

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΥΓΙΕΙΝΗ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ΜΕ ΘΕΜΑ :

Μελέτη μικροβιολογικών κριτηρίων υγιεινής (*Enterobacteriaceae*) και κριτηρίων ασφαλείας (*L. monocytogenes*) σε τυποποιημένα παγωτά και παγωτά ζαχαροπλαστέιου.

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΣ ΦΟΙΤΗΤΗΣ:
ΠΑΥΛΟΣ ΔΗΜΗΤΡΗΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:
ΠΟΥΡΝΑΡΑΣ ΣΠΥΡΙΔΩΝ

ΛΑΡΙΣΑ, 2013

ΤΑ ΜΕΛΗ ΤΗΣ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

1. ΠΟΥΡΝΑΡΑΣ ΣΠΥΡΙΔΩΝ (Επιβλέπων)
2. ΚΡΙΚΕΛΗΣ ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ (Μέλος)
3. ΠΛΑΚΟΚΕΦΑΛΟΣ ΗΛΙΑΣ (Μέλος)

Μελέτη μικροβιολογικών κριτηρίων υγιεινής (*Enterobacteriaceae*) και κριτηρίων ασφαλείας (*L. monocytogenes*) σε τυποποιημένα παγωτά και παγωτά ζαχαροπλαστέιου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το παγωτό είναι ένα ευαλλοιώτο και επισφαλές προϊόν με βάση το γάλα και διάφορα άλλα υλικά. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν πρώτον η καταμέτρηση του πληθυσμού των μικροβιολογικών δεικτών ασφαλείας και υγιεινής και στη συνέχεια η ταυτοποίηση των απομονωθέντων μικροοργανισμών που καταμετρήθηκαν.

Το πρώτο κεφάλαιο αναφέρετε στο θεωρητικό μέρος της εργασίας τα γενικά στοιχεία του παγωτού, τα είδη που υπάρχουν, τη διατροφική αξία, την παραγωγική διαδικασία, και στοιχεία από την κατανάλωση παγωτού στην Ελλάδα. Στη συνέχεια περιγράφεται ο μικροοργανισμός *L.monocytogenes* και η σημασία του για τη δημόσια υγεία, αμέσως μετά γίνεται αναφορά στους μικροοργανισμούς της οικογενείας *Enterobacteriaceae*, και τέλος γίνεται μια περιγραφή τι είναι δείκτης ασφαλείας και δείκτης υγιεινής και η νομοθεσία για τα όρια.

Το δεύτερο κεφάλαιο αναφέρεται στα υλικά και τον εξοπλισμό και τις μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν για να καταλήξουμε στο αποτέλεσμα που αναφέρετε στο τρίτο και τελευταίο κεφάλαιο της παρούσας εργασίας.

Το τρίτο κεφάλαιο αναφέρεται στα συμπεράσματα που βγήκαν ότι το 12% από τα τυποποιημένα παγωτά ενώ το 76% των παγωτών ζαχαροπλαστέιου είναι επιβαρυνμένα με Εντεροβακτηριακά καθώς και ότι και στα δύο είδη παγωτού είναι απύσα η παρουσία Λιστέριας. Από τα 3 θετικά δείγματα των τυποποιημένων παγωτών το ένα ταυτοποιήθηκε *Proteus vulgaris* και τα δυο *Proteus mirabilis*. Από τα παγωτά ζαχαροπλαστέιου βρέθηκαν 19 θετικά δείγματα τα οποία ταυτοποιήθηκαν ως εξής ένα δείγμα *Citrobacter freundii*, δυο δείγματα *Citrobacter youngae*, εννέα δείγματα *Enterobacter cloacae*, ένα δείγμα *Enterobacter asburiae*, ένα δείγμα *Pantoea dispersa*, έξι δείγματα *Pantoea agglomerans*, ένα δείγμα *Proteus vulgaris*, και ένα δείγμα *Proteus mirabilis*.

Study of microbiological hygiene criteria (*Enterobacteriaceae*) and safety criteria (*L. monocytogenes*) in standard ice cream and ice cream of patisserie.

SUMMARY

Ice cream is a perishable and unsafe product with milk and various other ingredients. The purpose of this study was first to count the population of microbiological indicators of health and safety, then the identification of the isolated microorganisms which were counted.

The first chapter deals with the theoretical part of the work the general elements of ice cream, types of it, nutritional value, production process, and data of ice cream consumption in Greece. Then *L.monocytogenes* microorganism is described and its importance to public health, then a reference is made to the microorganisms of the *Enterobacteriaceae* family, and finally a description is made of what a safety index and a hygiene index are and limits legislation.

The second chapter refers to ingredients, equipment and the methods used to make the conclusion reported in the third and final chapter of this thesis. The third chapter deals with the conclusions that came out that 12% of standard ice cream while 76% of ice cream of patisserie are aggravated with *Enterobacteriaceae* and the absence of *Listeria monocytogenes* in both types of ice cream. 1 of the 3 positive samples of standard cream is identified *Proteus vulgaris* and the other 2 are identified *Proteus mirabilis*. From 19 samples of ice cream of patisserie were found positive and were identified as follows: one sample *Citrobacter freundii*, two samples *Citrobacter youngae*, nine samples *Enterobacter clocae*, one sample *Enterobacter asburiae*, one sample *Pantoea dispersa*, six samples *Pantoea agglomerans*, one sample *Proteus vulgaris*, and one sample *Proteus mirabilis*.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ.

A. ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	i
B. ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΠΙΝΑΚΩΝ.....	ii
Γ. ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ.....	iii
1.1 ΙΣΤΟΡΙΑ ΚΑΙ ΠΑΓΩΤΟ	1
1.2 ΜΕΓΕΘΟΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΠΑΓΩΤΟΥ	1
1.3 ΟΡΙΣΜΟΣ –ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ ΠΑΓΩΤΟΥ	3
1.4 ΤΑ ΕΙΔΗ ΤΟΥ ΠΑΓΩΤΟΥ	4
1.5 ΤΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΤΟΥ ΠΑΓΩΤΟΥ	5
1.5.1 Λίπος.....	6
1.5.2 ΣΥΑΛ	6
1.5.3 Σάκχαρα.....	7
1.5.4 Γαλακτοματοποιητές.....	7
1.5.5 Σταθεροποιητές	7
1.5.6 Ουσίες γεύσης και αρώματος.....	8
1.6 ΠΑΡΑΓΩΓΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΠΑΓΩΤΟΥ.....	8
1.6.1 Παστερίωση του μίγματος	10
1.6.2 Ομογενοποίηση	10
1.6.3 Ψύξη- Ωρίμανση	11
1.6.4 Κατάψυξη- Διόγκωση.....	11
1.6.5 Συσκευασία-Σκλήρυνση	11
1.7 ΘΡΕΠΤΙΚΗ ΑΞΙΑ ΠΑΓΩΤΟΥ.....	11
1.8 ΠΑΘΟΓΟΝΟΙ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΑΝΗΣΥΧΙΑ ΓΙΑ ΤΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ	12
1.9 ΛΙΣΤΕΡΙΑ (<i>Listeria monocytogenes</i>).	13
1.9.1 Γενικά χαρακτηριστικά.....	13
1.9.2 Ταξινόμηση.....	13

1.9.3	Συνθήκες ανάπτυξης και θερμική αντίσταση.....	15
1.9.4	Ορότυποι.....	17
1.9.5	Η <i>Listeria monocytogenes</i> στα τρόφιμα	18
1.9.6	Λιστέρια και δημοσία υγεία.....	18
1.9.7	Λιστερίωση	19
1.9.8	Απομόνωση Λιστέριας	21
1.9.9	Θεραπεία της Λιστερίωσης.....	22
1.10	ΕΝΤΕΡΟΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ (<i>Enterobacteriaceae</i>)	23
1.10.1	Γενικά χαρακτηριστικά.....	23
1.10.2	Ταξινόμηση.....	23
1.10.3	Ταυτοποίηση.....	25
1.10.4	Αντιγονική σύσταση.....	27
1.10.5	Επιδημιολογία εντεροβακτηριακών	28
1.10.6	Απομόνωση –καλλιεργητικές τεχνικές.....	29
1.10.7	Κλινική σημασία–παθογόνος δράση των Εντεροβακτηριακών	30
1.11	ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ	32
1.11.1	Μέθοδος ανίχνευσης <i>Listeria monocytogenes</i> ISO 11290.....	32
1.11.2	Μέθοδος ανίχνευσης <i>Enterobacteriaceae</i> ISO 21528.....	33
1.12	ΟΡΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ	34
1.12.1	Ορισμοί.....	34
1.12.2	Νομοθεσία.....	34
2.1	ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΜΕΝΑ ΥΛΙΚΑ	36
2.1.1	Θρεπτικά υποστρώματα.....	36
2.1.2	Οργανικά χημικά.....	36
2.2	ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΜΕΝΟΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ.....	36
2.2.1	Σκεύη.....	37

2.2.2 Όργανα και συσκευές	37
2.3.1 Μικροοργανισμοί που θα εξεταστούν και οι μέθοδοι ανίχνευσης τους.	38
2.4.1 Δειγματοληψία	38
2.4.2 Ομογενοποίηση του δείγματος.....	38
2.4.3 Διαδοχικές αραιώσεις	39
2.4.4 Ενοφθαλμισμός θρεπτικών υποστρωμάτων για <i>L.monocytogenes</i>	39
2.4.5 Ενοφθαλμισμός θρεπτικών υποστρωμάτων για <i>Enterobacteriaceae</i>	40
2.4.7 Αρίθμηση αποικιών.	41
2.4.8 Καλλιέργεια σε TSA άγαρ.....	42
2.4.9 Καλλιέργεια σε MacConkey άγαρ.....	42
2.4.8 Δοκιμή της οξειδάσης.....	43
2.4.9 Υλικό KLIGLER.....	44
2.4.10 Δοκιμή ινδόλης.....	44
2.4.11 Ταυτοποίηση- Σύστημα MICROGEN GnA+GnB –ID SYSTEM	45
3.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	48
3.2 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	51
4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	55
4.1 Ξενόγλωσση βιβλιογραφία.	55
4.2 Ελληνική βιβλιογραφία.	61
4.3 Ηλεκτρονικές διευθύνσεις	62

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Υγιεινής και Επιδημιολογίας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα αυτής της μεταπτυχιακής ερευνητικής μελέτης και Επίκουρο Καθηγητή του τμήματος Ιατρικής κ. Πουρνάρα Σπυρίδων, όσον αφορά στην σωστή διεκπεραίωση της μεταπτυχιακής μελέτης είτε σε επίπεδο διεξαγωγής πειραμάτων είτε σε επίπεδο συγγραφής της. Θερμές ευχαριστίες θα ήθελα επίσης να απευθύνω στους συναδέλφους μου στο Εργαστήριο Έλεγχου και Κυκλοφορίας Λάρισας(Ε.Ε.ΚΥ.Ζ) για την πολύτιμη βοήθεια τους κατά τη διάρκεια εκπόνησης αυτής της εργασίας. Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω όλο το προσωπικό του εργαστηρίου για την άψογη συνεργασία μας κατά τη διάρκεια της εκπόνησης αυτής της εργασίας. Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου, όσο και τους φίλους μου εντός και εκτός μεταπτυχιακού για την αμέριστη συμπαράσταση και στήριξη τους μέχρι την ολοκλήρωση αυτού του μεταπτυχιακού προγράμματος.

Β.ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΠΙΝΑΚΩΝ.

Πίνακας 1.1 Μέγεθος εγχώριας φαινομενικής κατανάλωσης παγωτού 1994-2008.....	2
Πίνακας 1.2 Βιοχημικά χαρακτηριστικά των διαφόρων ειδών <i>Listeria Spp.</i>	14
Πίνακας 1.3 Κλινικά σύνδρομα που περιγράφονται για τη λοίμωξη από <i>L. monocytogenes.</i>	21
Πίνακας 1.4 Βιοχημικές ιδιότητες των κυριότερων Εντεροβακτηριακών.	27
Πίνακας 2.1 Όργανα και συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν	37
Πίνακας 2.2 Θρεπτικών υποστρωμάτων ,θερμοκρασίας και χρόνου επώασης.	41
Πίνακας 3.1 Πίνακας συνολικών αποτελεσμάτων των θετικών δειγμάτων.....	49

Γ. ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 1.1: Διάγραμμα ροής παραγωγικής διαδικασίας παγωτού.....	9
Διάγραμμα 3.1: Διάγραμμα αποτελεσμάτων.....	50
Διάγραμμα 3.2: Ποσοστό επιμολυσμένων παγωτών ζαχαροπλαστέιου με <i>L. monocytogenes</i>	50
Διάγραμμα 3.3: Ποσοστό επιμολυσμένων τυποποιημένων παγωτών με <i>Enterobacteriaceae</i>	51
Διάγραμμα 3.4: Συνολικά αποτελέσματα ταυτοποίησης.....	51
Διάγραμμα 3.5: Αποτελέσματα ταυτοποίησης δειγμάτων τυποποιημένων παγωτών.....	52
Διάγραμμα 3.6: Αποτελέσματα ταυτοποίησης παγωτών ζαχαροπλαστέιου.	52

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΙΣΤΟΡΙΑ ΚΑΙ ΠΑΓΩΤΟ

Η παρασκευή προϊόντων με βάση τον πάγο έχει παρατηρηθεί στην αρχαία Αίγυπτο, στους Βαβυλώνιους και στην Κίνα, γύρω στο 2000 π.Χ, όπου παρασκευάζονταν από ελαφρώς βρασμένο ρύζι, μυρωδικά και γάλα, τα όποια τοποθετούνταν στο χιόνι για να πήξουν. Αργότερα παρασκευάστηκαν γλυκά με βάση παγωμένους χυμούς φρούτων, με ή χωρίς γάλα, και κατά το 13^ο αιώνα μπορούσε να τα αγοράσει κάποιος εύκολα στους δρόμους του Πεκίνου. Στην Ευρώπη χαρακτηριστικά εμφανίζεται από τον Μάρκο Πόλο, ο οποίος το έφερε στη Βενετία το 1292. (Stallings, W. S, 1979.).

Το 1533, όταν η Κατερίνα των Μεδίκων παντρεύτηκε τον Ερρίκο Β΄ της Γαλλίας, έφερε στη νέα της πατρίδα ένα παγωμένο επιδόρπιο από γλυκιά κρεμά, η όποια έμοιαζε πολύ με το σημερινό παγωτό. Η τιμή του όμως ήταν αστρονομική, αφού δεν ήταν καθόλου εύκολο να διατηρηθεί ο πάγος το καλοκαίρι. Το 16^ο αιώνα υπήρχαν αποθήκες γεμάτες με χιόνι για το πάγωμα των σερμπετιών (γλυκό δροσιστικό ποτό από χυμούς φρούτων) στο σαράι του σουλτάνου της Κωνσταντινούπολης. Το παγωτό λοιπόν ήταν αποκλειστικό προνόμιο των πλουσίων. Όμως γύρω στα 1560 ένας Ισπανός γιατρός που ζούσε στη Ρώμη, ο Μπλάσιους Βιλαφράνκα, ανακάλυψε ότι προσθέτοντας νιτρική ποτάσα στο χιόνι και στον πάγο μπορούσε να καταψύξει οτιδήποτε πολύ πιο γρήγορα. Αυτή η εφεύρεση έδωσε μεγάλη ώθηση στην παράγωγη παγωτού και ήταν το πρώτο βήμα για την ευρεία κατανάλωση. Κατά το 19^ο αιώνα το παγωτό διαδόθηκε στην Αγγλία και στην Αμερική χάρη στους Ιταλούς μετανάστες που το πωλούσαν στους δρόμους. Η πρώτη όμως βιομηχανία παρασκευής παγωτού ιδρύθηκε το 1851 στην Βαλτιμόρη από τον Jacob Fussel, αλλά η μεγάλη εξάπλωση στην παράγωγη και κατανάλωση του ανά τον κόσμο έγινε μετά το 1920, λόγω της αναπτύξεως των μεθόδων καταψύξεως και μεταφοράς καταψυγμένων τροφίμων. Το παγωτό σήμερα αποτελεί ένα σύνηθες δροσιστικό γλύκισμα στο διαιτολόγιο μας, ιδιαίτερα τις καλοκαιρινές μέρες όπου στις αναπτυγμένες χώρες η κατανάλωση παγωτού φαίνεται να κυμαίνεται από 5 ως 10kg κατά κεφαλή ετησίως. (Αντώνιος Ι. Μαντής, 2003). Στην Ελλάδα καταναλώνονται 3,5 κιλά κατά κεφαλή ετησίως. (Έρευνα της ICAP για το έτος 2002, δημοσιεύτηκε στην εφημερίδα ΕΘΝΟΣ στις 21/6/2003.)

1.2 ΜΕΓΕΘΟΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΠΑΓΩΤΟΥ.

Υπάρχουν δύο μεγάλες κατηγορίες παγωτού, τα λεγόμενα **βιομηχανικά** και τα **χειροποίητα** παγωτά. Τα βιομηχανικά ή τυποποιημένα παγωτά παρασκευάζονται από μεγάλους κατασκευαστές σε μεγάλη κλίμακα. Είναι τα ατομικά παγωτά τα οποία διατίθενται υπό την μορφή ξυλάκι, πύραυλος, κύπελλο και ειδικού τύπου (όπως είναι η παγωτοσοκολάτα και τα σάντουιτς). Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν και τα οικογενειακά παγωτά, τα οποία διατίθενται στην αγορά είτε σε δοχεία, είτε σε μορφή ατομικών παγωτών συσκευασμένα σε πολυσυσκευασίες.

Τα χειροποίητα ή επαγγελματικά παγωτά (χύμα), παρασκευάζονται με πολύ απλό εξοπλισμό από μικρής κλίμακας ανεξάρτητους παραγωγούς παγωτού. Είναι τα παγωτά που προορίζονται για επαγγελματική χρήση και για ταχεία κατανάλωση, συσκευασμένα κυρίως σε μεγάλα δοχεία. Τα χειροποίητα παγωτά καταλαμβάνουν μόνο το 15% της συνολικής κατανάλωσης παγωτού στην Ελλάδα (ICAP 2006)

Όπως προκύπτει από τον πίνακα 1 η εγχώρια παράγωγη παγωτού παρουσίασε πτωτική πορεία το διάστημα 1994-1997, ενώ τη διετία που ακολούθησε (1998-1999) κινήθηκε ανοδικά. Το 2000 παρατηρείται σημαντική μείωση της παράγωγης, της τάξης του 14% σε σχέση με το προηγούμενο έτος, η οποία οφείλεται στο γεγονός ότι η εταιρία Unilever Ελλάς Α.Ε.Β.Ε. (Algida) σταμάτησε την παραγωγή παγωτού και προμηθεύεται τα εν λόγω προϊόντα από το εξωτερικό. Η πτωτική πορεία συνεχίστηκε και τα επόμενα δυο έτη εξαιτίας των άσχημων καιρικών συνθηκών που επικρατήσαν τους καλοκαιρινούς μήνες και δεν ευνόησαν την ευρεία κατανάλωση παγωτού. Το 2003 παρουσιάστηκε νέα άνοδος της παραγωγής κατά 4,6%, ενώ το 2004 σημειώθηκε οριακή μείωση στο συνολικό μέγεθος της παράγωγης (0,88%). Τη διετία 2005-2006 παρατηρήθηκε εκ νέου αύξηση της εγχώριας παραγωγής παγωτού η οποία το 2006 διαμορφώθηκε σε 35.200 τόνους περίπου, αυξημένη κατά 2,03% σε σχέση με το 2005. (ICAP ,2009)

Πίνακας 1.1 Μέγεθος εγχώριας φαινομενικής κατανάλωσης παγωτού 1994-2008.

