και πρωτόζωα) σε ανέπαφη κυτταρική μορφή, μειώνοντας επίσης σημαντικά το χρόνο παρασκευής του δείγματος. Τα μόρια, τα οποία ανιχνεύει είναι κυρίως επιφανειακές και ριβοσωμικές πρωτεΐνες του βακτηρίου. Σε ό,τι αφορά το ρόλο του χημικού υποστρώματος στη διάκριση μεταξύ Gram-θετικών και Gram-αρνητικών βακτηρίων, υπάρχουν δύο διαφορετικές βασικές θεωρήσεις (Ελληνική Μικροβιολογική Εταιρεία, 2009).

Η πρώτη υιοθετεί τη χρήση διαφορετικού χημικού υποστρώματος για τα Gram-θετικά και Gram-αρνητικά. Οι λαμβανόμενες φασματομορφές διαφέρουν χαρακτηριστικά μεταξύ των Gram-θετικών και των Gram-αρνητικών βακτηρίων. Τα Gram-θετικά βακτήρια δεν ιονίζονται επαρκώς σε σχέση με τα Gram-αρνητικά, με αποτέλεσμα να λαμβάνονται λίγα φάσματα μάζας, χαμηλής έντασης και μικρού εύρους τιμών, λόγω διαφορών στη δομή και τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος μεταξύ των δύο ομάδων. Η δεύτερη θεωρία υιοθετεί τη χρήση του ίδιου χημικού υποστρώματος για Gram-θετικά και αρνητικά βακτήρια, αφού στηρίζει την αξιολόγηση των λαμβανομένων φασμάτων στις υψηλές σαφείς κυματομορφές των εν αφθονία

υπαρχουσών και ιονιζόμενων ριβοσωμικών πρωτεϊνών, που τελικά ευθύνονται σε μεγάλο βαθμό για τα λαμβανόμενα σήματα, και όχι σε φάσματα που προέρχονται από τον ιονισμό των πρωτεϊνών του κυτταρικού τοιχώματος (Ελληνική Μικροβιολογική Εταιρεία, 2009).

#### **4.4 Μέτρηση pH**

Η μέτρηση της τιμής του pH στα δείγματα πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη μεθοδολογία που περιγράφεται από τους Tsiraki and Savvaidis (2014). Η μέτρηση έγινε με ψηφιακό pH-μετρο (Consort C860) με γυάλινο ηλεκτρόδιο μετά από αραιώση (1/10) και ομογενοποίηση του δείγματος της σαλάτας (25 g) με απεσταγμένο νερό (225 ml). Πραγματοποιήθηκαν δύο μετρήσεις και καταγράφηκε ο μέσος όρος των δύο μετρήσεων.

#### **4.5 Στατιστική επεξεργασία**

Τα δεδομένα υποβλήθηκαν σε ανάλυση διακύμανσης στο γενικό γραμμικό μοντέλο με τη χρήση του στατιστικού πακέτου SPSS 10.05 (SPSS Ltd., Woking, UK). Για τον έλεγχο των στατιστικών διαφορών μεταξύ των μέσων τιμών όλων των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε το επίπεδο σημαντικότητας  $P < 0.05$ .

## **Κεφάλαιο 5: Αποτελέσματα- Συζήτηση**

### **5.1 Μέτρηση της τιμής pH**

Τα αποτελέσματα της μέτρησης της τιμής pH για τα δείγματα σαλατών τύπου ουγγαρέζας ήταν  $4,748 \pm 0,32$ . Για τα δείγματα τζατζικιού και τυροσαλάτας οι τιμές pH βρέθηκαν  $4,629 \pm 0,3$  και  $4,8 \pm 0,399$ , αντίστοιχα. Ανάλογες τιμές pH (4,3 έως 4,9) σε δείγματα τζατζικιού αναφέρονται σε άλλη μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τους Tsiraki and Savvaidis (2016).

Αντίθετα χαμηλότερες τιμές pH, σε σχέση με την παρούσα εργασία, αναφέρονται για δείγματα τυροσαλάτας/τυροκαυτερής από τους Manios et al. (2009), οι οποίοι στα δείγματα που εξέτασαν βρήκαν ότι το pH κυμαίνονταν από 4,34 έως 4,5.

### **5.2 Μικροβιολογική εξέταση**

Τα αποτελέσματα της μικροβιολογικής εξέτασης των δειγμάτων από σαλάτες έτοιμες προς κατανάλωση παρουσιάζονται στους πίνακες 1 έως 5.

#### **5.2.1 Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (O.M.X.)**

Η μικροβιολογική αυτή ανάλυση πραγματοποιήθηκε μόνο για τη σαλάτα τύπου ουγγαρέζας, δεδομένου ότι η τυροσαλάτα και το τζατζίκι περιέχουν οξυγαλακτικούς μικροοργανισμούς, λόγω των πρώτων υλών παρασκευής τους (τυρί και γιαούρτι αντίστοιχα).

Η μικροβιολογική εξέταση των δειγμάτων ουγγαρέζας έδειξε ότι οι πληθυσμοί για την O.M.X. ήταν  $6,04 \pm 1,2 \log_{cfu}/g$ . Ανάλογα αποτελέσματα με την παρούσα έρευνα αναφέρονται για την περιοχή της Θεσσαλίας από την Κοντοπούλου (2015) που εξέτασε 13 δείγματα σαλατών τύπου ουγγαρέζας από ταχυφαγεία και υπεραγορές στην περιοχή της Λάρισας βρήκαν πληθυσμούς O.M.X.  $5,831 \pm 0,87 \log_{cfu}/g$ .

Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τους Angelidis et al. (2006) οι οποίοι εξέτασαν 7 δείγματα σαλατών έτοιμων προς κατανάλωση που (τζατζίκι, κηπουρού, ρώσικη κ.α.), βρήκαν ότι οι πληθυσμοί της O.M.X. ήταν  $5,11 \pm 2,2 \log_{cfu}/g$ .

Επίσης, οι Christison et al. (2008) αναφέρουν ότι σε 12 δείγματα σαλατών από μεταποιημένα ζωικά προϊόντα από σημεία λιανικής πώλησης στην περιοχή του Γιοχανεσμπουργκ (Νότια Αφρική) οι πληθυσμοί της O.M.X. ήταν  $7 \pm 1,2 \log_{cfu}/g$ .

Από τα 30 δείγματα σαλατών «ουγγαρέζας» που εξετάστηκαν στην παρούσα μελέτη τα 16 (53,3%) είχαν πληθυσμούς O.M.X.  $< 10^6$  και τα 7 (26,9%)  $> 10^6 \text{ cfu}/g$ . Ομοίως, οι Gurler et al. (2015) σε 261 δείγματα σαλατών έτοιμων προς κατανάλωση από σημεία λιανικής πώλησης στην Τουρκία που εξέτασαν, βρήκαν ότι το 76,2% είχαν πληθυσμούς

O.M.X. < 10<sup>6</sup>.