Έτος	Παραγωγή	Εισαγωγές	Εξαγωγές	Φαινομενική κατανάλωση
1994	39.900	3.200	6.050	37.050
1995	39.300	4.250	6.650	36.900
1996	36.900	4.400	3.150	38.150
1997	34.100	4.900	2.500	36.500
1998	36.300	5.650	4.150	37.800
1999	38.400	3.950	3.500	38.850
2000	33.000	9.500	3.000	39.500
2001	32.600	10.300	3.000	39.900
2002	32.500	10.500	3.300	39.700
2003	34.000	11.000	3.400	41.600
2004	33.700	11.000	3.500	41.200
2005	34.500	9.200	3.300	40.400
2006	35.200	9.400	3.300	41.300
2007	36.600	10.700	4.600	42.700
2008	37.100	11.600	6.800	41.900

Ποσότητα: τόνοι

Συγκεκριμένα η εταιρεία Nestlé Ελλάς Παγωτά Α.Ε. εκτιμάται ότι απέσπασε μερίδιο της τάξης του 28% στη συνολική αγορά παγωτού το 2008 και ακολούθησε η εταιρεία Έβγα Α.Β.Ε.Ε. με αντίστοιχο μερίδιο που εκτιμάται ότι είναι της τάξης του 23,5%. Επίσης η εταιρεία Ελαις- Unilever Hellas Α.Ε.Β.Ε. εκτιμάται ότι συγκέντρωσε μερίδιο που

κυμάνθηκε περί το 18%. Σημαντική θέση στο κλάδο κατέχουν επίσης οι εταιρείες Κρι – Κρι Βιομηχανία Γάλακτος Α.Β.Ε.Ε. (με εκτιμώμενο μερίδιο αγοράς ~8%) και Δωδώνη Παγωτά Α.Ε.Β.Ε. (με αντίστοιχο μερίδιο περίπου 3,5%).

Στα ατομικά παγωτά, η εταιρεία Nestlé Ελλάς Παγωτά Α.Ε. απέσπασε το 39,0%-39,5% της εγχώριας κατανάλωσης το 2008. Η Έβγα Α.Β.Ε.Ε. κατέλαβε αντίστοιχο μερίδιο αγοράς μεταξύ του 25,5%-26,0% και ακολούθησαν η εταιρεία Ελαΐς-Unilever Hellas Α.Ε.Β.Ε. με μερίδιο που κυμάνθηκε μεταξύ του 16,5%-17,0% και η Κρι – Κρι Βιομηχανία Γάλακτος Α.Β.Ε.Ε. με μερίδιο μεταξύ του 13,0%-13,5%.

Στα τυποποιημένα παγωτά (χύμα), η εταιρεία Ελαΐς-Unilever Hellas Α.Ε.Β.Ε. εκτιμάται ότι απέσπασε μερίδιο της τάξης του 19%, ενώ η Έβγα Α.Β.Ε.Ε. κατείχε αντίστοιχο ποσοστό της τάξης του 15,5%. Αξιόλογο μερίδιο κατέλαβε και η εταιρεία Δωδώνη

Παγωτά Α.Β.Ε.Ε., η οποία κάλυψε το 11,5%-12,0% της κατανάλωσης των εν λόγω προϊόντων. Τέλος η Nestle Ελλάς Α.Ε. εκτιμάται ότι είχε μερίδιο κοντά στο 5%. (ICAP, 2009).

1.3 ΟΡΙΣΜΟΣ –ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ ΠΑΓΩΤΟΥ

Κατά το άρθρο 137 του Ελληνικού κώδικα τροφίμων του 1988 ως:

“Παγωτά νοούνται προϊόντα που παρασκευάζονται με ανάμιξη είτε νωπού πλήρους γάλακτος ή πλήρους γάλακτος που παίρνεται από αραίωση συμπυκνωμένου ή μερικώς συμπυκνωμένου (εβαπορέ) γάλακτος, είτε χυμού φρούτων με φυσική γλυκαντική υλη και άλλες ύλες που ρητά διαλαμβάνονται στο παρόν κεφάλαιο μετά από πήξη με ψύξη της μάζας αυτής που έχει ομογενοποιηθεί”.

Αυτός ο ορισμός παρουσιάζει κάποιες ασάφειες σχετικά με κάποιους όρους. Ο χαρακτηρισμός του νωπού θα έπρεπε να παραληφτεί, επειδή ο χαρακτηρισμός του νωπού θα έπρεπε να αντικατασταθεί από την λέξη κανονικού γάλακτος, ή και να παραληφτεί, επειδή ο χαρακτηρισμός νωπό σημαίνει ότι δεν έχει υποστεί θερμική ή άλλη επεξεργασία. Διαφορετικά θα μπορούσε να συμπεριληφθεί στον ορισμό και η θερμική μεταχείριση του μείγματος κατά την ομογενοποίηση. Παράλληλα, απαραίτητη είναι η αναφορά του όρου θερμική επεξεργασία. Η σκόνη γάλακτος θα έπρεπε, επίσης να συμπεριληφθεί στον ορισμό, διότι η χρησιμοποίηση της επιτρέπεται για κάποιους τύπους παγωτών, αλλά και γιατί επιβάλλεται τεχνολογικά για την παραγωγή καλύτερου παγωτού. Τέλος κατατάσσει στα παγωτά όλους τους κατεψυγμένους χυμούς με γλυκαντικές ύλες και άλλα πρόσθετα, χωρίς αυτά να είναι γαλακτοκομικά προϊόντα. Ανεξάρτητα από τις νομοθετικές απαιτήσεις κάθε χώρας το λίπος γάλακτος και το ΣΥΑΛ γάλακτος είναι απαραίτητα, για να είναι το παγωτό γευστικό και να αφήνει ευχάριστη αίσθηση στο στόμα. (Ζερφυρίδης, Γρ, 2001)

1.4 ΤΑ ΕΙΔΗ ΤΟΥ ΠΑΓΩΤΟΥ

Παγωτό Γάλακτος

Το προϊόν που συμφωνεί με τον γενικό ορισμό και περιέχει τουλάχιστον 2,5% λιπαρά γάλακτος και τουλάχιστον 6% στερεό υπόλειμμα γάλακτος άνευ λίπους, αποκλειόμενης της προσθήκης λιπαρών ή πρωτεϊνών προέλευσης άλλης από αυτής του γάλακτος. (www.efet.gr)

Παγωτό Κρέμας (Dairy Ice Cream)

Το παγωτό γάλακτος που συμφωνεί με τον γενικό ορισμό και πρέπει να περιέχει τουλάχιστον 5% λιπαρά γάλακτος, αποκλειόμενης της προσθήκης λιπαρών ή πρωτεϊνών προέλευσης άλλης από αυτής του γάλακτος. Η αναφορά στον όρο «κρέμα» αφορά στην υφή και στην ενισχυμένη περιεκτικότητα σε λιπαρά γάλακτος (5%) σε σχέση με το παγωτό γάλακτος. Στην κατηγορία αυτή θα μπορούμε να συναντήσουμε ονομασίες πώλησης παγωτών π.χ. παγωτό κρέμας βανίλια, παγωτό κρέμας κακάο κ.α. (www.efet.gr)

Παγωτό Καϊμάκι

Το παγωτό γάλακτος με γεύση μαστίχας που περιέχει τουλάχιστον 8% λιπαρά γάλακτος, στερεό υπόλειμμα γάλακτος άνευ λίπους τουλάχιστον 7%, ολικά στερεά τουλάχιστον 34%, αποκλειόμενης της προσθήκης λιπαρών ή πρωτεϊνών προέλευσης άλλης από αυτής του γάλακτος. Απαγορεύεται η προσθήκη στο αρχικό μίγμα του «παγωτού καϊμάκι», χυμών φρούτων ή σιροπιών τους ή σπασμένων ξηρών καρπών, επιτρέπεται όμως να προστίθενται αυτά στο τελικό προϊόν κατά τη συσκευασία. Απαγορεύεται η προσθήκη κρόκων αυγών στο «παγωτό καϊμάκι». (www.efet.gr)

Παγωτό Σορμπέ

Είναι το προϊόν που συμφωνεί με τον γενικό ορισμό και περιέχει τουλάχιστον 25% φρούτα. Το ποσοστό αυτό μπορεί να ελαττωθεί στο 15% στην περίπτωση:

α. εσπεριδοειδών

β. άλλων όξινων φρούτων, ήτοι φρούτων ή μιγμάτων φρούτων, ο χυμός των οποίων έχει οξύτητα εκφρασμένη σε κιτρικό οξύ τουλάχιστον 2,5%

γ. εξωτικών φρούτων ή ειδικών φρούτων που έχουν δυνατό άρωμα ή/και υψηλό ιξώδες, όπως ανανάς, μπανάνα, ακτινίδιο, μαρακούγια, γκουάβα κλπ.

Το ποσοστό αυτό μπορεί να ελαττωθεί στο 7% στην περίπτωση ξηρών καρπών. Τα παγωτά αυτά μπορεί να προσφέρονται στην κατανάλωση με ονομασίες που δηλώνουν σαφώς την προέλευση του χρησιμοποιηθέντος για την παρασκευή τους φρούτου π.χ. «Σορμπέ λεμόνι», «Σορμπέ φράουλα» κ.λπ. Στο παγωτό σορμπέ δεν επιτρέπεται η προσθήκη λιπαρών υλών. (www.efet.gr)

Παγωτό γρανίτα φρούτου ή γρανίτα φρούτου

Είναι το προϊόν που συμφωνεί με τον γενικό ορισμό και περιέχει τουλάχιστον 15% φρούτα. Το ποσοστό αυτό μπορεί να ελαττωθεί στο 10% στην περίπτωση:

α. εσπεριδοειδών

β. άλλων όξινων φρούτων, ήτοι φρούτων ή μιγμάτων φρούτων, ο χυμός των οποίων έχει οξύτητα εκφρασμένη σε κιτρικό οξύ τουλάχιστον 2,5%

γ. εξωτικών φρούτων ή ειδικών φρούτων που έχουν δυνατό άρωμα ή/και υψηλό ιξώδες, όπως ανανάς, μπανάνα, ακτινίδιο, μαρακούγια, πασιφλωρίδες, γκουάβα κλπ.

Το ποσοστό αυτό μπορεί να ελαττωθεί στο 5% στην περίπτωση ξηρών καρπών. Τα παγωτά αυτά μπορεί να προσφέρονται στην κατανάλωση με ονομασίες που δηλώνουν σαφώς την προέλευση του χρησιμοποιηθέντος για την παρασκευή τους φρούτου π.χ. «Παγωτό γρανίτα λεμόνι», «Γρανίτα φράουλα» κ.λπ. (www.efet.gr)

Παγωτό γρανίτα ή Γρανίτα με άρωμα φρούτων

Είναι το προϊόν που συμφωνεί με τον γενικό ορισμό και περιέχει κυρίως νερό και γλυκαντικές ύλες. Τα παγωτά αυτά θα πρέπει να δηλώνονται με το χαρακτηριστικό άρωμα που περιέχουν π.χ. «Γρανίτα με άρωμα λεμονιού» απαγορευμένης της χρησιμοποίησης κατ' ευθείαν του ονόματος του φρούτου π.χ. «Γρανίτα λεμόνι», προς αποφυγή παραπλάνησης του καταναλωτικού κοινού. (www.efet.gr)

Παγωτό στιγμιαίας παρασκευής

Είναι το προϊόν που συμφωνεί με το γενικό ορισμό και που προσφέρεται στον καταναλωτή αμέσως μετά την παρασκευή του από ειδικό μηχάνημα αυτόματης ψύξης. (www.efet.gr)

Μίγμα για την παρασκευή παγωτού

Είναι προϊόν σε μορφή υγρή ή σκόνης για την παρασκευή παγωτού σύμφωνα με τις οδηγίες χρήσης και το οποίο περιλαμβάνει πρώτες και πρόσθετες ύλες από τις επιτρεπόμενες, κατά περίπτωση, για την παρασκευή παγωτού. σοκολάτα, μέλι, ξηροί καρποί, οίνοι, οινοπνευματώδη ποτά, σαλέπι καθώς και οποιοδήποτε βρώσιμο συστατικό τροφίμων που επιτρέπεται από την ισχύουσα νομοθεσία. (www.efet.gr)

1.5 ΤΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΤΟΥ ΠΑΓΩΤΟΥ

Τα συστατικά του παγωτού χωρίζονται σε γαλακτοκομικά και σε μη γαλακτοκομικά. Στα γαλακτοκομικά περιλαμβάνονται τα βασικά συστατικά του παγωτού, όπως το βούτυρο και τα στερεά γάλακτος χωρίς λίπος, τα οποία παίζουν και το σημαντικότερο ρόλο για την παρασκευή ενός απλού παγωτού, διότι δίνουν όγκο η μάζα στο μίγμα. Τα μη γαλακτοκομικά περιλαμβάνουν διάφορες γλυκαντικές ουσίες, σταθεροποιητές, γαλακτωματοποιητές, γευστικές και αρωματικές ουσίες, κάποια ειδικά προϊόντα, φρούτα, ξηρούς καρπούς, κακάο, σοκολάτα και νερό. Η ποσότητα κάθε συστατικού του μίγματος θα

πρέπει να υπολογίζεται με ακρίβεια έτσι ώστε να εξασφαλίζεται η κατάλληλη σύνθεση και το ισοζύγιο λίπους, στερεών, ζαχάρου και σταθεροποιητή. Σε κάθε τυποποίηση δεν θα πρέπει ο σταθεροποιητής να ξεπερνά το 0,5%κατα βάρος και ο γαλακτοματοποιητής το 0,2%, επίσης λιγότερο από 10% κατά βάρος λίπος γάλακτος και όχι λιγότερο από 20% σε ολικά στερεά γάλακτος. (Ζερφυρίδης,Γρ, 2001). Τα συστατικά του παγωτού είναι το λίπος, τα σάκχαρα, το στερεό υπόλειμμα άνευ λίπους (ΣΥΑΛ) γάλακτος, οι σταθεροποιητές, οι γαλακτοματοποιητές, οι ουσίες γεύσεως και οι χρωστικές και τα λοιπά συστατικά όπως ξηροί καρποί, φρούτα σοκολάτα, μπισκότα, κτλ. Πρόσθετα, ο αέρας του παγωτού μπορεί να θεωρείται ως το πιο σημαντικό συστατικό του παγωτού, χωρίς βέβαια να αποτελεί χειροπιαστή ύλη. Απουσία αέρα, το παγωτό θα ήταν ένα μεγάλο παγωμένο γάλα ανάμικτο με άλλα συστατικά, σαν μια συμπαγής μάζα, η οποία δεν κόβεται, δεν έχει κρεμώδη υφή και δε δίνει ευχάριστη αίσθηση στο στόμα. Η ποσοτική και η ποιοτική μεταχείριση των παραπάνω συστατικών καθορίζει τον τύπο, την τιμή και τη θρεπτική αξία του παγωτού. (Ζερφυρίδης,Γρ, 2001)

1.5.1 Λίπος

Το λίπος προέρχεται από το γάλα ή αν το απαιτούν οι περιστάσεις, στις περισσότερες περιπτώσεις, από κρέμα γάλακτος (παστεριωμένης στους 80°C για 15min). Το λίπος βελτιώνει την γεύση και την αίσθηση στο στόμα και το άριστο επίπεδο περιεκτικότητας του στο παγωτό ορίζεται γύρω στο 12%. Το λίπος κατά την εναέρωση του παγωτού κατανέμεται με τέτοιο τρόπο ώστε να καλύπτει το μεγαλύτερο μέρος της επιφάνειας των φυσαλίδων του αέρα, ενώ ταυτόχρονα σχηματίζει συσώματα υπό μορφή αλυσίδων που συνδέουν τις φυσαλίδες μεταξύ τους, με αποτέλεσμα να δημιουργείται ένα συνεχές χαλαρό πλέγμα λίπους μέσα στη συνεχή υδατική φάση του παγωτού. Παράλληλα, το παγωτό γίνεται πλούσιο σε γεύση και εμφάνιση, αυξάνοντας βέβαια τις θερμίδες και το κόστος. Κατά τη διαδικασία παράγωγης του παγωτού, στην εναέρωση, πραγματοποιείται μερική απόδραση του λίπους, ώστε να επιτυγχάνονται τα χαρακτηριστικά που αναφέρθηκαν. (Ζερφυρίδης,Γρ, 2001)

1.5.2 ΣΥΑΛ

Το ΣΥΑΛ αποτελείται από 38% πρωτεΐνες (80% καζεΐνη,20% αλβουμίνη και γλοβουλίνη), 54% λακτόζη και 8% άλατα. Αποτελεί την κυρία ουσία σταθεροποίησης και γαλακτοματοποίησης στο μίγμα παγωτού. Το άριστο επίπεδο περιεκτικότητας του στο παγωτό ορίζεται στο 10,5-11%. Το κανονικό γάλα από μόνο του είναι ικανό να δώσει τις απαιτούμενες τιμές ΣΥΑΛ, αλλά σε ειδικές περιπτώσεις γίνεται προσθήκη συμπυκνωμένου υπό κενό άπαχου γάλακτος 30% ΣΥΑΛ ή απάχης σκόνης.Η παρουσία πρωτεϊνών στο μίγμα του παγωτού είναι ευεργετική, διότι αυξάνουν το ιξώδες του, δρουν σαν ουσίες σταθεροποίησης του αφρού, δηλαδή βοηθούν στην εναέρωση του, δρουν σαν

γαλακτωματοποιητές, κάνουν το παγωτό κρεμώδες και έχουν μεγάλη διατροφική αξία. Η λακτόζη, από την άλλη συμβάλλει στη γλυκύτητα του παγωτού και τη μείωση του σημείου πήξεως του μίγματος. Σε υπερβολική ποσότητα όμως, δίνει μεγάλους κρυστάλλους, προσδίδοντας στο παγωτό αμμώδη υφή. (Ζερφυρίδης,Γρ, 2001)

1.5.3 Σάκχαρα

Αποτελούν το 20% του παγωτού. Το 5,5% είναι λακτόζη του γάλακτος και το υπόλοιπο συνήθως καλυπτόταν από την κοινή ζάχαρη. Τα βασικά χρησιμοποιούμενα σάκχαρα είναι οι μονοσακχαρίτες γλυκόζη, φρουκτόζη και οι δισακχαρίτες λακτόζη, σακχαρόζη και μαλτόζη. Τα σάκχαρα χρησιμοποιούνται στο παγωτό διότι παρέχουν την απαιτούμενη γλυκύτητα και βοηθούν στο ξεπέραςμα της "λιπαρότητας" του λίπους. Επίσης συντελούν στην σκληρότητα του τελικού προϊόντος και στην ικανότητα αποκόλλησης από τα σκεύη, λόγω της ιδιότητάς τους να αυξάνουν την οσμωτική πίεση και κατά συνέπεια να μειώνουν το σημείο πήξεως. Έτσι, αυξάνονται τα συνολικά στερεά και το ιξώδες του μίγματος του παγωτού, προτερήματα δηλαδή που συμβάλουν στη βελτίωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του παγωτού. (Ζερφυρίδης,Γρ, 2001)

1.5.4 Γαλακτωματοποιητές

Ο ρόλος των γαλακτοματοποιητών στο μείγμα του παγωτού είναι ουσιώδης, διότι βελτιώνουν τη διασπορά και την καλή κατανομή των λιποσφαιρίων μέσα στο μίγμα, διευκολύνουν τις αντιδράσεις λίπους- πρωτεΐνης και συνδέουν τις ουσίες αυτές, συντελούν στη μερική συσσωμάτωση των λιποσφαιρίων κατά την απόδραση του λίπους μέσα στον καταψύκτη και διευκολύνουν την ενσωμάτωση αέρα. Πρόσθετα το παγωτό δείχνει στεγνό και δεν κολλά στα τοιχώματα κατά την έξοδο του από τον καταψύκτη, έχοντας καλύτερη υφή και δομή. Οι γαλακτωματοποιητές που χρησιμοποιούνται στην βιομηχανία του παγωτού είναι εστέρες της γλυκερόλης, σορβιτόλης, σακχαρόζης, όπως και λεκιθίνη, παράγωγα προπυλενογλυκόλης κλπ. Από αυτούς όμως οι πλέον ενδεικνυόμενοι για το παγωτό είναι τα μονογλυκερίδια. Το ΣΥΑΛ και συγκριμένα η πρωτεΐνη φαίνεται πως είναι σημαντικός γαλακτοματοποιητής για το παγωτό, λόγω της ιδιότητάς της να μειώνει την επιφανειακή τάση στα σημεία επαφής λίπους-νερού. (Ζερφυρίδης,Γρ, 2001)

1.5.5 Σταθεροποιητές

Οι σταθεροποιητές είναι οι ουσίες εκείνες που έχουν την ιδιότητα να ακινητοποιούν το νερό, με αποτέλεσμα με τη χρήση τους να επιφέρουν κάποια επιθυμητά αποτελέσματα στο

παγωτό. Η υγρή φάση του μίγματος του παγωτού συγκρατείται διαμερισμένη, ώστε στην κατάψυξη να με σχηματίζονται κρύσταλλοι πάγου αισθητοί στο στόμα. Επίσης, όταν το παγωτό λιώνει οι σταθεροποιητές συγκρατούν το νερό και δεν επιτρέπουν το σχηματισμό μεγάλων παγοκρυστάλλων κατά την μετέπειτα κατάψυξη του παγωτού. Παράλληλα, με την αύξηση του ιξώδους, που πραγματοποιείται με την προσθήκη τους, παρατηρείται καλύτερη ενσωμάτωση αέρα και διαμόρφωση της δομής και της υφής. Βάσει της ελληνικής νομοθεσίας η συνολική ποσότητα σταθεροποιητών και γαλακτοματοποιητών μεμονωμένων ή σε συνδυασμό που επιτρέπεται να προστεθεί στο μίγμα του παγωτού δεν πρέπει να ξεπερνά το 1,0%. Τα είδη των σταθεροποιητών που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία παγωτού είναι η ζελατίνη, το αραβικό κόμμα, το τραγακάνθιο κόμμα, το κόμμα Karaya, το χαρουπάλευρο, το άλευρο γκουάρ, το άγαρ, τα αλγινικά, οι καραγενάνες, οι μεθοξυ-πηκτίνες, η κυτταρίνη και διάφορα παράγωγα της και κάποια μικροβιακά κόμματα. (Ζερφυρίδης, Γρ, 2001)

1.5.6 Ουσίες γεύσης και αρώματος

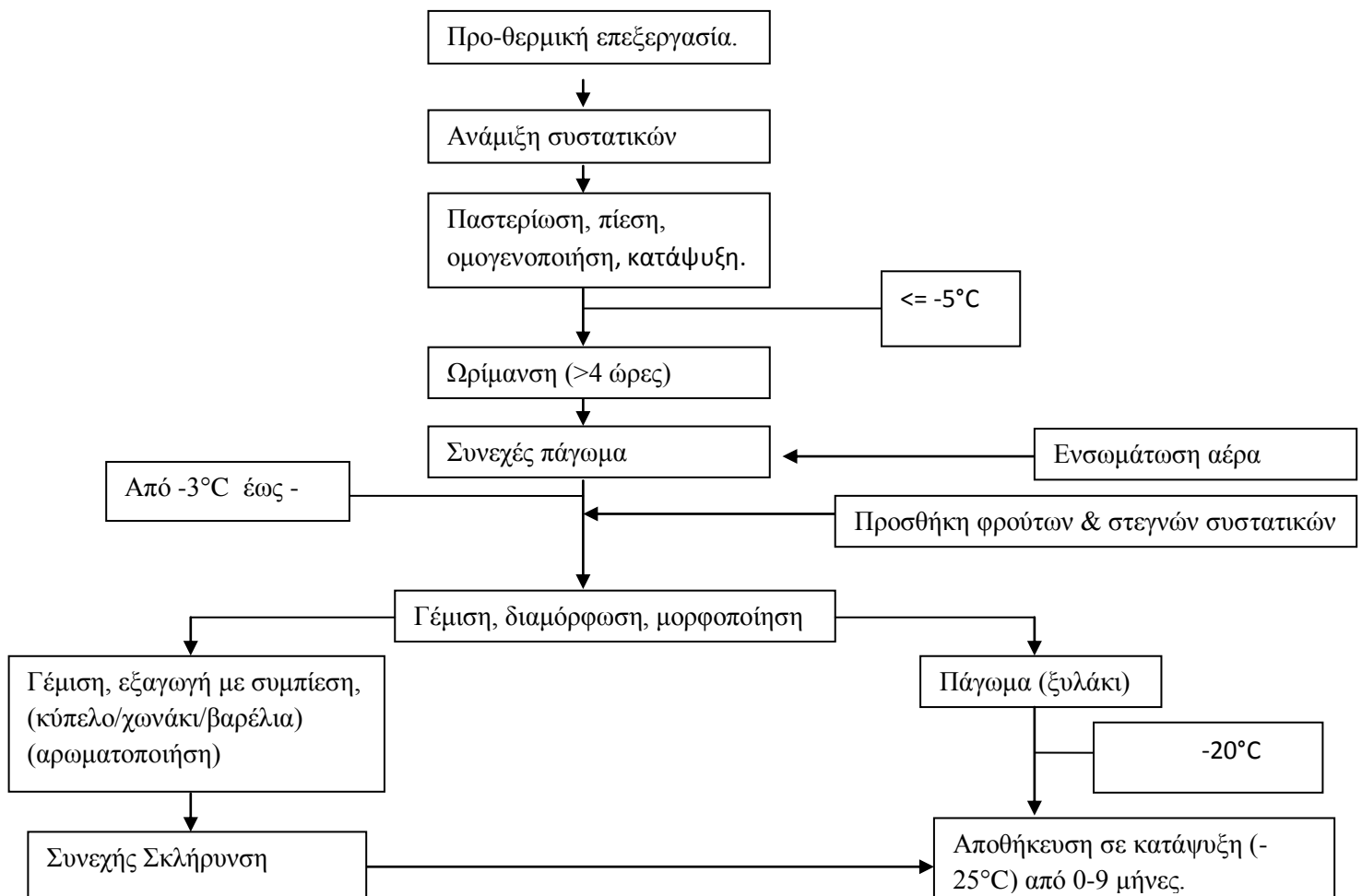
Η προσθήκη ουσιών γεύσεως αρώματος και χρώματος γίνεται καθαρά για λογούς μάρκετινγκ προκειμένου ο καταναλωτής να αγοράσει το προϊόν, διότι περάν της τιμής τα οργανοληπτικά κριτήρια είναι αυτά που θα οδηγήσουν στην αγορά. Τέτοιες ουσίες είναι η βανίλια, η σοκολάτα (κακάο), τα φρούτα, οι ξηροί καρποί και οι χρωστικές. Όλα αυτά θα πρέπει να είναι ποιοτικώς ελεγμένα από αναγνωρισμένες αρχές και να προσθέτονται στις προγραφόμενες αναλογίες. (Ζερφυρίδης, Γρ, 2001)

1.6 ΠΑΡΑΓΩΓΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΠΑΓΩΤΟΥ

Δημιουργείται ένα μίγμα από γάλα, (φρέσκο ή σε σκόνη, πλήρες, αποβουτυρωμένο ή συμπυκνωμένο και παστεριωμένο), ζάχαρη, γλυκόζη, αυγά και βανίλια, κακάο ή πουρές φρούτων ανάλογα με την επιθυμητή γεύση. Στο μίγμα προστίθενται σταθεροποιητές και γαλακτοματοποιητές, και ακολουθεί παστερίωση (στους 72 °C για 15 sec περίπου) που εξασφαλίζει τη μικροβιολογική ανεκτότητα του προϊόντος. Στη συνέχεια το μίγμα παραμένει σε δεξαμενές σε θερμοκρασία ψυγείου (2 – 5 °C) για μερικές ώρες (μέχρι 24) όπου προστίθενται οι επιθυμητές χρωστικές και αρωματικές ουσίες (φυσικά εκχυλίσματα). Η φάση αυτή καλείται ωρίμανση και τα συστατικά αναδεύονται ώστε να επιτευχθεί ομοιογένεια γεύσης και όψης. Ακολουθεί διέλευση του μίγματος από ένα κλειστό σύστημα στο οποίο προστίθεται φιλτραρισμένος αέρας με ταυτόχρονο χτύπημα και ψύξη. Οι φυσαλίδες του αέρα παρεμβάλλονται ανάμεσα στους κόκκους λίπους και γάλακτος, τους παγοκρυστάλλους και τη ζάχαρη και προσδίδουν όγκο στο μίγμα που καθιστά το τελικό προϊόν αφράτο. Η διαδικασία αυτή σπάει τις φυσαλίδες του αέρα σε μικρότερες οι οποίες περιβάλλονται από κόκκους λίπους που δίδουν στο μίγμα συνοχή με τα υπόλοιπα

συστατικά. Οι κόκκοι του λίπους «μονώνουν» τις φυσαλίδες του αέρα και αποτρέπουν τη συσπείρωσή τους, πράγμα που θα καθιστούσε την υφή του προϊόντος ανόμοια και δυσάρεστη. Το έτοιμο μίγμα εξέρχεται σε θερμοκρασία -5 έως -10 °C και μορφοποιείται (κύπελλα, ξυλάκια, χωνάκια κ.λ.π.) πάνω σε αυτόματες κυλιόμενες ταινίες. Τα προϊόντα μπαίνουν σε ειδικό τούνελ βαθιάς ψύξης, είτε στην τελική τους συσκευασία είτε στα καλούπια, όπου παίρνουν θερμοκρασία περίπου -22 °C. Η βαθιά ψύξη που μπορεί να φθάσει -30 °C ή παραπάνω, επικουρεί τη διατήρηση της υφής του προϊόντος όσον αφορά τη μορφολογία των συσπειρωμάτων αέρα, παγοκρυστάλλων, κόκκων λίπους και γάλακτος. Η τελική μορφοποίηση των προϊόντων γίνεται και έξω από το τούνελ βαθιάς κατάψυξης. Έτσι, τα ξυλάκια συσκευάζονται κατά την έξοδο ώστε η μάζα του προϊόντος να "αντέξει" την τοποθέτηση του ξύλου. Η επικάλυψη με σοκολάτα ή και ξηρούς καρπούς γίνεται κατά την έξοδο από το τούνελ όπου το προϊόν εμβαπτίζεται σε δεξαμενή λειωμένης σοκολάτας (στους $+40$ °C) ειδικού τύπου, έτσι ώστε κατά την επαφή με τη μάζα του παγωτού να στεγνώνει πολύ γρήγορα. Σχεδόν κάθε τύπος παγωτού απαιτεί ειδικό μηχάνημα. Το τελικό προϊόν αποθηκεύεται για περίπου 3 ημέρες, και μετά τους απαραίτητους (δειγματοληπτικούς) εργαστηριακούς ελέγχους της παρτίδας διατίθεται στην αγορά. (Walstra P. et al. 1999)

Διάγραμμα 1.1: Διάγραμμα ροής παραγωγικής διαδικασίας παγωτού.



1.6.1 Προετοιμασία του δείγματος

Ανάλογα με τον τύπο του παγωτού, που πρόκειται να παρασκευαστεί, ζυγίζονται ή ογκομετρούνται τα διάφορα συστατικά και φέρονται στη δεξαμενή αναμειξέως. Αρχικά τοποθετούνται μόνο τα ρευστά συστατικά, τα οποία θερμαίνονται στους 40-45°C και ύστερα προσθέτονται με συνεχή ανάδευση και τα υπόλοιπα. (Μαντής, Ι. Α, 2003)

1.6.1 Παστερίωση του μίγματος

Μετά την ανάμιξη και διάλυση των συστατικών το ρευστό μίγμα παγωτού υποβάλλεται σε παστερίωση προκειμένου να εξυγιανθεί. Παράλληλα η θέρμανση συμβάλλει στην καλύτερη διάλυση των συστατικών και στην βελτίωση της δομής του παγωτού. Η παστερίωση πρέπει να γίνεται σε θερμοκρασίες και χρόνο υψηλότερες από εκείνες που ισχύουν για το γάλα. Κι' αυτό επειδή η θερμοαντοχή των μικροοργανισμών αυξάνεται όταν βρίσκονται σε περιβάλλον όπως το μίγμα του παγωτού, το οποίο έχει μεγαλύτερο ποσοστό διαλυμένων ουσιών ανά μονάδα όγκου και γι' αυτό μικρότερο συντελεστή ενεργού νερού (a_w) σε σχέση με το γάλα. Στην πράξη η παστερίωση του μίγματος παγωτού γίνεται με τις εξής μεθόδους:

Με χαμηλή παστερίωση (LTLT), σε ανοιχτού τύπου δεξαμενές και σε θερμοκρασία 68-70°C για 30 min.

Με υψηλή παστερίωση (HTST), σε σύστημα εναλλακτήρων θερμότητας και σε θερμοκρασία 78-80°C

Με υπερπαστερίωση (μέθοδος UHT), η οποία γίνεται συνήθως είτε με σύστημα εγχύσεως ατμού ή με εναλλακτήρες επιφανειακής αποξέσεως και σε θερμοκρασία 145°C έως 150°C για χρόνο 2-3 sec (Μαντής, Ι. Α, 2003).

1.6.2 Ομογενοποίηση

Η ομογενοποίηση του μίγματος παγωτού αποσκοπεί στην αποφυγή διαχωρισμού της λιπαρής φάσεως με τη μείωση του μεγέθους των λιποσφαιρίων. Παράλληλα γίνεται καλύτερα η μίξη των συστατικών, καθώς και η ενσωμάτωση του αέρα και αυξάνεται η διογκωτική ικανότητα του μίγματος. Γίνεται συνήθως αμέσως πριν η μετά την παστερίωση, σε θερμοκρασία 62-76°C και πίεση 1000 έως 3.000 p.s.i, ανάλογα με την περιεκτικότητα του μίγματος σε λίπος. Μικρή περιεκτικότητα σε λίπος (<12%) απαιτεί υψηλή πίεση ομογενοποίησης (2500-3000 p.s.i). Από άποψη υγιεινής η ομογενοποίηση είναι προτιμότερο να γίνεται πριν από την παστερίωση γιατί αποφεύγονται τα προβλήματα επιμολύνσεως που μπορούν να εμφανιστούν στον ομογενοποιητή. (Μαντής, Ι. Α, 2003)

1.6.3 Ψύξη- Ωρίμανση

Αμέσως μετά την παστερίωση , το μίγμα ψύχεται, με τη βοήθεια ψυκτήρων-εναλλακτών θερμότητας, σε θερμοκρασία κάτω από 10°C και μεταβιβάζεται σε δεξαμενές αυτοδύναμης ψύξεως, όπου παραμένει σε θερμοκρασία ψύξεως 2-4°C για χρόνο 6-24 ωρών. Κατά τη φάση αυτή , η οποία χαρακτηρίζεται ως ωρίμανση-παλαίωση ενυδατώνονται πλήρως οι πρωτεΐνες(εφ' όσον προέρχονται από αφυδατωμένο γάλα), διογκώνονται τα διάφορα υδροκολλοειδή, που είχαν προστεθεί και αρχίζει η κρυστάλλωση του λίπους. (Μαντής, Ι. Α, 2003)

1.6.4 Κατάψυξη- Διόγκωση

Μετά την ωρίμανση το μίγμα διαβιβάζεται στους ειδικούς καταψύκτες στους οποίους με έντονη ανάδευση, μειώνεται η θερμοκρασία του στους -5°C έως -6°C και παράλληλα ενσωματώνεται σ' αυτό αέρας. Η ενσωμάτωση του αέρα επιφέρει διόγκωση του μίγματος κατά 50% έως 120% του αρχικού όγκου του και δίνει στο παγωτό την αφρώδη σύσταση του. Από άποψη υγιεινής η φάση αυτή είναι κρίσιμη και συχνά συμβαίνει αερογενής μόλυνση του μίγματος. (Μαντής, Ι. Α, 2003)

1.6.5 Συσκευασία-Σκλήρυνση

Αμέσως με την έξοδο του από τον καταψύκτη το μίγμα, ως παγωτό πλέον, συσκευάζεται είτε σε ατομική συσκευασία είτε σε μεγαλύτερη (5-20kg) για διανομή σε καταστήματα. Στη φάση αυτή ανάλογα με τον τύπο του παγωτού μπορεί να προστεθούν φρούτα , ξηροί καρποί, σιρόπια και άλλα συστατικά που επιτρέπει η νομοθεσία. Επίσης μπορεί να γίνει επικάλυψη με σοκολάτα, ή συσκευασία σε δίπυρα (π.χ. σάντουιτς, πύραυλοι κτλ). Μετά τη συσκευασία του το παγωτό μεταφέρεται αρχικά σε ψυγεία ή τούνελ κατάψυξεως θερμοκρασία -40°C όπου σκληρύνεται και στη συνέχεια σε ψυκτικούς θαλάμους συντηρήσεως -20°C έως - 25°C. (Μαντής, Ι. Α, 2003).

1.7 ΘΡΕΠΤΙΚΗ ΑΞΙΑ ΠΑΓΩΤΟΥ

Η θρεπτική αξία είναι ένα από τα χαρακτηριστικά της ποιότητας του τροφίμου. Είναι ουσιαστικά η απολαβή του οργανισμού τόσο σε μακροθρεπτικά συστατικά που δίνουν ενέργεια, όσο και σε βιταμίνες, άλατα και ιχνοστοιχεία, με την κατανάλωση τροφίμων. Για

τους λόγους αυτούς η θρεπτική αξία αποτελεί σημαντική παράμετρο που καθορίζει την επιλογή των πρώτων υλών, τον τρόπο παράγωγης και την αποθήκευση/ διακίνηση του τελικού προϊόντος. Η σύσταση και οι πρώτες ύλες που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή του παγωτού εξαρτώνται από την ποιότητα και τον τύπο του. Στο παγωτό περιέχονται αρκετά θρεπτικά συστατικά όπως πρωτεΐνες (με υψηλή βιολογική αξία 95%), υδατάνθρακες (20-25γρ/100γρ),λιπαρά,(0-13γρ/100γρ),απαραίτητα λιπαρά οξέα, μέταλλα, λιποδιαλυτές και υδροδιαλυτές βιταμίνες, αντιοξειδωτικές ουσίες. Συνδύαζει ζωικής και φυτικής προέλευσης θρεπτικά συστατικά, όπου σε αντίθετη περίπτωση ο ανθρωπινός οργανισμός θα έπρεπε να καταναλώνει τρόφιμα από διαφορετικές πηγές. Υψηλές συγκεντρώσεις παρουσιάζει στις λιποδιαλυτές βιταμίνες δηλαδή Α, D και Ε αλλά εξίσου και στις υδροδιαλυτές όπως θειαμίνη (B₁), ριβοφλαβίνη (B₂) και στην Β₁₂ που είναι ιδιαίτερα γνωστή για την αντιαναιμική της δράση και για το ότι δεν συναντάται ευρέως στη φύση αφού η συγκέντρωση της είναι ιδιαίτερα χαμηλή στα τρόφιμα φυτικής προέλευσης, γεγονός που καθίστα την ύπαρξη της στο παγωτό ιδιαίτερα σημαντική. Παρόλα αυτά θα πρέπει να δοθεί ιδιαίτερη προσοχή στο γεγονός ότι οι βιταμίνες καταστρέφονται όσο το παγωτό παραμένει σε συνθήκες κατάψυξης και αυτό επειδή η θερμοκρασία είναι πολύ χαμηλή και κάποιες βιταμίνες είναι ιδιαίτερα ευπαθείς σε ακραίες συνθήκες. Για τον παραπάνω λόγο λοιπόν ένας καταναλωτής θα πρέπει να προσέξει την ημερομηνία παραγωγής έτσι ώστε να μην απέχει μεγάλο διάστημα από την ημερομηνία αγοράς. Επίσης το παγωτό είναι πλούσιο σε ασβέστιο (120mg ανά 100 γραμμάρια παγωτού), και φώσφορο με ιδιαίτερα υψηλή βιοδιαθεσιμότητα σε ασβέστιο. Το παγωτό επίσης περιέχει και αλλά πολύ σημαντικά ανόργανα στοιχεία βοηθούν στην δόμηση του σκελετού αλλά παίζουν καθοριστικό ρόλο στο μεταβολισμό και συμβάλουν ουσιαδώς στην άριστη ανάπτυξη και υγεία. Αντιθέτως το παγωτό υστερεί σε σίδηρο, βιταμίνη D και C.(Miller G.D, 2000)

Θερμιδικά καλύπτει το 5-10% των ημερήσιων αναγκών σε ενέργεια (75-240 θερμ/100γρ), το 5-10% των αναγκών σε πρωτεΐνες, το 8-10% των αναγκών σε υδατάνθρακες, το 10-15% των αναγκών σε λίπη, το 15-20% των αναγκών σε βιταμίνη Α, το 20% των αναγκών σε βιταμίνη Β12 και το 40% των αναγκών σε βιταμίνη Α, το 20% των αναγκών σε βιταμίνη Β12, και το 40% των αναγκών σε ασβέστιο και φώσφορο.(Tuba Erkaya, et al 2011)

1.8 ΠΑΘΟΓΟΝΟΙ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΑΝΗΣΥΧΙΑ ΓΙΑ ΤΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ

Η βιομηχανική παραγωγή του παγωτού, αποτελεί, βεβαία, μια πολυσύνθετη διαδικασία και ένας αριθμός βημάτων ακολουθούνται, τα οποία σε κάποιο βαθμό μπορούν να επηρεάσουν την μικροβιολογική ποιότητα του τελικού προϊόντος. Η παρουσία παθογόνων μικροοργανισμών σε παγωτά και σε επιδόρπια που διατηρούνται υπό κατάψυξη, έχει αποτελέσει θέμα ανησυχίας για τη δημοσιά υγεία από την έναρξη λειτουργίας της βιομηχανίας γάλακτος. Το παγωτό είναι μια θρεπτική τροφή για ανθρώπινη ανάπτυξη και επίσης ένα εξαιρετικό μέσο για την ανάπτυξη πολλών μικροοργανισμών μερικά από τα οποία μπορεί να προκαλέσουν ασθένειες στον άνθρωπο. Το μολυσμένο παγωτό προκαλεί

πολλά κρούσματα γαστρεντερικών ασθενειών σε έναν αριθμό χωρών στην Ασία Ευρώπη και τη Βόρεια Αμερική (Dijuretic ,T, 1992-1996.)