### 5.2.2 *Enterobacteriaceae*

Τα αποτελέσματα της μικροβιολογικής εξέτασης των δειγμάτων για τις σαλάτες έτοιμων προς κατανάλωση για τους πληθυσμούς των *Enterobacteriaceae* παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.

Από τα 90 δείγματα που εξετάστηκαν συνολικά, τα 48 (53,33%) είχαν πληθυσμούς εντεροβακτηρίων <10<sup>2</sup>cfu/g και τα 42 (46,67%) >10<sup>2</sup>cfu/g. Πρέπει να σημειωθεί ότι από τα 42 δείγματα στα οποία ανιχνεύθηκαν πληθυσμοί εντεροβακτηρίων >10<sup>2</sup>cfu/g τα 25 ήταν δείγματα τυροσαλάτας (59,52%), τα 9 δείγματα σαλάτας τύπου ουγγαρέζας (21,43%) και τα 8 δείγματα τζατζικιού (19,05%).

Ανάλογα ποσοστά σε σχέση με την παρούσα έρευνα αναφέρονται από τους Gurler et al. (2015). Έτσι, σε 261 δείγματα σαλατών έτοιμων προς κατανάλωση από σημεία λιανικής πώλησης στην Τουρκία που εξετάστηκαν, αναφέρεται ότι στο 59,3% βρέθηκαν πληθυσμοί κολοβακτηριοειδών (όριο ανίχνευσης 3 MPN/g). Στην ίδια μελέτη ανιχνεύθηκε *E. coli* σε 10 δείγματα (3,8%) από τα οποία 4 ήταν σαλάτες τύπου «ρώσικης», 2 τύπου «καίσαρα» και 4 τύπου «τονοσαλάτα».

Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε 12 δείγματα σαλατών έτοιμων προς κατανάλωση από σημεία λιανικής πώλησης στην περιοχή του Γιοχάνεσμπουργκ (Νότια Αφρική), αναφέρεται ότι οι πληθυσμοί των κολοβακτηριοειδών ήταν 5,1 ± 0,9 logcfu/g (Christison et al. 2008).

Η Κοντοπούλου (2015) σε ανάλογη μελέτη αναφέρει ότι από τα 52 δείγματα που εξετάστηκαν, τα 47 (90,4%) είχαν πληθυσμούς εντεροβακτηρίων <10<sup>2</sup> και τα 5 (9,6%) >10<sup>2</sup>cfu/g. Πρέπει να σημειωθεί ότι και τα 5 δείγματα στα οποία ανιχνεύθηκαν πληθυσμοί εντεροβακτηρίων (>10<sup>2</sup>cfu/g) ήταν δείγματα τυροσαλάτας. Το μεγαλύτερο ποσοστό δειγμάτων με πληθυσμούς εντεροβακτηρίων >10<sup>2</sup>cfu/g θα μπορούσε να αποδοθεί στη διαφορετική χρονική περίοδο που πραγματοποιήθηκε η συλλογή των δειγμάτων, αφού στην παρούσα μελέτη τα δείγματα συγκεντρώθηκαν τους καλοκαιρινούς μήνες, ενώ στην άλλη εργασία τα δείγματα συλλέχθηκαν χειμερινούς μήνες.



**Πίνακας 2. Πληθυσμοί των *Enterobacteriaceae* σε σαλάτες έτοιμες προς κατανάλωση από ταχυφαγεία στις πόλεις της Λάρισας και της Καρδίτσας.**

Είδος σαλάτας	Αριθμός δειγμάτων	Πληθυσμοί <i>Enterobacteriaceae</i> (cfu/g)	
		<10 <sup>2</sup> (%)	>10 <sup>2</sup> (%)
Ουγγαρέζα	30	22 (73,3%)	8 (26,7%)
Τζατζίκι	30	21(70%)	9 (30%)
Τυροσαλάτα	30	5 (16,7%)	25 (83,3%)
<b>Σύνολο</b>	<b>90</b>	<b>48(53,3%)</b>	<b>42 (46,7%)</b>

### 5.2.3 *S. aureus*

Τα αποτελέσματα της μικροβιολογικής εξέτασης των δειγμάτων για τους πληθυσμούς του *S. aureus* παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.

Έτσι, από τα 90 δείγματα σαλατών που εξετάστηκαν, στα 4 δείγματα (4,44%) απομονώθηκε *S. aureus*. Στο σύνολο των τεσσάρων δειγμάτων που απομονώθηκε *S. aureus* δεν ανιχνεύθηκαν πληθυσμοί του παθογόνου μεγαλύτεροι από 10<sup>5</sup>cfu/g). Πάντως, πρέπει να σημειωθεί ότι και τα 4 δείγματα ήταν δείγματα τύπου τυροσαλάτας/τυροκαυτερής.

Ομοίως, σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε από τους Sergelidis et al. (2012) σε βιομηχανία παραγωγής σαλατών έτοιμων προς κατανάλωση στη Βόρεια Ελλάδα, στο 27% των δειγμάτων απομονώθηκαν σταφυλόκοκκοι. Από τα 20 δείγματα τυροσαλάτας και τα 20 δείγματα τζατζικιού που εξετάστηκαν για την παρουσία του *S. aureus*, το παθογόνο ανιχνεύθηκε σε 9 (45%) και 3 (15%) δείγματα, αντίστοιχα. Επίσης, ο *S. Aureus* βρέθηκε σε 3 από τα 10 δείγματα (30%) μαγιονέζας που χρησιμοποιούνταν από το συγκεκριμένο εργοστάσιο ως πρώτη ύλη για την παρασκευή σαλατών έτοιμων προς κατανάλωση.

Οι Christison et al. (2008) σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε 12 δείγματα σαλατών έτοιμων προς κατανάλωση από σημεία λιανικής πώλησης σε περιοχή της Νότιας Αφρικής, αναφέρουν ότι οι πληθυσμοί του *S. aureus* ήταν 2,1 ± 0,2 logcfu/g.

Αντίθετα, σε κανένα από τα 52 δείγματα σαλατών που εξετάστηκαν δεν ανιχνεύθηκαν πληθυσμοί του *S. aureus* (όριο ανίχνευσης 10<sup>2</sup> cfu/g) (Κοντοπούλου, 2015).