Στην Αγγλία και την Ουαλία δύο εξάρσεις κρουσμάτων από *S. enteritidis* τύπου φάγων 4 λοιμώξεις αναφέρθηκαν το 1990 και το 1995 λόγω της κατανάλωσης παγωτού. (Hennessy,T.W.,C1996.)Μολονότι το παγωτό είναι ένα κατεψυγμένο προϊόν, έχει τεκμηριωθεί ότι μπορεί να μολυνθεί από παθογόνα βακτήρια, όπως *Salmonella spp.*, *Listeria spp.*, *Yersinia spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, κολοβακτηρίδια, *Bacillus spp.* μεταξύ άλλων σε πολλές χώρες. Οι παράγοντες που συμβάλλουν στην μόλυνση του παγωτού περιλαμβάνουν κακές πρακτικές υγιεινής κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας, η χρήση των μολυσμένων συστατικών, νωπό γάλα, αρωματικές ουσίες, ιδιαίτερα το κέλυφος των αυγών, η μολυσμένη σέσουλα νερού, επιμόλυνση μετά την επεξεργασία, και ακατάλληλες θερμοκρασίες αποθήκευσης. Η παρουσία των παθογόνων μικροοργανισμών στο παγωτό είναι υπεύθυνη για επιδημίες από σαλμονέλωση, κυρίως λόγω της *S. enteritidis* και λιστερίωση τονίζοντας τον κίνδυνο εγκυμονούν για την υγεία των καταναλωτών τα παγωτά. (Anil Pooran, et al,2012)

1.9 ΛΙΣΤΕΡΙΑ (*Listeria monocytogenes*).

1.9.1 Γενικά χαρακτηριστικά

Είναι ένα Gram θετικό βακτήριο, που κινείται με τη βοήθεια μαστίγιων. Μερικές μελέτες υποστηρίζουν ότι το 1-10% των ανθρώπων μπορεί να είναι εντερικοί μεταφορείς του *L. monocytogenes*. Έχει βρεθεί σε τουλάχιστον 37 θηλαστικά είδη, οικόσιτα και άγρια, καθώς επίσης και σε τουλάχιστον 17 είδη πουλιών και σε μερικά είδη ψαριών και οστρακόδερμων. Μπορεί να απομονωθεί από το χώμα, τη χλόη και άλλες περιβαλλοντικές πηγές. Η *L. Monocytogenes* είναι αρκετά ανθεκτική και αντιστέκεται στα επιβλαβή αποτελέσματα του παγώματος, της ξήρανσης και της θερμότητας, εντυπωσιακά καλά για ένα βακτηρίδιο που δεν παράγει σπόρους. Τα περισσότερα στελέχη της *L.monocytogenes* είναι παθογόνα. (Αρσένη Α. (1994).

1.9.2 Ταξινόμηση

Το γένος *Listeria* στην 9^η και τελευταία έκδοση του Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, τοποθετήθηκε μαζί με τα γένη *Lactobacillus*, *Brochothrix* και *Erysipelothrix*, στο κεφάλαιο με τον τίτλο " Συμμετρικά, μη σπορογόνα, θετικά κατά Gram, ραβδοειδή βακτήρια" (Regular,Nonsporing Gram-Positive Rods) (Bergey's, 1986). Η ταξινόμηση αυτού του γένους ήταν για πολλά χρόνια ασαφής. Όταν έγινε η εισαγωγή των μεθόδων της μοριακής βιολογίας, καθορίστηκε η φυλογενετική θέση του γένους *Listeria*, καθώς και οι διαφορές μεταξύ των ειδών του γένους. Τα βακτήρια του γένους *Listeria*, είναι παρόμοια

με τα βακτήρια του γένους *Brochothrix*. Και τα δυο γένη είναι θετικά στο τεστ καταλάσης, ενώ τα βακτήρια του γένους *Lactobacillus* είναι αρνητικά στο τεστ καταλάσης. Ενώ και τα τρία γένη παράγουν γαλακτικό οξύ από ζύμωση γλυκόζη και άλλων ζυμώσιμων σακχάρων. (Jones, D. 1988.) Τα γένη της *Listeria* περιέχουν τειχοϊκά και λιποτειχοϊκά οξέα, όπως και τα γένη *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Lactobacillus*, αλλά σε αντίθεση με αυτά, οι αποικίες τους εμφανίζουν μια κυανοπράσινη γυαλάδα, όταν παρατηρούνται από πλάγιως μεταδιδόμενο φως. (Jay, M.J.2000.) Έξι είναι τα είδη της *Listeria* που έχουν αναγνωριστεί επίσημα έως σήμερα, και αυτά παρατίθενται στον πίνακα 2.

Πίνακας 1.2. Βιοχημικά χαρακτηριστικά των διαφόρων ειδών *Listeria* Spp. (Seeloger HPR. And Jones D. (1992).

Χαρακτηριστικά	<i>monocytogenes</i>	<i>innocua</i>	<i>ivanovii</i>	<i>seeligeri</i>	<i>welshimeri</i>	<i>grayi</i>
B-αμιόλυση	+	-	+	+	-	-
CAMP test:						
<i>S.aureus</i>	+	-	-	+	-	-
<i>Rhodococcus equi</i>	-	-	+	-	-	-
Παραγωγή οξέος από:						
Gluconate	-	-	-	-	-	+
Lactose	V	+	+	+	+	+
D-Lyxose			-			-
Manitol	-	-	-	-	-	+
Melezitose		+				-
α -Methyl-D-glucoside	+	+	+	+	+	+
α -Methyl-D-mannoside	+	+	-	-	+	+
L-Rhamnose	+	V	-	-	V	-
Ribose			+			+
Saccharose					+	-
D-Tagatose			-			-
D-Turanose						-
D-Xylose	-	-	+	+	+	-
Υδρόλυση :						
Esculin	+	+	+	+	+	+
Hippurate	+	+	+	+	+	-
Phosphatase	+	+	+	+	+	+
Acid phosphatase	+	+	+	+	+	-
Phosphoamidase	+	+	+	+	+	-
Παραγωγή H ₂ O	-	-	-	-	-	d
Παθογένειας σε ποντίκια	+	-	+	-	-	-
Περιεκτικότητα G+C mol%	37-39	36-38	37-38	36	36	41-42

Μεταξύ των ειδών του γένους *Listeria*, μονό η *L. monocytogenes* θεωρείται παθογόνος για τα ζώα και τον άνθρωπο, ενώ η *L. ivanovii* έχει ενοχοποιηθεί για πρόκληση ασθένειας στα ζώα. Υπάρχουν σπάνιες αναφορές για πρόκληση ασθένειας στον άνθρωπο από στελέχη του

είδους *L. ivanovii*. Στα τρόφιμα, τα είδη του γένους που απαντώνται με τη μεγαλύτερη συχνότητα, είναι η *L. monocytogenes* και η *L. ivanovii* (Faber, J.M., and Peterkin, P.I. 1991.)

Η *L. monocytogenes* παράγει μια β-αιμολυσίνη, την λιστεριωλυσίνη O, η οποία δρα συνεργατικά με την αιμολυσίνη που παράγεται από τον *Staphylococcus aureus* στα ερυθρά κύτταρα των προβάτων, προκαλώντας έτσι εκτεταμένη αιμόλυση σε seep blood agar. Η αντίδραση αυτή είναι γνώστη ως CAMP test και χρησιμοποιείται με σκοπό τη διάκριση της *L. monocytogenes* από την *L. innocua* (Adams M.R. & Moss M.O, 1995.)

1.9.3 Συνθήκες ανάπτυξης και θερμική αντίσταση

Η *L. monocytogenes* είναι ένα ψυχροτροφικό βακτηρίδιο με την ικανότητα να αναπτύσσεται σε χαμηλές θερμοκρασίες. Η αργή ανάπτυξη ορισμένων στελεχών *L. monocytogenes* παρατηρήθηκε σε ένα εύρος θερμοκρασίας $-1,5^{\circ}\text{C}$ έως $-0,1^{\circ}\text{C}$ (Hudson et al. 1994). Σε άλλες μελέτες, η ελάχιστη θερμοκρασία ανάπτυξης για τη *L. monocytogenes* υπό το βέλτιστο pH και a_w κυμαινόταν μεταξύ $-1,6^{\circ}\text{C}$ και $0,41^{\circ}\text{C}$ και εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το pH του μέσου (Tienungsoon et al. 2000). Η ικανότητα ανάπτυξης σε χαμηλές θερμοκρασίες μπορούν να ποικίλουν μεταξύ των διαφόρων στελεχών της *L. monocytogenes* (Chan et al. 2009).

Η επιβίωση των κυττάρων της *L. monocytogenes* κατά την αποθήκευση σε παγωμένες θερμοκρασίες μπορεί να ποικίλει ανάλογα με τη θερμοκρασία και το ρυθμό κατάψυξης. Η χαμηλότερη θερμοκρασία κατάψυξης και ο ταχύς ρυθμός κατάψυξης ήταν οι πιο ευνοϊκές συνθήκες για την επιβίωση *L. monocytogenes*, ενώ μια αργή κατάψυξη στους -18°C είχε μια πιο θανατηφόρο επίδραση στην επιβίωση των κυττάρων. Η κατάψυξη και αποθήκευση στους -18°C μπορεί να αδρανοποιήσουν 1-2 logs και τραυματίζουν > 50% του βακτηριακού πληθυσμού (Lado et al. 2007). Ο Palumbo et al. (1991) έδειξαν ότι το χαμηλό pH των τροφίμων (pH 4.7) μπορεί να αυξήσει τους θανάτους και τους τραυματισμούς της *L. monocytogenes* κατά την αποθήκευση σε παγωμένες θερμοκρασίες.

Η ανάπτυξη της *L. monocytogenes* έχει αναφερθεί σε τιμές pH μεταξύ 4,0 και 9,6 (Farber et al, 2007.). Παρόλο που η ανάπτυξη της *L. monocytogenes* κάτω από pH 4.0 δεν έχει περιγραφεί, οι Parish και Higgins (1989) έδειξε ότι ορισμένα στελέχη της *L. monocytogenes* μπορεί να επιβιώσουν μέχρι και τέσσερις ημέρες σε χυμό πορτοκαλιού με pH 3.6 και περισσότερες από 365 ημέρες σε τυριά τσένταρ με pH 5,1, αποθηκευμένα στους 4°C και 6°C , αντιστοίχως.

Επιπλέον, η επίδραση του pH στην βιωσιμότητα της *L. monocytogenes* εξαρτάται από άλλους ενδογενής ή εξωγενής παράγοντες και από την φυσιολογική κατάσταση των κυττάρων. Οι θερμοκρασίες ψύξης μπορεί να αναστέλλουν την ανάπτυξη της *L. monocytogenes*, αλλά ευνοούν την επιβίωσή της σε όξινα τρόφιμα (Lado and Yousef. 2007). Οι Johnson et al. (1988) επιβεβαίωσαν ότι η *L. monocytogenes* μπορεί να επιβιώσει εύκολα για παράδειγμα, σε σκληρό σαλάμι με pH 4,4 κατά την διάρκεια αποθήκευσης σε θερμοκρασίες ψύξης. Η *L. monocytogenes* έχει την ικανότητα να προσαρμοστεί σε ένα

περιβάλλον με χαμηλό pH ή να προκαλεί αντοχή σε όξινο περιβάλλον (Caggia et al. 2009). Η παρατεταμένη επιβίωση προσαρμοσμένων σε όξινο περιβάλλον κύτταρων *L. monocytogenes*, σε σύγκριση με τα μη προσαρμοσμένα κύτταρα επιβεβαιώθηκαν στο τυρί cottage (pH 4.7) στις σάλτσες για σαλάτα (pH 3,0) που αποθηκεύονται σε θερμοκρασίες ψυγείου (Gahan et al. 1996). Οι Skandamis et al. (2008) κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι οι συνδυασμοί των υποθανατηφόρων εμποδίων μπορεί να επηρεάσει την *L. monocytogenes* στην αντοχή της θερμότητας, ειδικά σε όξινο περιβάλλον με ήπια θέρμανση ή σε συνθήκες χαμηλής υγρασίας.

Η *L. monocytogenes* έχει την ικανότητα να πολλαπλασιάζεται σε τιμές a_w τόσο χαμηλές όσο 0,90 έως 0,92 (Nolan et al. 1992). Μολονότι η *L. monocytogenes* δεν πολλαπλασιάζεται σε $a_w < 0.90$, μπορεί να επιβιώσει σε τέτοια περιβάλλοντα για μεγάλες χρονικές περιόδους. Η *L. monocytogenes* μπορεί να είναι ανθεκτική σε υψηλές συγκεντρώσεις άλατος (23,8% NaCl) και να επιβιώσουν σε άλμη τυριού εμπορίου αποθηκευμένη στους 4 °C για >250 ημέρες (Larson et al. 1999). Η επιβίωση της *L. monocytogenes* σε παρουσία >12% NaCl μειώνεται με αυξανόμενη συγκέντρωση άλατος ή θερμοκρασίας επώασης, για παράδειγμα, παρουσία 16% NaCl ήταν λιστεριοστατική για τουλάχιστον 33 ημέρες στους ≤ 4 °C και παρουσία 26% NaCl μειώθηκε ο πληθυσμός της *Listeria* της 2 και 3,5 logs στους 0°C και 4°C για την ίδια χρονική περίοδο αποθήκευσης (Lado and Yousef. 2007).

Γενικά, τα κύτταρα της *L. monocytogenes* είναι σε θέση να προσαρμόζονται ακόμα και να πολλαπλασιάζονται, παρά την έκθεσή τους σε χαμηλές θερμοκρασίες, χαμηλό pH και υψηλές συγκεντρώσεις NaCl (Schmid et al. 2009). Η συνδυασμένη ή διαδοχική έκθεση των κυττάρων της *L. monocytogenes*, για παράδειγμα, σε NaCl και ψυχρή καταπόνηση σε περιβάλλον τροφίμων θα μπορούσε να προκαλέσει κατά λάθος διασταυρούμενες προστατευτικές αποκρίσεις (Sergelidis and Abraham. 2009). Η θερμική αντίσταση της *L. monocytogenes* κυρίως εξαρτάται από την διακύμανση του στελέχους, σε προηγούμενες συνθήκες ανάπτυξης, στην έκθεση σε θερμότητα, όξινο περιβάλλοντος και άλλες καταπονήσεις (Skandamis et al. 2009). Η θέρμανση της *L. monocytogenes* σε θερμοκρασίες > 56 °C μπορεί να προκαλέσει ριβοσωματική βλάβη, ξεδίπλωμα πρωτεΐνης, μετουσίωση και απενεργοποίηση του ενζύμου (Lado and Yousef. 2007).

Ο χρόνος που απαιτείται για την αδρανοποίηση ενός λογάριθμου ή το 90% του μικροβιακού πληθυσμού σε μια δεδομένη θερμοκρασία (D-value) και η θερμοκρασία που απαιτείται για την θερμική καμπύλη καταστροφής να μετακινηθεί ένα κύκλο log (τιμής z) έχουν χρησιμοποιηθεί για να περιγράψουν την αντοχή στη θερμότητα ενός ορισμένου στελέχους (Heldman and Newsome. 2003). Η θερμική αδρανοποίηση της *L. monocytogenes* σε οποιαδήποτε δεδομένη θερμοκρασία ποικίλει σημαντικά μεταξύ των μελετών και όταν το παθογόνο θερμάνθηκε σε διαφορετικά μέσα (Heldman and Newsome. 2003). Ο Doyle et al. (2001) αξιολόγησαν ένα μεγάλο αριθμό μελετών θερμικής αδρανοποίησης της *L. monocytogenes* σε διάφορα τρόφιμα και μέσα καλλιέργειας, και κατέληξε στο συμπέρασμα ότι τα στοιχεία για την αντοχή στη θερμότητα των διαφορετικών στελεχών δείχνει σημαντική μεταβλητότητα. Στέλεχος της *L. monocytogenes* 4b τείνει να είναι ελαφρώς πιο ανθεκτικό στη θερμότητα από εκείνες του ορότυπου 1/2a (Bunčić et al. 2001). Ωστόσο, οι El-Shenawy et al. (1989) βρήκαν ότι μερικά από τα πιο κοινά στελέχη *L. monocytogenes*

που έχουν μελετηθεί, π.χ. Scott A (ορότυπος 4b), είχαν χαμηλότερη αντοχή σ μόλυνση τη θερμότητα από ό, τι V7 (ορότυπος 1a). (Doyle et al. 2001).

1.9.4 Ορότυποι

Ο προσδιορισμός του ορότυπου έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για την ταυτοποίηση των υποτύπων της *L. monocytogenes*, με βάση αντιγόνα σωματικά (O) και μαστιγίων (H). Τα στελέχη της *L. monocytogenes* σήμερα υποδιαιρούνται σε 13 ορότυπους (1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4aβ, 4b, 4c, 4d, 4e και 7) (Seeliger and Höhne, 1979). Η κλασική ανάλυση ορότυπου της *L. monocytogenes* με τις παραδοσιακές εξετάσεις συγκόλλησης περιορίζεται από το κόστος, τη διαθεσιμότητα και την ανάγκη για τεχνική εμπειρογνομosύνη για την εκτέλεση της δοκιμασίας. Επιπλέον, η αναπαραγωγικότητα της ορότυπου δεν είναι πάντοτε ικανοποιητική (Graves et al. 2007). Η Multiplex PCR δοκιμασία έχει αναπτυχθεί και χρησιμοποιείται ευρέως για το διαχωρισμό των τεσσάρων κύριων ορότυπων της *L. monocytogenes*, που απομονώθηκαν από τρόφιμα και ασθενείς (1/2a, 1/2b, 1/2c, 4b) σε διακριτές ομάδες. Η δοκιμή PCR για τη διαφοροποίηση των ορότυπων της *L. monocytogenes* είναι μια γρήγορη και πρακτική λύση σε σχέση με την επίπονη κλασική μέθοδο ταυτοποίησης του ορότυπου (Doumith et al. 2004b).