**Πίνακας 3. Πληθυσμοί του *Staphylococcus aureus* σε σαλάτες έτοιμες προς κατανάλωση από ταχυφαγεία στις πόλεις της Λάρισας και της Καρδίτσας.**

Είδος σαλάτας	Αριθμός δειγμάτων	Πληθυσμοί του <i>Staphylococcus aureus</i> (cfu/g)	
		<10 <sup>5</sup> (%)	>10 <sup>5</sup> (%)
<b>Ουγγαρέζα</b>	30	30 (100%)	0 (0%)
<b>Τζατζίκι</b>	30	30 (100%)	0 (0%)
<b>Τυροσαλάτα</b>	30	30 (100%)	0 (0%)
<b>Σύνολο</b>	90	90 (100%)	0 (0%)

#### 5.2.4 *Salmonella* spp.

Τα αποτελέσματα της μικροβιολογικής εξέτασης των δειγμάτων για την παρουσία της *Salmonella* spp. παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.

Σε κανένα από τα 90 δείγματα σαλατών έτοιμων προς κατανάλωση που εξετάστηκαν δεν καταγράφηκε παρουσία της *Salmonella* spp. Ανάλογα αποτελέσματα με την παρούσα έρευνα αναφέρονται για την Ελλάδα από τους Angelidis et al. (2006), οι οποίοι σε 7 δείγματα σαλατών έτοιμων προς κατανάλωση που εξέτασαν (τζατζίκι, κηπουρού, ρώσικη κ.α.) δεν κατέγραψαν την παρουσία του παθογόνου μικροοργανισμού.

Ομοίως, η Κοντοπούλου (2015) αναφέρει ότι σε κανένα από τα 52 δείγματα σαλατών τύπου ουγγαρέζας, τυροσαλάτας και τζατζικιού που εξετάστηκαν δεν καταγράφηκε παρουσία της *Salmonella* spp.

Αντίθετα, σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε τρόφιμα έτοιμα προς κατανάλωση από σημεία λιανικής πώλησης στην περιοχή του Γιοχάνεσμπουργκ (Νότια Αφρική), αναφέρεται ότι *Salmonella* spp. απομονώθηκε σε ποσοστό 11% των σαλατών που εξετάστηκαν (Christison et al. 2008). Συγκεκριμένα, από τα 35 δείγματα σαλατών έτοιμων προς κατανάλωση τα 4 βρέθηκαν θετικά στην παρουσία του παθογόνου.

Οι Gurler et al. (2015) αναφέρουν την παρουσία της *Salmonella* spp. σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε σαλάτες έτοιμες προς κατανάλωση από υπεραγορές και καταστήματα εστίασης στην κεντρική Τουρκία. Έτσι, σε 261 δείγματα σαλατών που εξετάστηκαν, το παθογόνο απομονώθηκε σε 21 δείγματα (8%).

Η *Salmonella* spp. έχει ταυτοποιηθεί ή θεωρείται ως το αίτιο σε 15 τροφιμογενείς επιδημίες με 772 κρούσματα μετά από κατανάλωση σαλατών έτοιμων προς κατανάλωση στις Η.Π.Α. το χρονικό διάστημα 2000 έως 2007 (Erickson 2010). Συνεπώς, η μη απομόνωση της σε δείγματα σαλατών από ταχυφαγεία στις πόλεις Λάρισα και Καρδίτσα της Περιφέρειας Θεσσαλίας στην παρούσα μελέτη, εκτός της συμφωνίας με τη νομοθετική απαίτηση για τα συγκεκριμένα προϊόντα, έχει ιδιαίτερη σημασία και για τη Δημόσια Υγεία.

**Πίνακας 4. Παρουσία της *Salmonellaspp.* σε σαλάτες έτοιμες προς κατανάλωση από ταχυφαγεία στις πόλεις της Λάρισας και της Καρδίτσας.**

Είδος σαλάτας	Αριθμός δειγμάτων	Θετικά στην παρουσία <i>Salmonellaspp.</i> (%)
Ουγγαρέζα	30	0 (0%)
Τζατζίκι	30	0 (0%)
Τυροσαλάτα	30	0 (0%)
Σύνολο	90	0 (0%)

### 5.2.5 *Listeria monocytogenes*

Τα αποτελέσματα της μικροβιολογικής εξέτασης των δειγμάτων για την παρουσία της *L. monocytogenes* παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.

Στην παρούσα εργασία εξετάστηκαν 90 δείγματα σαλατών έτοιμων προς κατανάλωση από ταχυφαγεία στις πόλεις της Λάρισας και της Καρδίτσας και 1 (1,11%) βρέθηκε θετικό στην παρουσία της *L. monocytogenes*. Το ένα δείγμα σαλάτας που απομονώθηκε το παθογόνο ήταν δείγμα «τυροσαλάτας». Στο δείγμα αυτό, που βρέθηκε θετικό στην παρουσία του παθογόνου, οι πληθυσμοί της *L. monocytogenes* ήταν χαμηλότεροι από το κριτήριο ασφαλείας (100 cfu/g) που ορίζεται από τη νομοθεσία για τα έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα.

Σε ανάλογη εργασία εξετάστηκαν 52 δείγματα σαλατών έτοιμων προς κατανάλωση από καταστήματα λιανικής πώλησης στη Λάρισα και 2 (3,85%) βρέθηκαν θετικά στην παρουσία της *L. monocytogenes*. Το ένα δείγμα σαλάτας που απομονώθηκε το παθογόνο ήταν τύπου «ουγγαρέζας» και το άλλο δείγμα ήταν τύπου «τυροσαλάτας», ενώ και τα δύο δείγματα προέρχονταν από ταχυφαγεία. Στα δύο αυτά δείγματα, οι πληθυσμοί της *L. monocytogenes* ήταν χαμηλότεροι από 100 cfu/g, ενώ σε 2 δείγματα (1 τύπου «ουγγαρέζα» από υπεραγορά και 1 τύπου «τυροσαλάτας» από ταχυφαγείο) ανιχνεύθηκε η παρουσία *Listeria innocua*.

Σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα από σημεία λιανικής πώλησης στην περιοχή του Γιοχάνεσμπουργκ (Νότια Αφρική), αναφέρει ότι η *L. monocytogenes* απομονώθηκε σε ποσοστό 3% των σαλατών που εξετάστηκαν (Christison et al. 2008). Συγκεκριμένα, από τα 35 δείγματα έτοιμων προς κατανάλωση σαλατών το 1 βρέθηκε θετικό στην παρουσία του παθογόνου. Οι Little et al. (2007) βρήκαν ότι 54 από 1418 (3,8%) δείγματα έτοιμων προς κατανάλωση σαλατών με βάση τη μαγιονέζα από υπεραγορές και καταστήματα εστίασης στη Μεγάλη Βρετανία ήταν θετικά στην παρουσία *L. monocytogenes*. Ομοίως, χαμηλά ποσοστά αναφέρονται από τους Gombaset al. (2003) οι οποίοι ανίχνευσαν τη *L. Monocytogenes* στο 2,36% από 8549 δείγματα σαλατών έτοιμων προς κατανάλωση από 2 περιοχές των Η.Π.Α.

Υψηλότερα ποσοστά παρουσίας του παθογόνου αναφέρονται από τους Gurler et al. (2015) σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε σαλάτες έτοιμες προς κατανάλωση από υπεραγορές και καταστήματα εστίασης στην κεντρική Τουρκία. Έτσι, από τα 261

δείγματα σαλατών που εξετάστηκαν, το παθογόνο απομονώθηκε σε 15 δείγματα (5,7%).

Επίσης, οι Uyttendaele et al. (2009) αναφέρουν την απομόνωση της *L. monocytogenes* σε 80 από 1187 (6,7%) δείγματα έτοιμων προς κατανάλωση σαλατών με βάση τη μαγιονέζα από περιοχές του Βελγίου το χρονικό διάστημα 2005 έως 2007. Σε κανένα από τα 80 δείγματα που βρέθηκαν θετικά στην παρουσία του παθογόνου, οι πληθυσμοί της *L. monocytogenes* δεν υπερέβαιναν το όριο 100 cfu/g που τίθεται ως κριτήριο ασφαλείας από τη νομοθεσία. Οι ίδιοι ερευνητές αναφέρουν πάντως βελτίωση της μικροβιολογικής κατάστασης των έτοιμων προς κατανάλωση σαλατών με βάση τη μαγιονέζα από υπεραγορές στο Βέλγιο, αφού σε προγενέστερη μελέτη τους (Uyttendaele et al. 1999) η *L. monocytogenes* είχε απομονωθεί στο 21,3% από το σύνολο των 874 δειγμάτων που εξετάστηκαν.

Ανάλογα αποτελέσματα με την παρούσα εργασία αναφέρονται σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε από τους Angelidis et al., (2006) σε δείγματα έτοιμων για κατανάλωση συσκευασμένων σαλατών (τζατζίκι, μελιτζανοσαλάτα, κηπουρού και ρώσικη) σε περιοχές του Έβρου, της Ροδόπης και της Ξάνθης και η οποία έδειξε ότι σε κανένα από τα δείγματα δεν ανιχνεύτηκε παρουσία της *L. monocytogenes*.

#### **Πίνακας 5. Παρουσία της *Listeriamonocytogenes* σε σαλάτες έτοιμες προς κατανάλωση από ταχυφαγεία στις πόλεις της Λάρισας και της Καρδίτσας.**

Είδος σαλάτας	Αριθμός δειγμάτων	Θετικά στην παρουσία της <i>L.monocytogenes</i>	Πληθυσμοί της <i>L. monocytogenes</i> >10 <sup>2</sup> cfu/g
Ουγγαρέζα	30	0 (0%)	-
Τζατζίκι	30	0 (0%)	-
Τυροσαλάτα	30	1 (3,33%)	0 (0%)
<b>Σύνολο</b>	<b>90</b>	<b>1 (1,11%)</b>	<b>0 (0%)</b>

## Συμπεράσματα - Προτάσεις

Στην παρούσα εργασία εξετάστηκαν 90 δείγματα σαλατώνέτοιμων προς κατανάλωση από ταχυφαγεία στις πόλεις της Λάρισας και Καρδίτσας της Περιφέρειας Θεσσαλίας.

Η μικροβιολογική εξέταση των δειγμάτων για τις σαλάτες τύπου ουγγαρέζας έδειξε ότι οι πληθυσμοί για την Ο.Μ.Χ. ήταν  $6,04 \pm 1,2 \log_{10} \text{cfu/g}$ . Από τα 30 δείγματα ουγγαρέζας που εξετάστηκαν στην παρούσα μελέτη τα 17 (56,7%) είχαν πληθυσμούς Ο.Μ.Χ.  $< 10^6$  και τα 13 (43,3%)  $> 10^6 \text{cfu/g}$ .

Από τα 90 δείγματα που εξετάστηκαν συνολικά, τα 48 (53,33%) είχαν πληθυσμούς εντεροβακτηρίων  $< 10^2 \text{cfu/g}$  και τα 42 (46,67%)  $> 10^2 \text{cfu/g}$ . Από τα 42 δείγματα στα οποία πληθυσμοί εντεροβακτηρίων ήταν  $> 10^2 \text{cfu/g}$  τα 25 ήταν δείγματα τυροσαλάτας (59,52%), τα 9 δείγματα σαλάτας ουγγαρέζας (21,43%) και τα 8 δείγματα τζατζικιού (19,05%).

Σε κανένα από τα 90 δείγματα σαλατών που εξετάστηκαν δεν καταγράφηκε παρουσία της *Salmonella* spp.

Αντίθετα σε 4 δείγματα από το σύνολο των 90 δειγμάτων (4,44%) απομονώθηκε *S. aureus*. Σε κανένα δείγμα δεν ανιχνεύθηκαν πληθυσμοί του παθογόνου μεγαλύτεροι από  $10^5 \text{cfu/g}$ . Πάντως, πρέπει να σημειωθεί ότι και τα 4 δείγματα ήταν δείγματα τύπου τυροσαλάτας.

Τέλος, ένα δείγμα από το σύνολο των 90 δειγμάτων (1,11%) που εξετάστηκαν βρέθηκε θετικό στην παρουσία της *L. monocytogenes* και ήταν δείγμα τυροσαλάτας. Στο δείγμα αυτό, που βρέθηκε θετικό στην παρουσία του παθογόνου, οι πληθυσμοί της *L. monocytogenes* ήταν χαμηλότεροι από το κριτήριο ασφαλείας ( $100 \text{cfu/g}$ ) που ορίζεται από τη νομοθεσία για τα έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα.

Συμπερασματικά, το σύνολο των 90 δειγμάτων σαλατών έτοιμων προς κατανάλωση που εξετάστηκαν, βρέθηκαν σύμφωνα με τις απαιτήσεις της κείμενης νομοθεσίας για τα συγκεκριμένα προϊόντα. Η ανίχνευση της *L. monocytogenes* υπογραμμίζει την ανάγκη για την τήρηση των κανόνων της Ορθής Υγιεινής Πρακτικής και των προγραμμάτων ελέγχου στην παραγωγή, διακίνηση και διάθεση αυτών των τροφίμων.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

### ΕΛΛΗΝΙΚΗ

Αμβροσιάδης, Ι. (2004), Εφαρμογή και έλεγχος του συστήματος HACCP, Σύγχρονη Παιδεία Θεσσαλονίκης

Γκόβαρης, Αλέξανδρος. (2007). “Υγιεινή τροφίμων ζωικής προέλευσης”. Τμήμα Κτηνιατρικής. Πανεπιστημιακές εκδόσεις Θεσσαλίας. σελ., 13-21.