Συνολικά, το 95% των περιπτώσεων της ανθρώπινης λιστερίωσης προκαλούνται από στελέχη της *L. monocytogenes* που ανήκουν στους ορότυπους 1/2a, 1/2b και 4b, και επομένως, ο ορότυπος έχει περιορισμένη αξία σε επιδημιολογικές μελέτες (Graves et al. 2007). Ο προσδιορισμός του ορότυπου έχει μικρή διακριτική ισχύ σε σχέση με άλλες μεθόδους υποκατηγοριών. Παρ' όλα αυτά, ο ορότυπος μπορεί να παράσχει πολύτιμες πληροφορίες για την ταχεία εξέταση των ομάδων των στελεχών που απομονώθηκαν κατά τη διάρκεια υπόπτων κρουσμάτων (Graves et al. 2007).

Ο τύπος του βακτηριοφάγου είναι μία από τις συμβατικές μεθόδους ταυτοποίησης του υπότυπου και βασίζεται στην αλληλεπίδραση ενός συγκεκριμένου βακτηριοφάγου με το στέλεχος του ξενιστή, με αποτέλεσμα την λύση των κυττάρων του ξενιστή. Η μέθοδος είναι κατάλληλη για την επεξεργασία ενός μεγάλου αριθμού καλλιιεργειών με μια καλή διακριτική ικανότητα: εντούτοις, όλα τα στελέχη δεν έχουν προσδιορίσιμο ορότυπο, και τα αποτελέσματα δεν αναπαράγονται πάντα (Graves et al 2007). Παρά την υψηλή διακριτική ικανότητα του και την εύκολη εφαρμογή σε μεγάλο αριθμό στελεχών, η λυσιτυπία είναι διαθέσιμη μόνο σε επιλεγμένα διεθνή και εθνικά εργαστήρια αναφοράς λόγω της μεθόδου που χρειάζονται στην συντήρηση των αποθεμάτων των βιολογικά ενεργών στελεχών φάγων και των στελεχών ελέγχου (Graves et al. 2007).

Οι μοριακές μέθοδοι προσδιορισμού των υποτύπων εφαρμόζεται ευρέως για τον χαρακτηρισμό απομονωμένων στελεχών *L. monocytogenes* (Graves et al. 2007). Αυτές οι μέθοδοι βασίζονται σε συγκεκριμένες ειδικές πρωτεΐνες ή γονίδια για ορισμένα είδη, τα οποία περνούν από τη μία γενιά στην άλλη. Η εφαρμογή αυτών των μεθόδων παρέχει πολύτιμες πληροφορίες για την επιβεβαίωση κρουσμάτων της νόσου, και να εντοπίζονται οι

πηγές της μόλυνσης στην τροφική αλυσίδα ή για την παρακολούθηση των στελεχών της επιδημίας καθώς και τις δεξαμενές τους (Gasarov et al. 2005)

1.9.5 Η *Listeria monocytogenes* στα τρόφιμα

Η *L. monocytogenes* έχει βρεθεί σε διάφορα είδη ωμών και επεξεργασμένων τροφίμων, καθώς και σε φυσικά και αστικά περιβάλλοντα (Chen et al. 2009). Δεδομένου ότι η *L. monocytogenes* είναι πανταχού παρούσα, η αρχική μόλυνση μπορεί να εισαχθεί σε διά μέσου των πρώτων υλών και της μεταποίησης τροφίμων, συμπεριλαμβανομένων των ψαριών και τα μεταποιημένα ψάρια (Miettinen et al. 2006), τα σφαγεία, κρέας και μονάδες επεξεργασίας κρέατος (Ramaswamy et al. 2007) το γάλα και τα γαλακτοκομικών προϊόντων (Lyytikäinen et al. 2000). Ο επιπολασμός της *L. monocytogenes* μπορεί να ποικίλλει σε μεγάλο βαθμό στις πρώτες ύλες και τις επεξεργασμένες τροφές, ανάλογα με το προϊόν και το είδος της μελέτης. Μερικοί συγγραφείς απέδειξαν ότι τα προϊόντα που τεμαχίζονται σε φέτες, σε κύβους ή έχουν υποστεί διάφορους χειρισμούς επεξεργασίας διατρέχουν μεγαλύτερο κίνδυνο μόλυνσης με *L. monocytogenes* (Lunden et al. 2002). Η μόλυνση των τελικών προϊόντων πιο συχνά προήλθε από τους χώρους επεξεργασίας ή μετά την επεξεργασία (Greer et al. 2004). Επιπλέον, ο Rørnvik et al. (2000) έδειξαν ότι η μόλυνση με *L. monocytogenes* μπορεί να αυξηθεί κατά μήκος της γραμμής παραγωγής, αυξάνοντας έτσι την επικράτηση της *L. monocytogenes* στα τελικά προϊόντα.

1.9.6 Λιστέρια και δημοσία υγεία

Η ανθρώπινη λιστερίωση είναι μια σχετικά σπάνια αλλά σοβαρή ζωνόσος η οποία μπορεί να είναι απειλητική για τη ζωή για τους ευάλωτους πληθυσμούς, κυρίως σε ηλικιωμένα πρόσωπα, έγκυες γυναίκες και τα άτομα με εξασθενημένο ανοσοποιητικό σύστημα (Norton & Braden, 2007). Μολονότι, περίπου 20% των περιπτώσεων μπορεί να είναι λιστερίωση σε υγιείς ενήλικες, είναι αναγνώρισε ότι δεν προκαλεί σοβαρή ασθένεια (Ramaswamy et al.2007).

Στην Ευρωπαϊκή Ένωση (ΕΕ), ο αριθμός των κρουσμάτων από λιστερίωση αυξήθηκε 19,1% το 2009 σε σύγκριση με το 2008. Το 2009, ο αριθμός των περιπτώσεων από λιστερίωση ήταν 1.645 και παρέμειναν σχεδόν στα ίδια επίπεδα με το 2010, όταν 1.601 περιπτώσεις λιστερίωσης αναφέρθηκαν. Ο αριθμός περιπτώσεων θανάτου στην ΕΕ, λόγω της λιστερίωσης ήταν 270 το 2009 (EFSA, 2011 και 2012). Στις Ηνωμένες Πολιτείες η *L.monocytogenes* αντιπροσωπεύει περίπου το 2.500 περιπτώσεις, 2.289 νοσηλείες, και 449 θανάτους κάθε χρόνο και το ποσοστό θνησιμότητας (περίπου 28%)εξακολουθεί να είναι η μεγαλύτερη όλων των τροφιμογενών παθογόνων (Wesley,I 2009).

Σε χώρες της ΕΕ η *Listeria* είναι σπάνια και ανιχνεύεται μέχρι το όριο ασφάλειας των έτοιμων για κατανάλωση τροφίμων. Ευρήματα πάνω από το νόμιμο όριο ασφαλείας, το οποίο είναι σε περισσότερες περιπτώσεις άνω των 100 CFU / g κατά τη διάρκεια της “ζωής” ενός προϊόντος RTE, έχουν αναφερθεί πιο συχνά από τα αλιευτικά προϊόντα, τυριά

και προϊόντα κρέατος (EFSA, 2011). Δεν υπήρχαν σημαντικές αλλαγές στην εμφάνιση της *L.monocytogenes* στα τρόφιμα το 2010 (EFSA, 2012). Η μολυσματική δόση για λιστερίωση παραμένει ασαφής, αλλά σύμφωνα με επιδημιολογικά δεδομένα υπάρχει η υποψία να είναι υψηλή, και το επίπεδο της μόλυνσης στα τρόφιμα υπεύθυνα για τις περιπτώσεις λιστερίωση είναι συνήθως $> 10^4$ CFU / g (Ooi & Lorber, 2005).

Μόλυνση μπορεί επίσης να προκληθεί από μια παρατεταμένη καθημερινή κατανάλωση μολυσμένων *L. Monocytogenes* τροφές που περιέχουν 10^1 - 10^5 CFU / g αυτών των βακτηρίων (Maijala et al,2001).

Στην Ελλάδα για την περίοδο 1993-1997 αναφέρεται μόνο ένα σποραδικό κρούσμα λιστερίωσης. Σε αντίθεση με την βελτίωση της επιδημιολογικής επιτήρησης είχαμε 7 το 1999 και 6 το 2000. (Schmidt K and Tirado C. (2001.)

1.9.7 Λιστερίωση

Η Λιστερίωση παραμένει μια ασυνήθιστη μόλυνση. Όταν συμβεί παρατηρείται σήψη και μηνιγγίτιδα τα ποσοστά κρουσμάτων της λιστερίωσης είναι 0,7 κρούσματα ανά 100.000 πληθυσμού.(Gellin BG, et al 1991). Η μόλυνση είναι πολύ πιο συχνή σε βρέφη (10 περιπτώσεις ανά 100.000 πληθυσμού) και στους ηλικιωμένους (1,4 περιπτώσεις ανά 100.000 πληθυσμού) και έχει μία επικράτηση στους άνδρες. Τα βρέφη αποκτούν τη μόλυνση με 2 τρόπους.

Οι μητέρες που έχουν μολυνθεί με κύτταρα *L.monocytogenes* στο γαστρεντερικό σωλήνα μετά από την κατανάλωση μολυσμένων τροφίμων μπορεί να αναπτύξουν σηψαιμία με αποτέλεσμα χοριοαμνιονίτιδα και την μεταφορά της σηψαιμίας στο βρέφος ή το έμβρυο. Εναλλακτικά, οι μητέρες που μεταφέρουν *Listeria* στο γαστρεντερικό σωλήνα και την περιπρωκτική περιοχή μπορεί μολύνουν το δέρμα και την αναπνευστική οδό των μωρών τους κατά τη διάρκεια του τοκετού. Τα βρέφη μπορούν να αναπτύξουν βακτηριακή μηνιγγίτιδα έως 2 ή 3 εβδομάδες μετά την έκθεση από τη στιγμή της γέννησης. Στη Βόρεια Αμερική, η *L. monocytogenes* είναι το τρίτο συχνότερο παθογόνο προκαλούν βακτηριακή μηνιγγίτιδα μεταξύ των νεογνών, μετά από την ομάδα *B Streptococcus* και *Escherichia coli*. (Dawson KG, et al 1999)

Μετά τη νεογνική περίοδο, η μηνιγγίτιδα που προκαλείται από *L. monocytogenes* ή σηψαιμία είναι αρκετά σπάνια. Οι παράγοντες του ξενιστή που αυξάνουν τον κίνδυνο λοίμωξης από *Listeria* περιλαμβάνουν την πρόκληση από ανοσοκαταστολή σχετιζόμενη με λοίμωξη HIV, μεταμόσχευση συμπαγών οργάνων, χημειοθεραπεία για συμπαγείς και αιματολογικές κακοήθειες, αιμοχρωμάτωση, σακχαρώδη διαβήτη, κίρρωση και νεφρική ανεπάρκεια με αιμοκάθαρση ή περιτοναϊκή κάθαρση.(Anaissie E, et al 1992) Στην επιδημία, διαφορετικές μορφές της λιστερίωση μπορούν να συμβούν. Ορισμένα κρούσματα έχουν κατά κύριο λόγο ασχολούνται νοσηλεύομενους ασθενείς με τους παράγοντες κινδύνου που αναφέρεται παραπάνω.(Ho JL, et al ,1986)

Νεογνική λοίμωξη. Δύο τύποι της ασθένειας έχουν περιγραφεί. "Πρόωρη έναρξη " της λιστερίωσης αναπτύσσεται από τη μητρική σηψαιμία και χοριοαμνιονίτιδα. Αυτό το είδος

της λιστερίωσης μπορεί να οδηγήσει σε αποβολή, θνησιγένεια, ή πρόωρου τοκετού στα έμβρυα που επλήγησαν. Είναι ενδιαφέρον ότι δίδυμες κυήσεις μπορεί να σχετίζονται με μεγαλύτερο κίνδυνο από ότι οι μονήρεις κυήσεις. Το ποσοστό θνησιμότητας για τα βρέφη που γεννιούνται ζωντανά προσεγγίζει το 20%, και η συχνότητα των αμβλώσεων και της θνησιγένειας αυξάνει τη συνολική θνησιμότητα ποσοστό έως 150%. Ο μικροοργανισμός μπορεί να βρεθεί στο βρέφος στο αίμα και το CSF, στον πλακούντα, καθώς και πάνω στο δέρμα του βρέφους, και η κύρια κλινική εικόνα είναι σοβαρή σηψαιμία με πολυοργανική εμπλοκή. (Evans JR, et al 1985). Από την άλλη, η "όψιμης έναρξης" νεογνική λιστερίωση έχει τα τυπικά χαρακτηριστικά της νεογνικής μηνιγγίτιδας και εμφανίζεται 7-20 ημέρες μετά τον τοκετό. Βρέφη με αυτό το είδος της λιστερίωσης παρουσιάζουν με ευερεθιστότητα και κακή διατροφή και ερεθισμό των μηνίγγων. Μια Gram χρώση και καλλιέργεια του CSF είναι συνήθως θετικά (90% -95% των περιπτώσεων) και συνοδεύεται από μια αυξημένη μέτρηση WBC και του επιπέδου πρωτεΐνης και μία μείωση στην συγκέντρωση της γλυκόζης. Το ποσοστό θνησιμότητας που συνδέεται με αυτή την μορφή της ασθένειας είναι >10%, αλλά μπορεί να υπάρχει υπολειμματική νευρολογική ζημία, όπως και με άλλες μορφές της νεογνικής βακτηριακής μηνιγγίτιδας. (McLauchlin J. et al 1990)

Λοιμώξεις σε ενήλικες. Οι μητέρες που γεννούν τα βρέφη με πρόωμη έναρξη της λιστερίωσης έχουν συχνά μη ειδικά συμπτώματα σοβαρής γρίπης και πυρετό όπως στη γρίπη ή πνευμονοφρίτιδα. Μια καλλιέργεια αίματος πραγματοποιείται πριν από την έναρξη των ωδίνων του τοκετού, που εάν είναι θετικό για *Listeria* παρέχει την ευκαιρία για τη θεραπεία του βρέφους ενδομητρίως, αλλά αυτή η ευκαιρία είναι συχνά χαμένη επειδή οι καλλιέργειες δεν μπορούν να εκτελεστούν ή καθυστερούν τα αποτελέσματα (Linnan JM, et al 1988.)

Οι ενήλικες που είναι σε ανοσοκαταστολή αναπτύσσουν βακτηριακή μηνιγγίτιδα έχοντας μια παρουσία οξεία (75%) ή υποξεία (25%). Αρκετά συνήθως στο (40% -50% των περιπτώσεων), η κλινική παρουσίαση είναι εκείνη της μη ειδικής βακτηριαμίας (Goulet V, et al 1996). Η λιστερίωση μπορεί επίσης παρουσιάσει εστιακή μόλυνση σε μια ευρεία κατηγορία συστημάτων και οργάνων, με ή χωρίς συνοδευτική σήψη. Ένας κατάλογος των κλινικών συνδρόμων που έχουν αποδοθεί σε μόλυνση από *L. monocytogenes*, τουλάχιστον σε ανέκδοτες αναφορές, παρέχεται στον (πίνακα 2). Αν και οι πηγές της μόλυνσης έχουν τεκμηριωθεί για λίγα μόνον από αυτά τα σύνδρομα, είναι πιθανό να είναι τα τρόφιμα και να έχουν αναπτυχθεί μετά την μετατόπιση της *L. monocytogenes* από τη γαστρεντερική οδό.

Πίνακας 1.3.Κλινικά σύνδρομα που περιγράφονται για τη λοίμωξη από *Listeria monocytogenes*.

Νεογνική σηψαιμία και μηνιγγίτιδα, τόσο σε μορφές πρώιμης έναρξης και όψιμης έναρξης.
Βακτηριακή μηνιγγίτιδα σε ενήλικες.
Σύνδρομο σηψαιμίας σε ενήλικες
Ενδοκαρδίτιδα εγγενής ή προσθετικής βαλβίδας
Αρτηριακή λοίμωξη
Πνευμονία
Ηπατίτιδα
Απόστημα ήπατος
Εμπύρετη γαστρεντερίτιδα
Αυτόματη βακτηριακή περιτονίτιδα
Συνεχής περιπατητική περιτοναϊκή κάθαρση περιτονίτιδα
Οστεομυελίτιδα
Σηπτική αρθρίτιδα
Ρομβοεγκεφαλίτιδα.

1.9.8 Απομόνωση Λιστέριας

Μέχρι τώρα, ο ψυχρός εμπλουτισμός, εκλεκτικός εμπλουτισμός, άμεση επίστρωση και αρκετές ταχείες μέθοδοι έχουν χρησιμοποιηθεί σε διάφορους συνδυασμούς για την ανίχνευση *L. monocytogenes* σε τρόφιμα και σε κλινικά ή περιβαλλοντικά δείγματα (Donnelly and Nyachuba 2007). Οι τρέχουσες μέθοδοι απομόνωσης *L. monocytogenes* με βάση λιγότερο χρονοβόρες διαδικασίες, περιλαμβάνουν εκλεκτικό εμπλουτισμό και εκλεκτική επίστρωση. Πρότυπες μέθοδοι για την ανίχνευση και την καταμέτρηση της *L. monocytogenes* εκδίδονται από το FDA, ISO και IDF χρησιμοποιούνται ευρέως από τα εργαστήρια τροφίμων και περιβάλλοντος σε όλο τον κόσμο (Allerberger 2003). Από το 1950 το τελλουρικό κάλιο, το χλωριούχο λίθιο, το ναλιδιζικό οξύ, η ακριφλαβίνη, η πολυμυξίνη Β, η μοξαλακτάμη και η κεφταζιδίμη υπήρξαν οι πιο αναγνωρισμένοι παράγοντες για την εκλεκτική απομόνωση του είδους *Listeria* (Donnelly and Nyachuba 2007). Επιπλέον, το αίμα ή το χρωμογόνο μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εκλεκτικοί παράγοντες ή υποστρώματα δείκτη για την διαφοροποίηση *Listeria spp.* (Greenwood et al. 2005).

Σύγχρονες συμβατικές μέθοδοι απομόνωσης περιλαμβάνουν το ένα ή δύο-σταδίων εκλεκτικού εμπλουτισμού, και ακολουθεί από άπλωμα επί εκλεκτικών μέσων επίστρωσης και επώαση στους 30 ° C ή 37 ° C για 1-2 ημέρες (Anonymous, 1996a). Οι ποσοτικές και ημι-ποσοτικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την καταμέτρηση της *L. monocytogenes* σε τρόφιμα, περιλαμβάνει 1 ώρα αναζωογόνηση μέσα σε ρυθμιστικό διάλυμα και επιφανειακή επικάλυψη στα εκλεκτικά τρυβλία με άγαρ (Anonymous, 1996b,).