Γκόβαρης, Α., Πεξαρά, Α., Σολωμάκος, Ν. (2009). “Υγιεινή Τροφίμων ΙΙ”. Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας. Τμήμα Κτηνιατρικής.

Ελληνική Μικροβιολογική Εταιρεία, 4<sup>ο</sup> Εθνικό Συνέδριο Κλινικής Μικροβιολογίας & Νοσοκομειακών Λοιμώξεων, Αθήνα, Πολεμικό Μουσείο 12-14 Φεβρουαρίου 2009

Ιωάννης Κ. Παπαπαναγιώτου και Βασιλική Κυριαζοπούλου-Δαλαινά, 2004. Ιατρική Μικροβιολογία και Ιολογία. Έκδοση 2<sup>η</sup>, UniversityStudioPress, Θεσσαλονίκη.

Κανονισμός (ΕΕ) αριθ. 365/2010 της Επιτροπής της 28<sup>ης</sup> Απριλίου 2010 για την τροποποίηση του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 2073/2005 περί μικροβιολογικών για τα τρόφιμα όσον αφορά τα εντεροβακτηρίδια στο παστεριωμένο γάλα και σε άλλα παστεριωμένα υγρά γαλακτοκομικά προϊόντα και το *Listeria monocytogenes* στο αλάτι για τρόφιμα. Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης (29.4.2010), EEL 107

Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1441/2007 της επιτροπής της 5<sup>ης</sup> Δεκεμβρίου 2007 για την τροποποίηση του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 2073/2005 της επιτροπής περί μικροβιολογιών κριτηρίων για τα τρόφιμα. Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης. (7.12.200), L 322/129

Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 2073/2005 της επιτροπής της 15<sup>ης</sup> Νοεμβρίου 2005 περί μικροβιολογικών κριτηρίων για τα τρόφιμα. Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης. (22.12.2005), L338/1-26.

Καλογρίδου – Βασιλειάδου, Δ. (1995). Παραδόσεις και Ασκήσεις στη Γενική Μικροβιολογία. Υπηρεσία Δημοσιευμάτων ΑΠΘ Θεσσαλονίκη, σελ 52-82

Κέντρο Ελέγχου & Πρόληψης Νοσημάτων. Νοσήματα – Θέματα Υγείας. Λοιμώδη Νοσήματα. Τροφιμογενή Νοσήματα. Λιστερίωση

Κέντρο Ελέγχου & Πρόληψης Νοσημάτων. Νοσήματα – Θέματα Υγείας. Λοιμώδη

Νοσήματα. Τροφιμογενή Νοσήματα. Σαλμονέλλωση – Τυφοειδής Πυρετός

Κέντρο Ελέγχου & Πρόληψης Νοσημάτων. Νοσήματα – Θέματα Υγείας. Λοιμώδη Νοσήματα. Τροφιμογενή Νοσήματα. Στατιστικά δεδομένα. Επιδημιολογικά δεδομένα για τη συρροή κρουσμάτων τροφιμογενούς/υδατογενούς νοσημάτων στην Ελλάδα, 2004 – 2013

ΚοντοπούλουΜ, ΣολωμάκοςΝ, ΠεξαράΑ, ΓκόβαρηςΑ. (2015). Μικροβιολογική κατάσταση των έτοιμων προς κατανάλωση σαλατών στη Λάρισα. 13<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Κτηνιατρικό Συνέδριο, Αθήνα 2015.

ΚΤΠ., 2014. Κώδικας Τροφίμων και Ποτών. Αθήνα 2014

Κυριακόπουλος Π. (1995) Η τυροκομία στην πράξη. Αθήνα. Τρίαينا Εκδοτική. Σελ 109-113

Λιτοπούλου-Τζανετάκη Ε. (1993). Μικροβιολογία Γάλακτος Θεσ/νικη.,σελ. 280-286.

Μάντης, Ι. Α. (1991). “Υγιεινή και Τεχνολογία του γάλακτος και των προϊόντων του”. (β΄ έκδοση). Αδελφών Κυριακίδη Θεσσαλονίκη.

Μάντης, Ι. Α. (2005). “Υγιεινή και Τεχνολογία του γάλακτος και των προϊόντων του”. (γ΄ έκδοση). Αδελφών Κυριακίδη α.ε. Θεσσαλονίκη

Μπαλατσούρας, Γ., (2006) Μικροβιολογία Τροφίμων, Εκδόσεις Έμβρυο, Αθήνα

Σαββαΐδης Ι., (2014). Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων. <Γενική Μικροβιολογία. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ>. Έκδοση 1.0. Ανοικτά Πανεπιστημιακά Μαθήματα

Σκεπαστιανός Π. Καραμητρούσης Ε. 2012. Εισαγωγή στα θρεπτικά υποστρώματα και στην καλλιέργεια των μικροοργανισμών. UniversityStudioPress, Θεσσαλονίκη 2012

Συμινελάκης Σ.Ν. και Παπαδάκης Ι.Α. Μελέτη της αξιοποίησης της αντίδρασης Widalστη διάγνωση των τυφο-παρατυφικών λοιμώξεων. Αρχεία Ελλην Ιατρ 1986, 3: 81-84

Τσιράκη Μαρία, 2012. Μελέτη της επίδρασης συσκευασίας και φυσικών αντιμικροβιακών παραγόντων στην ποιότητα και υγιεινή παραδοσιακών ελληνικών προϊόντων-τροφίμων. Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Akineden, O., Annemuller, C., Hassan, A.A., Lammler, C., Wolter, W., Zschock, M. 2001. Toxin genes and other characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from milk of cows with mastitis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 8, 959-964

Angelidis A.S., Chronis E.N., Papageorgiou D.K., Kazakis I.I., Arsenoglou K.C., Stathopoulos G.A. (2006). Non-lactic acid, contaminating microbial flora in ready-to-eat foods: A potential food-quality index. *Food Microbiology*, 23(1), 95-100

Asperger, H., & Zangerl, P. (2003). "Staphylococcus aureus". In: Roginski, H., Fuquay, J.W., Fox, P.F. (Eds), *Encyclopedia of Dairy Sciences*, vol. 4. Academic Press and Elsevier Science, Amsterdam, Boston, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Singapore, Sydney, Tokyo, pp. 2563–2569.

Augustin, J.C. 1996. Resistance of *Listeria monocytogenes* to physical processing, *Pathologie Biologie*, 44 (9), 790-807.

Balaban, N., & Rasooly, A. (2000). A Review. "Staphylococcal enterotoxins". *International Journal of Food Microbiology*, 61, 1–10.

Barer, M., and C. R. Harwood. 1999. Bacterial viability and culturability. *Adv. Microbiol. Physiol.* 41: 93-137

Bautista, L., Bermejo M.P & Nunez, M. 1986. *Journal of Dairy Research*. 53:1-5

Baylis, C., Uyttendaele, M., Joosten, H., Davies, A. 2011. The Enterobacteriaceae and their significance to the food industry. ILSI (International Life Sciences Institute) Europe Report Series 2011, 1-48

Bergdoll, M.S., 1967. The staphylococcal enterotoxins. In: R.I. Mateles and G.N. Wogan (eds) *Biochemistry of Some Foodborne Microbial Toxins*, MA: MIT Press, Cambridge, pp. 1-25

Berdgoll, M. S. (1989). "Staphylococcus aureus". In: Doyle, M.P. (Ed.), *Food-Borne Bacterial Pathogens*. Marcel Dekker, New York, pp. 464–523.

Board, R.G., Sparks, N. H.C. & Tranter, H.S. (1986) Antimicrobial defense of avian eggs. In: *Natural Antimicrobial Systems*. Gould, G.W. et al. (Eds). University of Bath, Bath, pp.82-96

Boerema, Berdggoll, M. S. (1989). "Staphylococcus aureus". In: Doyle, M.P. (Ed.), *Food-Borne Bacterial Pathogens*. Marcel Dekker, New York, pp. 464–523.



Bojsen-Moller, J. (1972). "Human listeriosis: diagnostic, epidemiologic and clinical studies". *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect., B Suppl.* 229, 72-92.

Boerema, J. A., Clemens, R., & Brightwell, G. (2006). "Evaluation of molecular methods to determine enterotoxigenic status and molecular genotype of bovine, ovine, human and food isolates of *Staphylococcus aureus*". *Int. J. Food Microbiol.*, 192–201

Brenner, F. W., R.G Villar, F.J Angulo, R. Tauxe, and B. Swaminathan. 2000. *Salmonella* nomenclature, *J. Clin Microbiol.* 38:2465-2467

Burton, M.C. 1949. Comparison of coliform and enterococcus organisms as indices of pollution in frozen foods. *Food Res.* 14, 434-448.

Christison C.A., Lindsay D., von Holy A. (2008). Microbiological survey of ready-to-eat foods and associated preparation surfaces in retail delicatessens, Johannesburg, South Africa. *Food Control* 19, 727–733.

Clay C.E. and Board R.G. 1991. Growth of *Salmonella enteritidis* in artificially contaminated hen's shell eggs. *Epidemiol Infect.*, 106, 271-281

Corlett D.A., Brown M.H. 1980. pH and acidity. In *Microbial Ecology of Foods.*, New York: Academic Press, pp. 92-111.

Dalton, C.B., Austin, C.C., Sobel, J., Hayes, P.S., Bibb, W.F., Graves, L.M., Swaminathan, B., Procter, M.E. and Friffin. P.M. 1997. An outbreak of gastroenteritis and fever due to *Listeria monocytogenes* in milk. *N. Engl. J. Med.*, 336, 100-105.

D'Aoust, J. Y. (1991). "Pathogenicity of foodborne *Salmonella*". *Int. J. Food Microbiol.*, 12, 17–40

D'Aoust, J.-Y. 2000. *Salmonella*, p. 1233-1299. In B.M. Lund, A.C. Baird-Parker, and G.W. Gould (ed.), *The Microbiological Safety and Quality of Food*. Aspen Publishers Inc., Gaithersburg, Md

D' Aoust, J.-Y. 1994. *Salmonella* and the international food trade. *Int. J. Food. Microbiol.* 24:11-31

De Buyser, M. L., Dufour, B., Maire, M., & Lafarge, V. (2001). "Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialised countries". *Int. J. Food Microbiol.*, 67, 1–17.

Devriese, L. A. (1984). "A simplified system for biotyping *Staphylococcus aureus* strains isolated from different animal species". *J. Appl. Bacteriol.*, 56, 215–220.

Dingens, M. M., P. M. Orwin, and P. M. Schievery. 2000. Exotoxins of *Staphylococcus*

aureus. Clin. Microbiol. Rev 13:16-34.

Doyle, M.P., Beuchat, L.R and Montville, T.D (Eds)., (1997), 'Food Microbiology: fundamentals and frontiers', ASM Press, Washington, D.C., USA.

Farber, J. M., & Peterkin, P. I. (1999). "Incidence and behavior of *Listeria monocytogenes* in meat products", In. E.T. Ryser and E.H. Marth (ed). *Listeria, Listeriosis and Food Safety*, 2<sup>nd</sup> ed. Ed. Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., pp. 505-564.

Francis G.A. Thomas C., O' Beirnu D. 1999. The microbiological safety of minimally processed vegetables. *International journal of food Science and Technology*, 34:1-22

Freitas, R., Nero, L. A., & Carvalho, A. F. (2009). *Technical note: Enumeration of mesophilic aerobes in milk: Evaluation of standard official protocols and Petrifilm aerobic count plates* J. Dairy Sci. 92 :3069–3073 doi: 10.3168/jds.2008-1705 © American Dairy Science Association.

Foulquie Moreno, M., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E., De Vuyst, L. 2006. The role and application of enterococci in food and health. *Int. J. Food Microbiol.*, 106, 1-24

Fricker C.R. A review: The isolation of salmonellaa and campylobacters. *Appl Bacteriol* 1987, 63: 99-116

Gaya, P., Medina, M. & Nunez, M. 1987. *Journal of Applied Bacteriology* 62: 321-327

Genigeorgis, C., Foda, M. S. Mantis, A., & Sadler, W. W. (1971). "Effect of sodium chloride and pH on enterotoxin C production". *Appl. Microbiol.*, 21, 862–866.

Genigeorgis, C.A. 1989. Present state of knowledge of staphylococci intoxication. *Int. J. Food Microbiol.*, 9, 327-360

Glynn, J. R., and D. J. Bradley. 1992. The relationship of infecting dose and severity of disease in reported outbreaks of *Salmonella* infections. *Epidemiol. Infect.* 109:371-388.

Gorris, L.G.M., (2005), "Food safety objective: An integral part of food chain management", *Food Conrol* 16:801-809.