Η ταυτοποίηση και η επιβεβαίωση της *L. monocytogenes* περιλαμβάνει χρώση Gram, αντίδραση καταλάσης, αντίδραση οξειδάσης, δοκιμασία κινητικότητας στους 25 ° C, τεστ β-αιμόλυση και ζύμωση της ραμνόζης και ξυλόζης (Anonymus, 1996a). Εκτός από τις συμβατικές δοκιμές ταυτοποίησης *Listeria*, εμπορικά κιτ και βιοχημικά κιτ ταυτοποίησης, όπως το API *Listeria* κιτ (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France) BBL Crystal ID system (BBL™ Crystal™ Identification Systems, MD, USA) ή φαινοτυπικό σύστημα μικροσειράς BioLog (Hayward, CA, USA) είναι διαθέσιμες. Επιπλέον, τα συστήματα ταυτοποίησης, συμπεριλαμβανομένων χρωματομετρικό ανιχνευτή DNA, γαλάκτωμα με βάση σφαιρίδια, ανοσολογική δοκιμή πλευρικής ροής, ενζυμική ανοσοπροσοφορική δοκιμασία (ELISA), ενζυμική δοκιμασία ανοσοφθορισμού (ELFA), ανοσομαγνητικό διαχωρισμό (IMS), φθορισμό in situ υβριδισμό (FISH), και η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ταχεία ανίχνευση της *L. monocytogenes* (O'Grady et al. 2009)

1.9.9 Θεραπεία της Λιστερίωσης

Σε δεδομένα in vitro και in vivo κλινικής εμπειρίας δείχνουν ότι ένας συνδυασμός της αμπικιλίνης και μία αμινογλυκοσίδη είναι η προτιμώμενη επεμβατική θεραπεία για την λιστερίωση. Η Ampicillin είναι ένα βακτηριοστατικό για την υποτροπιάζουσα λοίμωξη από *L. monocytogenes*, έχει αναφερθεί ακόμα και με συνδυασμένη θεραπεία. Όλα τα στελέχη της *L. Monocytogenes* είναι ομοιόμορφα ανθεκτικά σε κεφαλοσπορινούχα αντιβιοτικά. Τρίτης γενιάς κεφαλοσπορίνες χρησιμοποιούνται συνήθως στην εμπειρική θεραπεία της βακτηριακής μηνιγγίτιδας, αλλά πρέπει να συνδυάζονται με αμπικιλίνη όταν υπάρχει ύποπτο κρούσμα με μηνιγγίτιδα από λιστέρια ή μηνιγγοεγεφαλίτιδα. (Hof N, Nichterlein et al, 1997)

Βανκομυκίνη σε συνδυασμό με μια αμινογλυκοσίδη έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία ως θεραπεία για τους αλλεργικούς στην πενικιλίνη ασθενείς με λιστερίωση. Μια άλλη θεραπευτική αγωγή με προτεραιότητα στην βιβλιογραφία είναι ο συνδυασμός τριμεθοπρίμη-σουλφαμεθοξαζόλη (TMP-SMZ) και ριφαμπικίνη. Μια γαλλική μελέτη πρότεινε ότι αυτό το σχήμα είναι ανώτερη στην θεραπεία με αμπικιλίνη και αμινογλυκοσίδη, αλλά η υπόδειξη για χρήση αυτού του συνδυασμού ως μια πρώτη επιλογή δεν έχει γίνει ευρέως αποδεκτή. Η σπανιότητα της ασθένειας καθιστά την ανάπτυξη των τυχαιοποιημένων, ελεγχόμενων δοκιμών της θεραπείας ανέφικτη.

Το γενικά αποδεκτό πρότυπο για τη διάρκεια της θεραπείας είναι 3 εβδομάδες. Για έντονα και ανεπανόρθωτα ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς, η δια βίου κατασταλτική θεραπεία μπορεί να είναι αναγκαία για την πρόληψη τυχόν υποτροπών. Η θεραπεία αυτή συνήθως υποστηρίζεται για ασθενείς με προχωρημένη λοίμωξη HIV που αναπτύσσουν μηνιγγίτιδα από λιστέρια. (Merle-Melet M, et al 1996)

1.10 ΕΝΤΕΡΟΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ (*Enterobacteriaceae*)

1.10.1 Γενικά χαρακτηριστικά

Τα εντεροβακτηριακά αποτελούν μια μεγάλη ετερογενή οικογένεια η οποία περιλαμβάνει Gram αρνητικά βακτηρίδια πλάτους 1μm και μήκους 0,6 έως 6,0 μm τα οποία παρουσιάζουν ορισμένα τυπικά χαρακτηριστικά (Abbott S. 2003)

A) δεν σχηματίζουν σπόρους

B) κινούνται με βλεφαρίδες ή είναι ακίνητα

Γ) αναπτύσσονται σε κοινά στερεά και υγρά θρεπτικά υλικά

Δ) αναπτύσσονται αερόβιος και προαιρετικά αναερόβιος

E) ζυμώνουν τη D-γλυκόζη και αλλά σάκχαρα συχνά με παράγωγή οξέος ή οξέος και αερίων

Στ) ανάγουν τα νιτρικά άλατα σε νιτρώδη (με μερικές εξαιρέσεις)

Z) δίνουν θετική την αντίδραση κατάλυσης και αρνητική την αντίδραση της οξειδωσης

H) η περιεκτικότητα του DNA τους σε γουανίνη (G) και κυτοσίνη (C) κυμαίνεται μεταξύ 39-59%.

Τα Εντεροβακτηριακά είναι πολύ διαδεδομένα στη φύση. Βρίσκονται στο περιβάλλον (έδαφος και νερό) και αποτελούν μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας του ανθρώπου και των ζώων (Abbott S. 2003). Ορισμένα είδη έχουν συγκεκριμένη οικολογική φωλιά π.χ. η *Salmonella typhi* που προκαλεί τυφοειδή πυρετό βρίσκεται μόνο στον άνθρωπο. Αντίθετα το είδος *Klebsiella pneumoniae* παρουσιάζει ευρεία εξάπλωση στο περιβάλλον όπου συμμετέχει σε βιοχημικές και γεωχημικές διεργασίες, αλλά παράλληλα, προσβάλλει και τον άνθρωπο στον οποίο μπορεί να προκαλέσει λοιμώξεις (Farmer J.J 2003)

1.10.2 Ταξινόμηση

Τα εντεροβακτηριακά αποτελούν μια οικογένεια μικροβίων ιδιαίτερα ετερογενή. Έχουν περιγραφεί περισσότερα από 30 γένη και 120 είδη (Murray P. R. Et al, 1998)

Η ταξινόμηση τους αρχικά στηρίχτηκε σε βιοχημικά, φαινοτυπικά, λειτουργικά και οντογονικά χαρακτηριστικά και αποτέλεσε πεδίο έντονης αντιπαράθεσης διαφωνιών και σύγχυσης. Με την πρόοδο στον τομέα των τεχνικών αλληλούχισης και υβριδισμού των νουκλεϊκών οξέων, καθώς και της φυλογενετικής ανάλυσης, έγινε δυνατή η καλύτερη ταξινόμηση και ο προσδιορισμός των σχέσεων μεταξύ των διαφόρων μελών της οικογένειας καθώς επίσης και η ανακάλυψη νέων ειδών.

Σύμφωνα με την ταξινόμηση η οποία προτάθηκε από το κέντρο Έλεγχου Λοιμωδών Νοσημάτων (CDC) των ΗΠΑ, τα γένη της οικογένειας των εντεροβακτηριακών είναι τα ακόλουθα:

Budvicia, *Buttiauxella*, *Cedecea*, *Citrobacter*, *Edwardsiella*, *Enterobacter*, *Esherichia*, *Shigella*, *Ewingella*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Kluuyvera*, *Leclercia*, *Leminorella*, *Moellerella*,

Morganella, *Obesumbacterium*, *Pragia*, *Pantoea*, *Photorhabdus*, *Plesiomonas*, *Proteus*, *Providencia*, *Rahnella*, *Salmonella*, *Serratia*, *Tatumella*, *Trabulsiella*, *Xenorhabdus*, *Yersinia*, *Yokenella*(*Koserella*), Enteric Group 58,59,60,63,64,68,69,137. Κάθε γένος υποδιαιρείται σε είδη και υποείδη, των οποίων ο αριθμός είναι δύσκολο να προσδιοριστεί, δεδομένης της συνεχούς ανακάλυψης νέων ειδών και στελεχών. Επίσης λόγω του μεγάλου αριθμού και της ποικιλίας των Εντεροβακτηριακών είναι αναγκαίο να διακρίνονται τα βακτηρίδια της οικογένειας αυτής σε δυο ομάδες. Η πρώτη ομάδα περιλαμβάνει γένη και είδη που αποικίζουν το γαστρεντερικό σωλήνα του ανθρώπου ή είδη που σχετίζονται με την πρόκληση λοιμώξεων στον άνθρωπο. Η δεύτερη ομάδα περιλαμβάνει γένη που δύναται να αποικίζουν τον άνθρωπο αλλά σπανίως προκαλούν λοιμώξεις σ αυτόν. Συνηθεστέρα χαρακτηρίζονται ως αποικιστές του περιβάλλοντος και των ζώων (Bailey & Scott, 2002). Πληθώρα νέων ειδών περιγράφονται συνεχώς από ερευνητές. Η *Buttiauxella noackiae* και η *Kluyvera Georgiana* αποτελούν δυο νέα είδη με κλινική σημασία για τον άνθρωπο (Müller H. E. Et al 1996) . Η *Plesiomonas shigelloides* αποτελεί επίσης νέο είδος αφού η αλληλούχηση του rRNA έδειξε μεγάλη γενετική συγγένεια με τον *Proteus vulgaris* (Martinez-Murcia A. J et al, 1992). Επίσης πρέπει να σημειωθεί ότι η περιγραφή νέων ειδών, ο επαναπροσδιορισμός των φυλογενετικών σχέσεων με τη χρήση των νέων τεχνικών μοριακής βιολογίας και η συσσώρευση νέων δεδομένων οδηγεί αναπόφευκτα σε αλλαγές στην ταξινόμηση των εντεροβακτηριακών.

Γένη και είδη της Οικογένειας των Εντεροβακτηριακών που αποικίζουν τον άνθρωπο ή σχετίζονται με λοιμώξεις που προκαλούν σ' αυτόν.

<i>Citrobacter</i>	<i>Enterobacter sakazaki</i>	<i>Morganella</i>	<i>Serratia marcescens</i>
<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Enterobacter amnigenes</i>	<i>Morganella morganii</i>	<i>Serratia liquefaciens</i>
<i>Citrobacter (diversus) koseri</i>	<i>Enterobacter taylorae (cancerogenous)</i>	<i>Proteus</i>	<i>Shigella</i>
<i>Citrobacter amanolaticus</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Shigella dysenteriae</i>
<i>Edwardsiella</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Shigella flexneri</i>
<i>Edwardsiella tarda</i>	<i>Hafnia</i>	<i>Proteus penneri</i>	<i>Shigella boydii</i>
<i>Enterobacter</i>	<i>Hafnia alvei</i>	<i>Providencia rettgeri</i>	<i>Shigella sonnei</i>
<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Providencia stuartii</i>	<i>Yersinia</i>
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Klebsiella pneumonia</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Yersinia pestis</i>
<i>Enterobacter agglomerans gp</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Salmonella spp</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>
<i>Enterobacter gergoviae</i>	<i>Klebsiella ozaenae</i>	<i>Serratia</i>	<i>Yersinia intermedia</i>

Γένη και είδη της Οικογένειας των Εντεροβακτηριακών που δεν σχετίζονται με λοιμώξεις του ανθρώπου.

Budvicia	Escherichia	Proteus
<i>Budvicia aquatic</i>	<i>Escherichia fergusonii</i>	<i>Proteus hauseri</i>
Buttiauxella	<i>Escherichia hermannii</i>	Providencia
<i>Buttiauxella agresti</i>	<i>Escherichia vulnerii</i>	<i>Providencia alcalifaciens</i>
<i>Buttiauxella noackia</i>	Ewingella	<i>Providencia rustigianii</i>
Cedecea	<i>Ewingella Americana</i>	Rahnella
<i>Cedecea davisae</i>	Klebsiella	<i>Rahnella aquatilis</i>
<i>Cedecea lapagei</i>	<i>Klebsiella ornithinolytica</i>	Serratia
<i>Cedecea neteri</i>	<i>Klebsiella planticola</i>	<i>Serratia rubidaea</i>
Citrobacter	<i>Klebsiella rhinoscleromatis</i>	<i>Serratia odorifera</i>
<i>Citrobacter braaki</i>	Kluyvera	<i>Serratia plymuthica</i>
<i>Citrobacter farmer</i>	<i>Kluyvera ascorbata</i>	<i>Serratia ficaria</i>
<i>Citrobacter gilleni</i>	<i>Kluyvera cryocrescens</i>	Tatumella
<i>Citrobacter murlinaei</i>	<i>Kluyvera Georgiana</i>	<i>Tatumella pytseos</i>
<i>Citrobacter sedlakii</i>	Leclercia	Trabulsilla
<i>Citrobacter werkmanii</i>	<i>Leclercia adecarboxylata</i>	<i>Trabulsiella guamensis</i>
<i>Citrobacter youngae</i>	Leminorella	Yersinia
Edwardsiella	<i>Leminorella grimontii</i>	<i>Yersinia kristensenii</i>
<i>Edwardsiella hoshinae</i>	<i>Leminorella richardii</i>	<i>Yersinia rohdei</i>
Enterobacter	Moellerella	<i>Yersinia bercovieri</i>
<i>Enterobacter asburiae</i>	Moellerella wisconsensis	<i>Yersinia mollaretii</i>
<i>Enterobacter hormaechei</i>	<i>Morganella morganii subsp. Sibonii</i>	Yokenella
<i>Enterobacter intermedium</i>	<i>Photorhabdus</i>	<i>Yokenella regensburgei</i>
<i>Enterobacter kobei</i>	<i>Photorhabdus spp</i>	
Erwinia	Pragia	
<i>Erwinia spp.</i>	<i>Pragia fontium</i>	

1.10.3 Ταυτοποίηση

Η ταυτοποίηση των εντεροβακτηριακών με βάση τις βιοχημικές τους ιδιότητες (σακχαροδιασπαστικές και ενζυμικές-βιολογικές) γίνεται με ορισμένες βιοχημικές δοκιμασίες. Οι σπουδαιότερες από αυτές είναι οι εξής:

A) Η δοκιμασία διάσπασης της λακτόζης – η οποία αναγνωρίζεται εύκολα κατά την ανάπτυξη σε θρεπτικά υλικά τα οποία περιέχουν λακτόζη και δείκτη. Έτσι γίνεται μια αδρή διάκριση των εντεροβακτηριακών σε γένη που ζυμώνουν τη λακτόζη (*Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*) και γένη που δε ζυμώνουν τη λακτόζη (*Salmonella*, *Shigella*, *Citrobacter*, *Edwardsiella*, *Serratia*, *Proteus-Providencia*). (Αρσένη Α. 1994)

B) Η δοκιμασία παραγωγής της ινδόλης. Κατά την ανάπτυξη ορισμένων ειδών Εντεροβακτηριακών παράγεται το ενζυμο τρυπτοφανάση το οποίο διασπά το αμινοξύ

τρυπτοφάνη που υπάρχει πλούσιο στην πεπτόνη του θρεπτικού υλικού σε ινδόλη. Η παραγωγή της ινδόλης ανιχνεύεται με το αντιδραστήριο Kovacs .

Γ) Η δόκιμη διάσπασης της ουρίας από Εντεροβακτηριακά που παράγουν ουρεάση.

Δ) Η δοκιμασία παραγωγής υδρόθειου από εντεροβακτηριακά που διασπούν αμινοξέα που περιέχουν θείο.

Στ) Η δοκιμασία διάσπασης διαφόρων σακχάρων (γλυκόζη, αδονιτόλη, αραβινόλη, δουλσιτόλη, εσκουλίνη, ινοσιτόλη, μαλτόζη, μαννιτόλη, σαλικίνη, σορβιτόλη, σουκρόζη, τρεχαλόζη, ξυλόζη) με την παραγωγή οξέος και αερίου σε πεπτονούχα υλικά.

Ζ) Δοκιμασία παραγωγής ONPG (β-γαλακτοσιδάσης). Η ONPG έχει δομή παρόμοια με τη δομή της λακτόζης. Διασπάται υπό την επίδραση της β-γαλακτοσιδάσης προς γαλακτόζη και ορθο-νιτροφαινόλη.

Η) Δοκιμασία αναγωγής νιτρικών (NO₃) σε νιτρώδη (NO₂). (Παπαπαναγιώτου Ι, et al ,2001)

Υπάρχουν διάφορες προσεγγίσεις για την ταυτοποίηση των εντεροβακτηριακών. Εκτός από τις κλασσικές βιοχημικές διαδικασίες με τη μέθοδο των σωληνάρων οι οποίες ακόμα χρησιμοποιούνται σε εργαστήρια αναφοράς, σήμερα προτιμούνται "manual" συστήματα με τυποποιημένα αντιδραστήρια του εμπορίου (API 20E, CRYSTAL, ENTEROTUBE κ.α)

Το API 20E είναι ένα αυτόνομο μικροσύστημα των συμβατικών βιοχημικών διαδικασιών ταυτοποίησης των εντεροβακτηριακών. Η Ταυτοποίηση γίνεται με την μετατροπή του αποτελέσματος της αντίδρασης σε αριθμητικό προφίλ το οποίο στη συνέχεια ερμηνεύεται βάσει ειδικού καταλόγου.(Waites KB et al, 2002)

Ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο παίζει η μοριακή τεχνική PCR η οποία βοηθά σημαντικά στην γρηγορότερη μικροβιακή ταυτοποίηση (ακόμα κ χωρίς τη χρήση καλλιέργειας) και αφετέρου στην διερεύνηση και στην επιδημιολογία της αντοχής των παθογόνων μικροοργανισμών.

Η PCR ή polymerase chain reaction είναι η αλυσιδωτή αντίδραση του ενζύμου DNA πολυμεράση που χρησιμοποιείται για την ποσοτική μεγέθυνση ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA. Επιλέγεται ένα τμήμα DNA που συνήθως περιέχει μια γονιδιακή περιοχή, και αυτό αποτελεί το στόχο DNA το οποίο με πολλαπλές αντιγραφές πολλαπλασιάζεται. Ως άλυστοι αφετηρίες (εκκινήτες) χρησιμοποιούνται δυο συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια που έχουν δομή συμπληρωματική προς τις πλευρικές αλληλουχίες του DNA στόχου, το κάθε ένα αντίστοιχα προς τον ένα κλώνο του στόχου και με αντίθετη κατεύθυνση. Τρία στάδια, η μετουσίωση, η σύνδεση ή υβριδισμός των αφετηριών και η επέκταση των αφετηριών με τη σύνθεση καινούριου κλώνου DNA, αποτελούν ένα κύκλο της αντίδρασης PCR ο οποίος εκτελείται σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες. Με επαναλαμβανόμενους κύκλους αυξάνει εκθετικά (8,16,64) ο αριθμός των αντιγράφων στόχου DNA, διότι οι κλώνοι που σχηματίζονται χρησιμοποιούνται ως πρότυπο στον επόμενο κύκλο. Έτσι επιτυγχάνεται πολλαπλασιασμός 2ⁿ (n=ο αριθμός των κύκλων με την αντίδραση PCR(Βαβάτση-Χριστάκη Ν. 1998)

Πίνακας 1.4: Βιοχημικές ιδιότητες των κυριότερων Εντεροβακτηριακών.