Gurler Z., Pamuk S., Yildirimb Y., Ertas N. (2015). The microbiological quality of ready-to-eat salads in Turkey: A focus on *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* 196, 79–83.

Hirooka, E.Y., DeSalzberg, S.P.C and Bergdoll. M.S. 1987. Production of staphylococcal enterotoxin A and thermonuclease in cream pies. *J. Food Protect.*, 50, 952-955

Huss, H. H., Jorgensen, L. V., & Vogel, B. F. (2000). "Control options for *Listeria monocytogenes* in seafoods". *International Journal of Food Microbiology* 62, 267–274.

International Commission on Microbiological Specification for Foods (ICMSF). 1996. *Microorganisms in foods*. Roberts T.A., Baird-Parker A.C., Tompkin R.B., (Eds). Volume 5, Characteristics of microbial pathogens. London: Blackie Academic & Professional. P 513

Jablonski, L.M., Bohach, G. 1997. *Staphylococcus aureus*. In: Doyle, M.P., Beuchat, L.R., Monteville, T.J. (Eds), *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers*. ASM Press, Washington DC, pp. 353-357

Jay, J.M. 2000. *Modern food microbiology*, 6<sup>th</sup> ed. Gaithersburg (MD): Aspen. p. 679

Joeng, D., & Frank, J. (1994). "Growth of *Listeria monocytogenes* at 10°C in biofilms with microorganisms isolated from meat and dairy processing environments". *J. Food Prot.*, 57, 576-586.

Jorgensen, H. J., Mork, T., Hogasen, H. R., & Rovik, L. M. (2005). "Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in bulk milk in Norway". *J. Appl. Microbiol.*, 99, 158–167.

Kang, C.K., Woodbum, M., Panenkopf, A., Cheney, R. 1969. Growth, sporulation, and germination of *Clostridium perfringens* in media of controlled water activity. *Appl. Microbio.*, 18, 798-805

Knabel, S.J., Walker, H.W., Hartman, P.A. and Mendoca, A.F. 1990. Effect of growth temperature and strictly anaerobic recovery on the survival of *Listeria monocytogenes* during pasteuration. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 370-376

Legnani, P., Leoni, E., Berveglieri, M., Mirolo, G., Alvaro, N., (2005), "Hygienic control of mass catering establishments, microbiological monitoring of foods and equipment" 16:205-211

Linton A.H. Guidelines on prevention and control of Salmonellosis. WHO Document VPH/83.42 Geneva, 1983

Litopoulou-Tzanetaki E (1990) Changes in numbers and kinds of lactic acid bacteria during ripening of Kefalotyri cheese. *Journal of Food Science* 55 111–113

Mackey, B. M., Prichett, C., Norris, A. & Mead, G. C. (1990). "Heat resistance of *Listeria*: Strain differences and effects of meat type and curing salts". *Lett. Appl. Microbiol.*, 10, 251-255.

Manios, S. G., Skiadaresis, A. G., Karavasilis, K., Drosinos, E. H., & Skandamis, P. N. (2009). "Field validation of predictive models for the growth of lactic acid bacteria in acidic cheese-based greek appetizers". *Journal of Food Protection*, 72(1), 101-110.

Martin, S.E., Iandolo, J.J. 2000. Staphylococcus. In: Robinson, R.K, Batt, C.A., Patel, P.D. (Eds), Encyclopedia of Food Microbiology. Academic Press, pp. 2062-2065

McLauchlin, J., Mitchell, R. T., Smerdon, W. J., & Jewell, K. (2004). "Listeria monocytogenes and listeriosis: a review of hazard characterization for use in microbiological risk assessment of foods". International Journal of Food Microbiology 92, 15–33.

Montville , T.J., and K.R Matthews. 2001. Principles which influence microbial growth, survival, and death in foods, p. 13-32. In M.P Doyle, L.R. Beuchat, and T.J Montville (ed.), Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers, 2th edition. ASM Press, Washington, D.C.

Morandi, S., Brasca, M., Lodi, R., Cremonesi, P., &Castiglioni B. (2007). "Detection of classical enterotoxins and identification of enterotoxin genes in Staphylococcus aureus from milk and dairy products". Veterinary Microbiology, 124, 66–72.

Morris, J.G. 2000. The effect of redox potential. In: Lund BL, Baird-Parker TC, Gould GW, editors. The microbiological safety and quality of food. Volume 1. Gaithersburg (MD): Aspen. p 235-50.

Mossel, D. A. A. (1975). "Occurrence, prevention and monitoring of microbial quality loss of foods and dairy products". CRC Crit Rev Environ Control 5:1–140.

Mossel, D.A.A., Corry, J.E.L., Struijk, C.B. and Baird, R.M 1995. Essentials of the microbiology of foods: a textbook for advanced studies, Chichester (England): John Wiley and Sons. P. 699.

National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods. 1991. Listeria monocytogenes. Int. J. Food. Microbiol. 14:185-246

Noletto, A.L., and Bergdoll. M.S. 1980. Staphylococcal enterotoxin production in the presence of nonenterotoxigenic staphylococci. Appl. Environ. Microbiol., 39, 1167-1171.

Noordhuijen, JPTM., and Metz, JHM., (2005), "Quality control on dairy farms on public health, food safety, animal health welfare", Livestock Production Science, 94:51-59

Northholt, M.D., Beckers, H.J., Vecht, U., Toepoel L., Soentoro P.S.S and Wisselink, H.J. 1989. Listeria monocytogenes. Heat resistance and behavior during storage of milk and whey and making of Dutch type of Cheesew. Neth. Milk Dairy J., 42, 207-219

Normanno, G., Firinu, A., Virgilio, S., Mula, G., Dambrosio, A., Poggiu, A., Decastelli, L., Mioni, R., Scuota, S., Bolzoni, G., Di Giannatale, E., Salinetti, A. P., La Salandra, G.,

Bartoli, M., Zuccon, F., Pirino, T., Sias, S., Parisi, A., Quaglia, N. C., & Celano, G. V. (2005). "Coagulase-positive staphylococci and *Staphylococcus aureus* in food products marketed in Italy". *Int. J. Food Microbiol.*, 98, 73–79.

Nunez, J.A. Chavakki, F.J. & Nunez M, M. 1984. *Journal of Applied Bacteriology*. 57:23-29

Nyati H. 2000. Survival characteristics and the applicability of predictive mathematical modelling to *Listeria monocytogenes* growth in sous vide products. *International J. Food Microbiol.*, 56,123-132.

Omoe, K., Hu, D.L., Takahashi-Omoe, H., Natane, A., & Shinagawa, K. (2003). "Identification and characterization of a new staphylococcal enterotoxin-related putative toxin encoded by two kinds of plasmids". *Infect. Immun.* 71, 6088–6094.