ΓΕΝΟΣ/ ΕΙΔΟΣ	E.coli	Klebsiella	Enterobacter cloacae	Serratia marcescens	Providencia			Proteus			Salmonella	Morganella morgani	Shiglla	Citrobacter freundii
					Alcal	Stuart	Regeri	Mirabilis	Vulgari	Peneri				
ΔΙΑΣΠΑΣΗ ΓΛΥΚΟΖΗΣ	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΕΡΙΟΥ	+	+	+	+/-	+/-	-	+	+	+	+	+	-	+	
ΔΙΑΣΠΑΣΗ ΛΑΚΤΟΖΗΣ	+	+	+	Βραδέως	-	-	-	-	-	-	-	-	Βραδέως	
ONPG	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	sonci+	
ΚΙΝΗΤΙΚΟΤΗΤΑ	+/-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	
ΥΔΡΟΛΥΣΗ ΟΥΡΙΑΣ	+	+	-	-	-	-/+	-	+	+	+	-	+	-	
CITRATE	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	
ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΙΝΔΟΛΗΣ	+	Oxytoca+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-ή+	
H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	
PPA Phe	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	
VP	-	+	+	+	-	-	-	+ή-	-	-	+	-	-	
Arginine	D	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+ή-	-	-	
Lysine	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	
Ornithine	D	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-sonci+	
ΟΞΕΙΔΑΣΗ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
DNAση	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
ΝΙΤΡΙΚΑ	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

ONPG: ο-νιτρο-φαινυλ-β-γαλακτοπυρανοσιδη, PPA Phe: απαμινωση της φαινυλαλανινης VP: voges Proskauer, DNAση : δοκιμή δεοξυριβονουκλεασης

1.10.4 Αντιγονική σύσταση

Πολλές από τις χημικές ουσίες του κυτταρικού τοιχώματος, της κάψας και των βλεφαρίδων των εντεροβακτηριακών έχουν αντιγονικές ιδιότητες. Οι κυριότερες ομάδες αντιγόνων είναι οι εξής:

1) **Αντιγόνα σωματικά ή αντιγόνα-O.** Είναι ένα μεταβαλλόμενο πολυσακχαριδικό τμήμα του λιποσακχαρίτη του κυτταρικού τοιχώματος (Αρσένη Α, 1994). Είναι ανθεκτικό στην θερμότητα. Το αντιγόνο-O είναι ειδικό για κάθε είδος. (Eisenstein B. I, et al, 2000)

2) **Αντιγόνα βλεφαρίδων ή αντιγόνα-H.** Είναι θερμοευαίσθητα πρωτεϊνικά μόρια που αποτελούν δομικά συστατικά των βλεφαρίδων (Eisenstein B.I, et al, 2000). Σε μικροοργανισμούς που φέρουν βλεφαρίδες, τα αντιγόνα-H επικρατούν έναντι των αντιγόνων-O και, μάλιστα οι αντιδράσεις συγκόλλησης μέσω των αντιγόνων-H είναι πολύ πιο γρήγορες και έντονες από αυτές των αντιγόνων-O (Eisenstein B. I, et al, 2000). Επειδή συχνά οι ξενιστές παράγουν αντισώματα ειδικά για τα αντιγόνα -H, τα οποία αντισώματα ακινητοποιούν τα βακτήρια και κατ' επέκταση εμποδίζουν τη λοιμογόνο δράση τους, τα εντεροβακτηριακά διαθέτουν μηχανισμούς ελεγχού και αλλαγής έκφρασης των αντιγόνων-H ώστε να αποφεύγουν την επίπτωση της πρόσδεσης των ειδικών αντι-αντιγόνων-H αντισωμάτων (Eisenstein B. I, et al, 2000)

3) **Αντιγόνα ελύτρου ή αντιγόνα-K.** Είναι θερμοευαίσθητα πολυσακχαριδικά ή πρωτεϊνικά μόρια, συστατικά του ελύτρου. Συχνά παρεμποδίζουν την ανίχνευση των αντιγόνων-O, αλλά αυτό μπορεί να αποφευχθεί με βρασμό του μικροοργανισμού που έχει ως αποτέλεσμα την καταστροφή και απομάκρυνση του αντιγόνου-K. (Αρσένη Α, *Enterobacteriaceae II*, 1994)

Shigella. Οι σιγκέλλες δεν διαθέτουν βλεφαριδικά αντιγόνα-H. Το σωματικό τους αντιγόνο παρουσιάζει ισχυρή αντιγονικότητα και πολλές διαφορές μεταξύ των διαφόρων υποομάδων. Η μεγάλη πλειοψηφία των αντιγόνων-O μοιάζει με σωματικά αντιγόνα της *E.coli* (Αρσένη Α. *Enterobacteriaceae III*, 1994)

Salmonella. Το γένος *Salmonella* περιλαμβάνει μια τεράστια ποικιλία από αντιγόνα-O και H . Έχουν περιγράψει περισσότεροι από 2.000 ορολογικοί τύποι σαλμονέλων. Η κάθε σαλμονέλλα φέρει περισσότερα από ένα θερμοανθεκτικά αντιγόνα-O. Με βάση το συνδυασμό αντιγόνων-O που φέρουν οι σαλμονέλλες κατατάσσονται σε διαφορές ομάδες. Κατά τη διατήρηση της *Salmonella* σε υγρό θρεπτικό υλικό, το στέλεχος μεταπίπτει από την φάση S (smooth) στην R (rough) φάση οπότε μέρος του σωματικού αντιγόνου μπορεί να χαθεί (Λεοναρδόπουλος Ι. 1999) Όσον αφορά στα βλεφαριδικά αντιγόνα του γένους *Salmonella*, αυτά παράγονται τόσο από κινητά όσο και από μη κινητά στελέχη. Επίσης, οι σαλμονέλλες παράγουν 2 ειδών αντιγόνα-H : α) 1^{ns} φάσης ή ειδικά και β) αντιγόνα-H 2^{ns} φάσης ή μη ειδικά. Επιπλέον μερικά είδη *Salmonella*, όπως *S.typhi*, *S.paratyphi* και *S.dublin* φέρουν κι ένα ακόμη αντιγόνο περιβλήματος, το αντιγόνο Vi (Αρσένη Α.*Enterobacteriaceae III*, 1994).

1.10.5 Επιδημιολογία εντεροβακτηριακών

Τα εντεροβακτήρια βρίσκονται τόσο στο έδαφος και στα φυτά όσο και στον γαστρεντερικό σωλήνα ανθρώπων και ζώων (Αρσένη Α.*Enterobacteriaceae I*, 1994). Ορισμένα είδη πχ *Escherichia coli*, αποτελούν τμήμα της φυσιολογικής χλωρίδας του εντέρου του ανθρώπου (David M.Rollins. 2000). Τα είδη αυτά μπορούν να αποτελέσουν αίτιο λοίμωξης εάν μεταφερθούν και αποικίσουν σε κάποια άλλη περιοχή του σώματος π.χ το ουρογεννητικό σύστημα (Eisenstein B. I. Et al 2000). Αυτό συμβαίνει συνήθως σε νοσηλευόμενους ή ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς και μπορεί να οδηγήσει σε πνευμονία, σηψαιμία, μηνιγγίτιδα. Η *Escherichia coli* είναι ο κύριος παράγοντας λοιμώξεων του ουροποιητικού

σωλήνα. Άλλα είδη όπως π.χ. *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia enterocolitica*, εντοπίζονται στον άνθρωπο μόνο σε περίπτωση μόλυνσης, συνήθως μέσω μολυσμένου νερού ή τροφής, ενώ το είδος *Yersinia pestis* είναι το μοναδικό Εντεροβακτηριακό που μεταδίδεται από μολυσμένο ζώο μέσω δήγματος από έντομο (Αρσένη Α. *Enterobacteriaceae I*, 1994). Τα Εντεροβακτηριακά αναλογούν στο 80% των σημαντικών κλινικών στελεχών Gram-αρνητικών βακτηρίων που απομονώνονται στα κλινικά εργαστήρια. Σύμφωνα με εκτιμήσεις, τα εντεροβακτηριακά ευθύνονται για το 1/3 των περιπτώσεων σηψαιμίας, τα 2/3 των περιπτώσεων γαστρεντερίτιδας βακτηριακής προέλευσης και τα 3/4 των λοιμώξεων του ουροποιητικού σωλήνα (Eisenstein B. I. Et al 2000).

Οι σαλμονέλλες απαντούνται τόσο στο περιβάλλον όσο και στα ζώα. Έχουν απομονωθεί από πουλερικά, ερπετά, αιγοπρόβατα, βοοειδή, τρωκτικά, κατοικίδια ζώα, πουλιά και από τον άνθρωπο. Είναι παγκοσμίως το συχνότερο αίτιο τροφιμογενών λοιμώξεων. Από επιδημιολογικής άποψης οι σαλμονέλλες μπορούν να διακριθούν σε 3 ομάδες α) αυτές που βρίσκονται στον άνθρωπο, β) αυτές που βρίσκονται στα ζώα και γ) αυτές που βρίσκονται και στον άνθρωπο και στα ζώα. Πριν από μερικά χρόνια παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση των σαλμονελλώσεων με τη μορφή πανδημίας. Η αύξηση αυτή παρατηρήθηκε από το 1986 έως το 1995 σχεδόν σε όλες τις χώρες του κόσμου και οφείλονταν κυρίως στην αύξηση της *S. enteritidis* PT4 (90-95% των στελεχών) που αποδόθηκε κυρίως στα κοτόπουλα, στα αυγά και στη διασπορά των σαλμονέλων σε διάφορα είδη τροφίμων. Στην Ελλάδα η αύξηση των σαλμονελλώσεων παρατηρήθηκε από το 1987 έως το 1994, με κύριο ορότυπο την *S. Enteritidis*. Από το 1995 άρχισε να παρατηρείται σταδιακή ελάττωση. Δεύτερος σε συχνότητα ορότυπος ήταν η *S. typhimurium*. Από το 1998 παρατηρείται μικρή αύξηση της *S. typhimurium*, ιδιαίτερα του τύπου DT104.

Οι σιγκέλλες είναι παθογόνα μικρόβια μόνο για τον άνθρωπο. Η κύρια νόσος που προκαλούν οι σιγκέλλες είναι μικροβιακή δυσεντερία όταν ληφθούν σιγκέλλες από το στόμα, αλλά νοσούν κατά την ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση της ενδοτοξίνης της σιγκέλλας. Ο άνθρωπος μολύνεται από κόπρανα άλλου ανθρώπου που πάσχει από σιγκέλλωση ή από φορέα που αποβάλλει σιγκέλλα με τα κόπρανα. Η μετάδοση μπορεί να γίνει με οποιονδήποτε τρόπο άμεσης ή έμμεσης επαφής με τα κόπρανα αυτά. Η εντερίτιδα από τη *S. sonnei* είναι συχνή στην Ευρώπη και καμία χώρα δεν έχει πετύχει ακόμα την εκρίζωση της παρ' όλα τα μετρά που λαμβάνονται (Αρσένη Α. *Enterobacteriaceae III*, 1994). Εμφανίζεται με τη μορφή τριτογενών επιδημιών σε κοινοβιούντες πληθυσμούς οικοτροφείων, ψυχιατρείων και άλλων ιδρυμάτων και σπάνια σαν σποραδικά κρούσματα. Στις ΗΠΑ ο αριθμός των σιγκελλώσεων που δηλώνονται στις Δημόσιες Υγειονομικές υπηρεσίες κατ' έτος κυμαίνεται γύρω στους 22.000. Τα τελευταία χρόνια οι περιπτώσεις σιγκελλώσεων στην Ελλάδα παρουσιάζουν σημαντική ελάττωση. Στη χώρα μας, οι μισές από τις σιγκέλλες που απομονώνονται από ασθενείς σε νοσοκομεία για εντερική νόσο είναι *S. sonnei* και οι άλλες μισές *S. Flexneri*. (Murray P. R., et al, 1998)

1.10.6 Απομόνωση –καλλιεργητικές τεχνικές

Τα εντεροβακτηριακά μπορεί να απομονωθούν από κλινικά, τροφικά, φαρμακευτικά αλλά και άλλα δείγματα. Τα περισσότερα εντεροβακτηριακά αναπτύσσονται πολύ καλά σε κοινά θρεπτικά υλικά όπως το θρεπτικό, το αξιωματούχο και το σοκολατόχρωμο άγαρ και σε

μεγάλο εύρος θερμοκρασιών (10-42°C) με ευνοϊκότερη θερμοκρασία τους 35-37°C. Το διαφοροποιητικό υλικό που χρησιμοποιείται συχνότερα για την απομόνωση των εντεροβακτηριακών είναι το MacConkey άγαρ. Το Mac Conkey άγαρ περιέχει ως βάση την πεπτόνη, ως δείκτη ουδέτερο του ερυθρού, άλατα χολής, λακτόζη και κρυσταλλικό ιώδες για την παρεμπόδιση της ανάπτυξης των Gram- θετικών βακτηρίων και των μυκήτων. Στην περίπτωση που κάποιο εντεροβακτηριακό ζυμώνει τη λακτόζη, πέφτει το pH του θρεπτικού υλικού με αποτέλεσμα η αποικία του μικροβίου να παίρνει κόκκινο-ροζ χρώμα. (Bailey & Scott, 2002) Το XLD άγαρ χρησιμοποιείται για την διάκριση των σαμονέλλων και των σιγκέλλων. Περιέχει ξυλόζη, L-λυσίνη, λακτόζη, σουκρόζη, δεοξυχολικό νάτριο, κιτρικό αμμώνιο σιδήρου και ως δείκτη ερυθρό της φαινόλης. Το S-S άγαρ είναι εκλεκτικό υλικό που εμποδίζει την ανάπτυξη των εσερίχιων αλλά επιτρέπει την ανάπτυξη των σαλμονέλλων και σιγκέλλων. Περιέχει πεπτόνη, λακτόζη, χολικά άλατα, κιτρικό νάτριο, θειοθειικό νάτριο, κιτρικό σίδηρο, στίλβον πράσινο και ως δείκτη ουδέτερο ερυθρό. Το θειοθειικό νάτριο αποτελεί πηγή θείου και χρησιμοποιείται από τα βακτήρια που παράγουν H₂S και δίνει μαύρο χρώμα στις αποικίες αυτών. Ο ζυμός σεληνίτη ενώ είναι τοξικός για τα περισσότερα εντεροβακτηρικά ευνοεί την ανάπτυξη *Salmonella spp.*

Για την απομόνωση της σαλμονέλλας χρησιμοποιείται υψηλής εκλεκτικότητας θρεπτικό υλικό όπως το brilliant green άγαρ ή το bismuth sulfite άγαρ. Το brilliant green άγαρ εμποδίζει την ανάπτυξη των περισσότερων Gram θετικών και Gram αρνητικών συμπεριλαμβανομένης της σιγκέλλας και σαλμονέλλας του τύφου, ενώ αναπτύσσονται όλες οι υπόλοιπες σαλμονέλλες. Και τέλος το CHROMagar Orientation χρωμογόνο άγαρ με το οποίο μπορεί να γίνει αδρή ταυτοποίηση βασισμένη στο χρώμα που παίρνουν οι αποικίες των βακτηρίων όταν αυτά αναπτυσσόμενα αντιδρούν ενζυματικά με χρωμογόνα συστατικά του υλικού, η θρεπτική βάση του CHROMagar είναι πεπτόνη και γλυκόζη ενώ διάφορα άλλα μίγματα χρωμογόνων και αντιβιοτικά συντελούν στην εύκολη ταυτοποίηση ιδιαίτερα του *E.coli* O157:H7. (Farmer J.J, 2003)

1.10.7 Κλινική σημασία–παθογόνος δράση των Εντεροβακτηριακών

Η οικογένεια των εντεροβακτηριακών περιλαμβάνει έναν σημαντικό αριθμό παθογόνων ειδών, που είναι αίτια διαφόρων λοιμώξεων στον άνθρωπο (Bailey & Scott, 2002). Τα είδη αυτά μπορούν να διακριθούν στα ευκαιριακά παθογόνα και στα παθογόνα. Στην κατηγορία των παθογόνων ανήκουν τα Εντεροβακτηριακά *Salmonella typhi*, *Shigella spp.* και *Yersinia pestis*, που προκαλούν τυφοειδή πυρετό, δυσεντερία και βουβωνική πανώλη, αντίστοιχα (Bailey & Scott, 2002). Στα ευκαιριακά παθογόνα ανήκουν τα *Citrobacter spp.*, *Enterobacter spp.*, *Klebsiella spp.*, *Proteus spp.*, *Serratia spp.*, τα οποία σε υγιή άτομα δε προκαλούν νόσο. Παρότι πρόκειται για ευκαιριακά παθογόνα η λοιμογόνος δράση τους μπορεί να προκαλέσει σοβαρές λοιμώξεις σε ανοσοκατεσταλμένα άτομα.

Salmonella spp. Είναι το συχνότερο αίτιο τροφιμογενών λοιμώξεων. Οι Σαλμονέλλες προκαλούν δυο ειδών νόσους α) εντερικές σαλμονελλώσεις και β) εξωεντερικές σαλμονελλώσεις (Παπαπαναγιώτου Ι, 2001).

Στην πρώτη κατηγορία περιλαμβάνονται ο τυφοειδής πυρετός και οι παράτυφοι που είναι γνωστοί με το όνομα εντερικός πυρετός, η εντερίτιδα, η γαστρεντερίτιδα και η τροφική δηλητηρίαση ή εντεροτοξινική εντερίτιδα.

Ο τυφοειδής πυρετός προκαλείται από τη *S. typhi*, οι δε παράτυφοι αντίστοιχα από σαλμονέλλες του παράτυφου B, A, και C. (Αρσένη Α. *Enterobacteriaceae III*, 1994). Στον τυφοειδή και στους παράτυφους η σαλμονέλλα κυκλοφορεί στο αίμα και ανιχνεύεται με την αιμοκαλλιέργεια κατά την πρώτη εβδομάδα της νόσου. Στο τέλος της 2^{ης} εβδομάδας της νόσου εγκαθίσταται στο έντερο και αποβάλλεται με τα κόπρανα. Το 50% των νοσήσαντων παραμένουν εντερικοί φορείς για 4 εβδομάδες, το 30% για 3 μήνες και ένα μικρό ποσοστό περίπου 3% για 6 μήνες και πλέον.

Η εντερίτιδα από σαλμονέλλες είναι νόσος εντερική χωρίς μικροβαιμία (Λεοναρδόπουλος I, 1999). Ο χρόνος επώασης είναι μικρός, λίγες ημέρες, τα συμπτώματα ελαφρά άλλα σε βρέφη μπορεί να προκαλέσει σοβαρές ηλεκτρολυτικές διαταραχές και αφυδάτωση.

Η γαστρεντερίτιδα από σαλμονέλλες είναι συχνή στους ασθενείς με AIDS, η ευαισθησία των οποίων στις σαλμονέλλες αποδίδεται στο σημαντικό ρόλο που διαδραματίζει η κυτταρική ανοσία στην αντιμετώπιση της νόσου. Σε αυτούς τους ασθενείς η νόσος συχνά είναι σοβαρή και χαρακτηρίζεται από άτυπη εμφάνιση, διασπορά της λοίμωξης, μικροβαιμία και υπότροπη. Κατά τη διάρκεια της νόσου μπορεί να παρατηρηθεί μικροβαιμία σε αναλογία 1-5% των ασθενών, η οποία εμφανίζεται σε παιδιά κάτω του ενός έτους, και στους ηλικιωμένους.

Η τροφική δηλητηρίαση ή εντεροτοξική εντερίτιδα είναι συχνή και δύσκολα διαχωρίζεται από την εντερίτιδα εκ σαλμονέλλων. Διαφέρει στο ότι η διάρροια εμφανίζεται λίγες ώρες μετά την βρώση μολυσμένης τροφής χωρίς χρόνο επώασης και οφείλεται σε παράγωγη εντεροτοξίνης.