Pexara, A., Burriel, A., & Govaris, A. (2010). "*Staphylococcus aureus* and *Staphylococcal enterotoxins*". Riboldi, G.P., Frazzon, J., D'Azevedo, P.A. and Frazzon, A.P.G. 2009. Antimicrobial Resistance Profile of *Enterococcus* spp Isolated from Food in Southern Brazil, *Braz. J. Microbiol.*, 40, 125-128

Pirt, S.J. 1975. Principles of microbe and cell cultivation. Blackwell Scientific Publications. London, UK.

Pexara, A., Burriel, A., & Govaris, A. (2010). "*Staphylococcus aureus* and *Staphylococcal enterotoxins* in foodborne diseases". *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 61(-):316-322

Proft, T., Fraser, J.D., 2003. Bacterial superantigens. *Clin. Exp. Immunol.* 133. 299-306.

Pierson, M.D., and D.A. Corlett, Jr. (ed.). 1992. HACCP: Principles and Applications. Van Norstrand, New York, N.Y

Randell, A.W., and A.J. Whitehead. 1997. Codex Alimentarius: food quality and safety standards for international trade. *Rev. Sci. Tech.* 16:313-321.

Riboldi, G.P., Frazzon, J., D'Azevedo, P.A. and Frazzon, A.P.G. 2009. Antimicrobial Resistance Profile of *Enterococcus* spp Isolated from Food in Southern Brazil, *Braz. J. Microbiol.*, 40, 125-128

Rocourt, J., & Buchrieser, C. (2007). "The genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: phylogenic position". In E. T. Ryser, & E. H. Marth (Eds.), *Listeria, listeriosis and food safety* (pp. 1-20). CRC Press.

Ryser, E. T. (2002). *Listeria monocytogenes*. *Listeria monocytogenes*, 1650-1655

Sara M. Pires, Leonardo de Knecht and Tine Hald, 2011. Estimation of the relative contribution of different food and animal sources to human *Salmonella* infections in the European Union. National Food Institute Technical University of Denmark. Scientific / Technical Report submitted to EFSA

Schantz, E.J., Roessler, W.G., Wagman, J., Spero, L., Dunny, D.A., and Bergdoll, M.S. 1965. Purification of staphylococcal enterotoxin B. *J. Biochem.*, 4, 1011-1016

Schlech, W. F., Lavigne, P. M., Bortolussi, R. A., Allen, A. C., Haldane, E. V., Wort, A. J., et al. (1983). "Epidemic listeriosis evidence for transmission by foods". *New England Journal of Medicine*, 308, 203-206.

Sergelidis D., Abraham A., Anagnostou V., Papa A., Papadopoulos Th. (2010). Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Enterococcus* spp. in ready-to-eat salads (dips), the environment and the personnel of a salad processing plant in Northern Greece. *Journal of Hellenic Veterinary Medical Society*, 61(4), 308-315(8).

Slutsker, L., and Schuchat, A. 1999. Survival of *Listeria* in humans. In: E.T. Riser and E.H. Marth (ed.), *Listeria, Listeriosis and Food Safety*, 2<sup>nd</sup> ed. Ed. Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., pp.75-95

Smittle, R.B. (2000). Microbiological safety of mayonnaise salad dressings and sauces produced in the United States: a review. *Journal of Food Protection*, 63:1144-1153

Smyth, C.I., Smyth, D.A., Kennedy, J., Twohig, J., Molton, D. 2004. *Staphylococcus aureus*: from man or animals – an enterotoxin iceberg? Proceedings of International EU-RAIN Conference, Food Pathogens Epidemiology: microbes, maladies and methods. Dec. 2nd-3rd Padua, Italy, pp. 85-102

Sperber, W. H. (2009). "Microbiological Spoilage of Acidified Specialty Products" p.285-289 In: Sperber W.H., M.P. Doyle (eds.), *Compendium of the Microbiological Spoilage of Foods and Beverages, Food Microbiology and Food Safety*, DOI 10.1007/978-1-4419-0826-1\_10, C \_ Springer Science+Business Media, LLC

Sutherland, P.S., 1989. *Listeria monocytogenes*. Food borne Microorganisms of Public Health Significance, 4<sup>th</sup> Edition, AIFST NSW Food Microbiology Group, Sydney

Swaminathan, B. (2001). *Listeria monocytogenes*. In: *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, 2<sup>nd</sup> Ed. M.P. Doyle, L.R. Beuchat, T.J. Montville (eds), ASM Press, Washington, D.C. p. 383.

Tassou C.C., Samaras F.J., Arkoudelos J.S., Mallidis C.G. (2009). Survival of acid-adapted or non-adapted *Salmonella* Enteritidis, *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7, in traditional Greek salads. *International Journal of Food Science and*

Technology, 44, 279-287.

Tompkin, R.B. 2002. Control of *Listeria monocytogenes* in the food-processing environment. *J. Food. Prot.* 65:709-725

Uyttendaele M., Busschaert P., Valero A., Geeraerd A.H., Vermeulen A., Jacxsens L., Goh K.K., De Loy A., Van Impe J.F., Devlieghere F. (2009). Prevalence and challenge tests of *Listeria monocytogenes* in Belgian produced and retailed mayonnaise-based deli-salads, cooked meat products and smoked fish between 2005 and 2007. *International Journal of Food Microbiology* 133, 94–104.

Vautor, E.G. Abadie, J.M Guibert, C. Huard, and Pepin. 2003. Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from various sites on farms with dairy sheep using pulsed-field gel electrophoresis. *Vet. Microbiol.* 96: 69-79.

Walker, E.T., Archer, P. and Banks, J.G. 1990. Growth of *Listeria monocytogenes* at refrigeration temperatures. *J. Appl. Bacteriol.*, 68, 157-162

Williams, A.G., Banks, J.M. (1997) Proteolytic and other hydrolytic enzyme activities in non-starter lactic acid bacteria isolated from Cheddar cheese manufactured in the United Kingdom. *International Dairy Journal* 7: 763-774.d

Verma R. Immunity to Salmonella. *Rev Med Microbiol* 1999, 10:79-87

Yasmine M., Gerald M., Ewen T., 2014. *Encyclopedia of Food Safety*. 1<sup>st</sup> Edition. Academic Press is an imprint of Elsevier. USA

Zerfiridis, G. (2001). "Technology of milk products - Cheese production". Greece:Thessaloniki.

Zhang, S., Iandolo, J., & Stewart, C. (1998). "The enterotoxin D plasmid of *Staphylococcus aureus* encodes a second enterotoxin determinant" (sej). *FEMS Microbiol. Lett.* 168, 227–233.