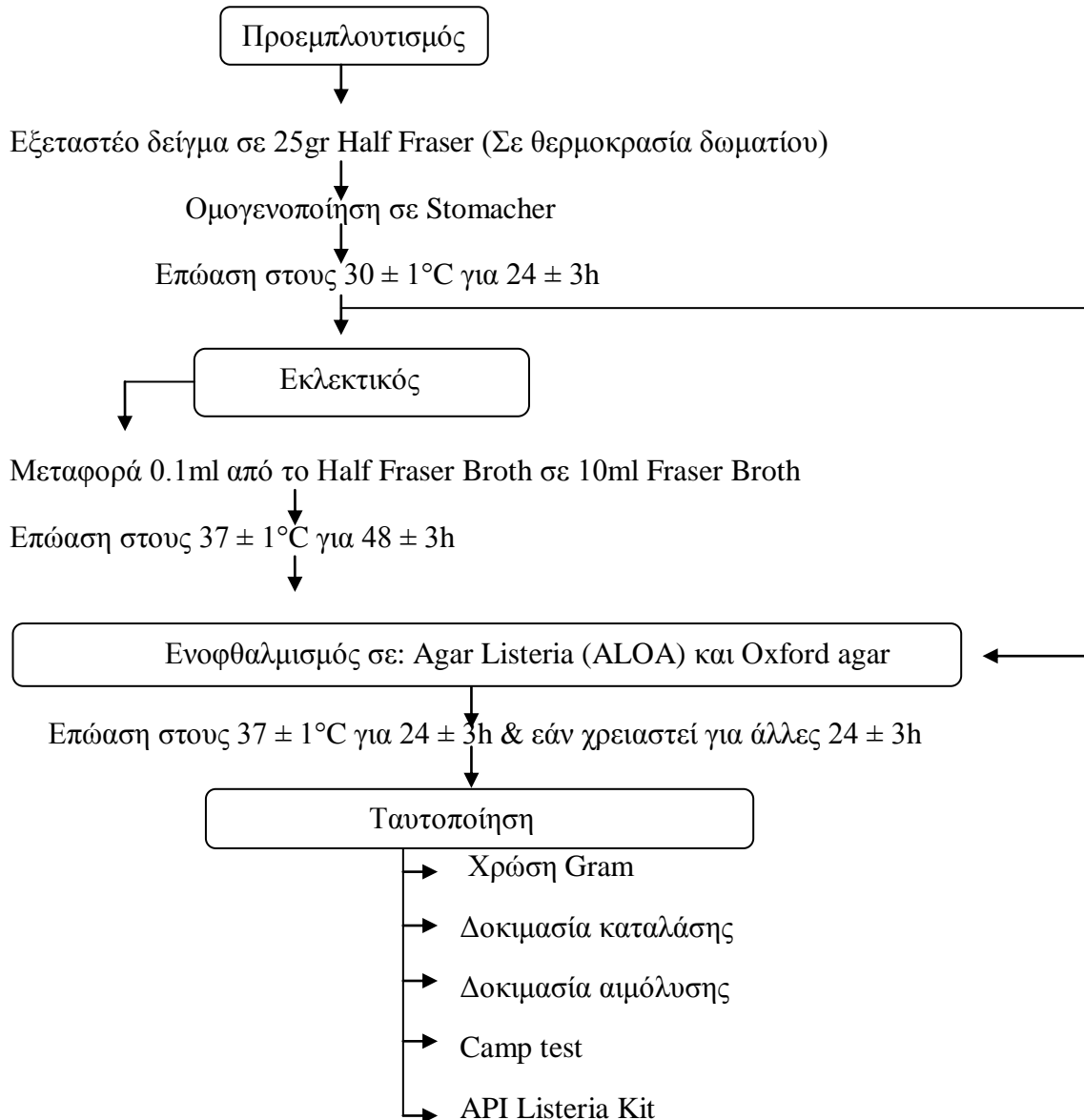
Στην δεύτερη κατηγορία ανήκουν νόσοι όπως οστεομυελίτιδα, σηπτική αρθρίτιδα, άσηπτη αντιδραστική αρθρίτιδα και πολύ σπάνια λοιμώξεις μαλακών ιστών, ενδοκαρδίτιδα, μηνιγγίτιδα και ουρολοιμώξεις. Οι εξωεντερικές σαλμονελλώσεις εμφανίζονται σε άτομα με προδιαθεσιακούς παράγοντες όπως αιμοσφαιρινοπάθειες, ανοσοκαταστολή, λεμφώματα κλπ. (Λεοναρδόπουλος I, 1999)

Shigella spp. Η κυριότερη νόσος που προκαλεί είναι η μικροβιακή δυσεντερία που χαρακτηρίζεται από οξεία φλεγμονώδη κολίτιδα, και βλεννοαιματηρές διαρροϊκές κενώσεις. Και οι τέσσερις υποομάδες της *Shigella* (*Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella boydii*, *Shigella sonnei*) είναι ικανές να προκαλέσουν δυσεντερία (15). Ο άνθρωπος μολύνεται από κόπρανα άλλου ανθρώπου που πάσχει από σιγκέλλωση ή από φορέα που αποβάλλει σιγκέλλα με τα κόπρανα. Η μεταδόσει μπορεί να γίνει με άμεση ή έμμεση επαφή με τα κόπρανα. Το μικρόβιο εγκαθιστάτε στα κύτταρα της βασικής μεμβράνης του βλεννογόνου όλου του παχέως εντέρου και μικρού μέρους του ειλεού. Ακολουθεί καταστροφή των κυττάρων και του ιστού, εξέλκωση και μικρές αιμορραγίες. Οι σιγκέλλες από το σημείο της εξέλκωσης δε μπαίνουν στην κυκλοφορία και δεν προσβάλλουν άλλους ιστούς γι' αυτό και η δυσεντερία χαρακτηρίζεται ως διφθερίτιδα του εντέρου. Στα κόπρανα υπάρχουν πολλά πυοσφαίρια, βλέννα και αίμα. Ιδιαίτερα όμως η *Shigella dysenteriae* ορότυπος 1 συνδέεται με βαριά μορφή της νόσου λόγω της παράγωγης τοξίνης που ονομάζεται Shiga. Η τοξίνη Shiga ακριβώς όπως οι τοξίνες που παράγονται από τα EHEC, αποτελούνται από μια υπομονάδα A και πέντε υπομονάδες B (Παπαπαναγιώτου I. 2001). Οι υπομονάδες αυτές δρουν έτσι ώστε να διακόπτεται η πρωτεϊνοσύνθεση των κυττάρων

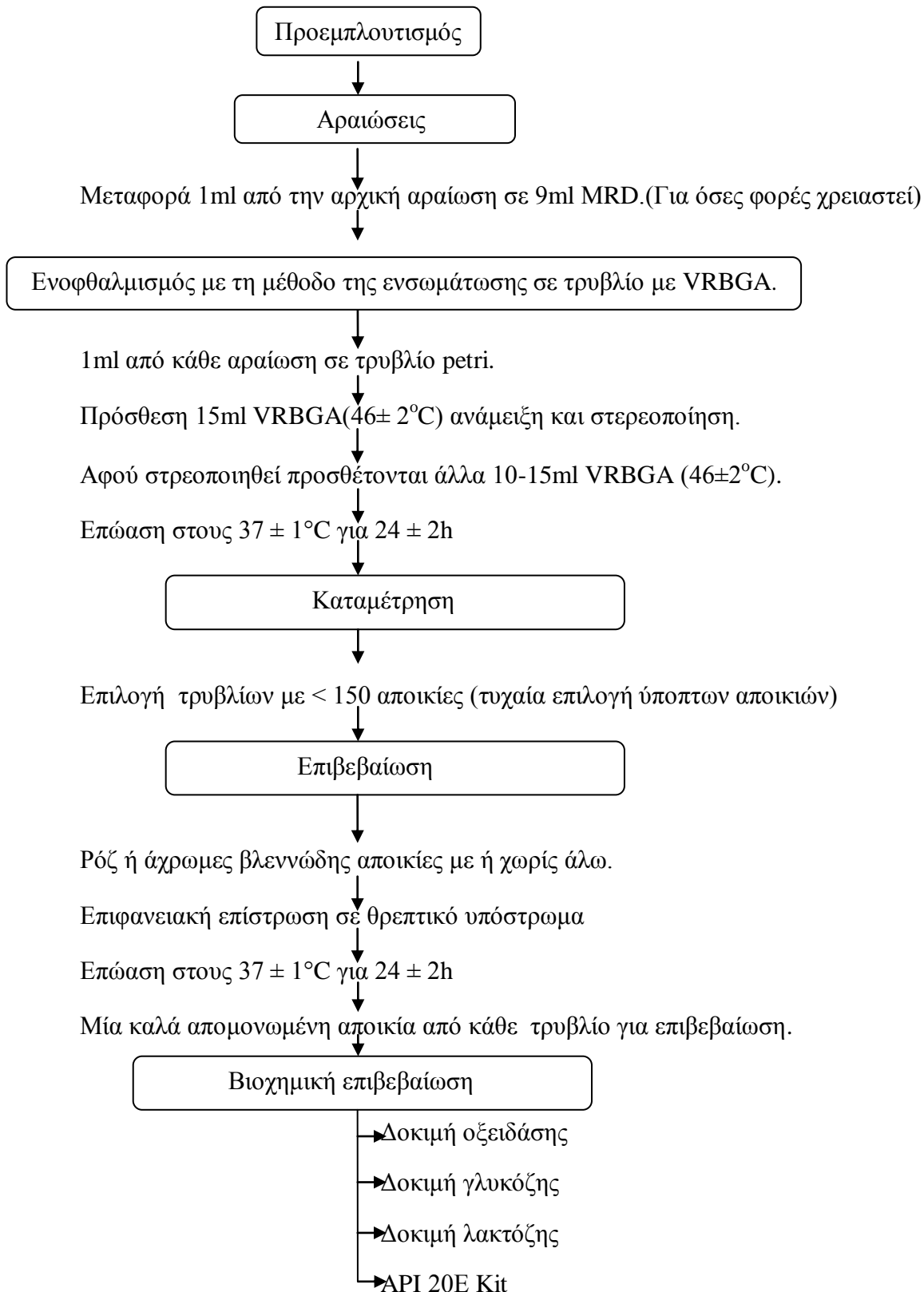
των ξενιστών με αποτέλεσμα τη λύση τους. Με αυτόν τον τρόπο προκαλείται και η καταστροφή των νεφρικών κυττάρων με αποτέλεσμα το ενδοτοξικό αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο (όπως στα EHEC). Άλλα σπανιότερα νοσήματα είναι η αιμορραγική κολίτιδα στις νεαρές θήλυσ από *Sh. Flexneri* και η σηψαιμία σε νεογνά (Murray P. R, et al , 1998).

1.11 ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ

1.11.1 Μέθοδος ανίχνευσης *Listeria monocytogenes* ISO 11290



1.11.2 Μέθοδος ανίχνευσης *Enterobacteriaceae* ISO 21528



1.12. ΟΡΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ

1.12.1 Ορισμοί.

Σύμφωνα με τον **Κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 2073/2005 της Επιτροπής της 15ης Νοεμβρίου 2005 περί μικροβιολογικών κριτηρίων για τα τρόφιμα :**

Μικροβιολογικό κριτήριο: είναι ένα 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.

Κριτήριο υγιεινής της παραγωγικής διαδικασίας: είναι ένα κριτήριο που καθορίζει την αποδεκτή λειτουργία της διαδικασίας παραγωγής· ένα τέτοιο κριτήριο δεν εφαρμόζεται στα προϊόντα που διατίθενται στην αγορά· ορίζει μια ενδεικτική τιμή μόλυνσης πάνω από την οποία απαιτούνται διορθωτικές ενέργειες προκειμένου να διατηρηθεί η υγιεινή της παραγωγικής διαδικασίας σύμφωνα με τη νομοθεσία για τα τρόφιμα.

Κριτήριο ασφάλειας των τροφίμων: είναι ένα κριτήριο που καθορίζει το αποδεκτό ενός προϊόντος ή μιας παρτίδας τροφίμων και το οποίο εφαρμόζεται στα προϊόντα που διατίθενται στην αγορά.

1.12.2 Νομοθεσία.

Σύμφωνα με τον **Κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 2073/2005 της Επιτροπής της 15ης Νοεμβρίου 2005 περί μικροβιολογικών κριτηρίων για τα τρόφιμα :**

Παγωτό και κατεψυγμένα επιδόρπια με βάση το γάλα. *Enterobacteriaceae* n=5 c=2 m=10 cfu/g M=100 cfu/g EN/ISO 21528-2.

Τρόφιμα έτοιμα για κατανάλωση ικανά να υποστηρίξουν την ανάπτυξη *L.monocytogenes* διαφορετικά από εκείνα που προορίζονται για βρέφη και για ειδικούς ιατρικούς σκοπούς, *Listeria monocytogenes* n= 5 c=0 M=100 cfu/g. EN/ISO 11290-2.

Προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια διατήρησής τους n=5 c=0 Απουσία *L.monocytogenes* σε 25gr. EN/ISO 11290-1.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΜΕΝΑ ΥΛΙΚΑ

Για τις ανάγκες της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκαν οργανικά χημικά αντιδραστήρια, θρεπτικά συστατικά ως μέσον καλλιέργειας, αλλά και σύνθετα υλικά υποστρωμάτων (culture media).

2.1.1 Θρεπτικά υποστρώματα

Στην ακολουθούμενη πειραματική διαδικασία εμπλέκονται τα παρακάτω θρεπτικά υποστρώματα και σύνθετα υλικά:

- ALOA εξειδικευμένο θρεπτικό υπόστρωμα Agar Listeria Ottaviani .
- VRBGA εξειδικευμένο θρεπτικό υπόστρωμα Violet Red Glucose Agar περιέχει την ουσία crystal violet.
- MacConkey είναι ένα μέσο που διαφοροποιεί την ζύμωση της λακτόζης.
- Kligler είναι ένα μέσο καλλιέργειας διαφοροποίησης της λακτόζης και της γλυκόζης, παράγωγης αερίου, παράγωγης H₂S.
- Tryptone Water είναι ένα μέσο πεπτόνης καζεΐνη (= τρυπτόνη) που περιέχει υψηλή αναλογία τρυπτοφάνης το οποίο αποικοδομείται από ινδολο-θετικούς οργανισμούς προς σχηματισμό ινδούς. Η ινδόλη μπορεί να ανιχνευθεί με το αντιδραστήριο KOVACS.

2.1.2 Οργανικά χημικά.

- Οξειδάση
- Paradimethyl-aminobenzaldehyde
- Mineral oil
- Αντιδραστήριο KOVACS

2.2 ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΜΕΝΟΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ

Σε όλα τα στάδια της πειραματικής διαδικασίας υπεισήλθε η χρήση ενός ή περισσότερων από τα όργανα ή και σκεύη που περιγράφονται παρακάτω.

2.2.1 Σκεύη

- 1.Γυάλινες κωνικές φιάλες των 2.000ml.
- 2.Ογκομετρικός κύλινδρος των 100ml.
- 3.Αποστειρωμένα τρυβλία.
- 4.Γλωσσοπιέστρες
5. Δοκιμαστικοί σωλήνες
- 6.Μαγνητικοί αναδευτήρες
7. Λύχνος Bunsen
8. Πλαστικοί περιέκτες Falcon (χωρητικότητας 15ml)
9. Πιπέτες μιας χρήσης των 10ml .
10. Ρύγγη(tips) των 100μl(=0,1ml), 1000μl(=1ml) για τις πιπέτες μεταβλητού όγκου.
- 11.Στατό δοκιμαστικών σωλήνων
- 12.Σακούλες ομογενοποίησης του δείγματος με φίλτρο.
- 13.Μικροβιολογικοί κρίκοι μικρού και μεσαίου μεγέθους μιας χρήσης.

2.2.2 Όργανα και συσκευές

Για την εκτέλεση του πειράματος έγινε χρήση των οργάνων και συσκευών που παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 2.1. Όργανα και συσκευές που χρησιμοποιηθήκαν.

No	Όργανο-συσκευή	Μοντέλο	Εταιρεία
1	Ομογενοποιητής τύπου stomacher.	Bagmixer 200	Interscience
2	Αναλυτικός ζυγός		Shimadzu
3	Υδατολουτρό	WBT 22	Medingen
4	Καταψυκτής	Form-86 ULT Freezer	Thermo Electron Corporation
5	Μετρητής αποικιών	Digital S	P Selecta
6	Επωαστικός κλιβανός	Incubig	P Selecta
7	Θερμομενός μαγνητικός αναδευτήρας	ADE	Velp Scientifica
8	Φλογα Εργασίας	IBS	Integra Biosciences

2.3 Μικροοργανισμοί που θα εξεταστούν και οι μέθοδοι ανίχνευσης τους.

Για το πειραματικό μέρος αυτής της μελέτης θα γίνει καταμέτρηση της *L.monocytogenes* καθώς και των *Enterobacteriaceae* που πιθανώς θα ανιχνευτούν στα δείγματα που θα εξετάσουμε. Οι μέθοδοι ανίχνευσης είναι οι εξής :

- ❖ Μέθοδος ανίχνευσης *Listeria monocytogenes* ISO 11290-1:1996/Amd 1:2004
- ❖ Μέθοδος ανίχνευσης *Enterobactriaceae* ISO 21528-2

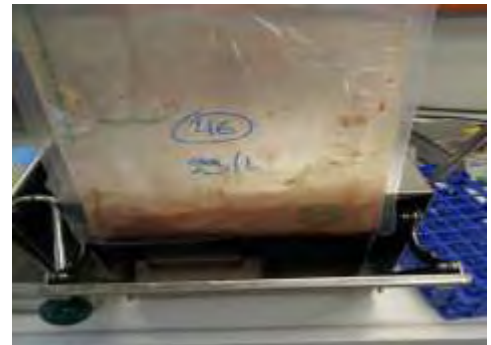
2.4.1 Δειγματοληψία

Συνολικά πενήντα(50) δείγματα θα εξεταστούν , πιο αναλυτικά :

- Εικοσιπέντε (25) δείγματα τυποποιημένου παγωτού λαμβάνονται τυχαία από διάφορα σημεία λιανικής πώλησης (π.χ περίπτερα, Super Markets, ψιλικατζίδικα)σε διαφορετικούς τύπους και γεύσεις.
- Εικοσιπέντε (25) δείγματα παγωτό ζαχαροπλαστέιου (χύδη) λαμβάνονται από διάφορα ζαχαροπλαστεία σε διαφορετικές γεύσεις.
- Τα δείγματα θα μεταφερθούν εντός ισοθερμικών περιέκτων στο εργαστήριο όπου και αποθηκεύονται υπό ψύξη ($4\pm 2^{\circ}\text{C}$) μέχρι να λάβει χώρα η μικροβιολογική ανάλυση τους.

2.4.2 Ομογενοποίηση του δείγματος

- Ποσότητα 10gr από κάθε δείγμα, αντιπροσωπευτική όλων των επιπέδων μάζας του δείγματος (συσκευασίες τον 100-200gr) μεταφέρονται υπό ασηπτικές συνθήκες εντός πλαστικού περιέκτη stomacher.
- Στην συνέχεια προσθέτονται 90ml αποστειρωμένου διαλύματος BPW (Buffer Peptone Water).
- Η σακούλα τοποθετείται στη συσκευή stomacher.
- Η ποσότητα του δείγματος υφίσταται ομογενοποίηση για συνολικό χρόνο 1min σε χαμηλή ταχύτητα.



Εικόνα 1: Ομογενοποίηση σε stomacher.

2.4.3 Διαδοχικές αραιώσεις

Κάθε τρόφιμο μπορεί να περιέχει από χίλια έως εκατοντάδες εκατομμύρια βακτηριακά κύτταρα ανά όγκο. Ο προσδιορισμός του μικροβιακού φορτίου χρειάζεται μια διαδικασία διαχωρισμού των βακτηρίων, ώστε όταν καλλιεργηθούν σε ένα στερεό θρεπτικό υλικό, να σχηματίζουν μεμονωμένες και ευκρινείς αποικίες.

- ☑ Σε 4 δοκιμαστικούς σωλήνες προσθέτονται 9ml ισοτονικού διαλύματος MRD και επισημαίνουμε τους συντελεστές αραιώσης.
- ☑ Μεταφέρουμε ασηπτικά 1ml από το ομογενοποιημένο δείγμα (αραίωση -1) στον πρώτο δοκιμαστικό σωλήνα (αραίωση -2)
- ☑ Αναδεύουμε με περιστροφικό αναδευτήρα προκειμένου να επιτύχουμε επαρκή διασπορά.
- ☑ Με τον ίδιο τρόπο συνεχίζουμε και με τους υπόλοιπους δοκιμαστικούς σωλήνες.

2.4.4 Ενοφθαλμισμός θρεπτικών υποστρώματων για *L.monocytogenes*

Ο ενοφθαλμισμός του βακτηριακού εναιωρήματος θα γίνει με την τεχνική της επιφανειακής εξάπλωσης (spread plate technique).

Στην τεχνική της επιφανειακής εξάπλωσης γίνεται διασπορά μικρού γνωστού όγκου από το αραιωμένο δείγμα στην επιφάνεια του στερεοποιημένου θρεπτικού υποστρώματος σε τρυβλίο. Με ομοίμορφη διασπορά του εναιωρήματος στην επιφάνεια του στερεού υποστρώματος, και έπειτα από επώαση σε κατάλληλες συνθήκες σχηματίζονται ευδιάκριτες αποικίες οι οποίες μπορούν να μετρηθούν, η τεχνική επιφανειακής επίστρωσης προτιμάται σε περιπτώσεις υποχρεωτικά αναερόβιων.



Εικόνα 2.Επιφανειακή επίστρωσησε τρυβλίο με ALOA.

- ☑ Η βάση των τρυβλίων επισημαίνεται με τους συντελεστές αραιώσης με τους οποίους θα ενοφθαλμιστεί το θρεπτικό υπόστρωμα.
- ☑ Τοποθετούμε, στο κέντρο του τρυβλίο με το στερεοποιημένο θρεπτικό υλικό 0,1mL βακτηριακού εναιωρήματος από τους δοκιμαστικούς σωλήνες με την αντίστοιχη αναγραφόμενη αραιώση.

- ☑ Με τη μικροβιολογική ράβδο εξαπλώνεται το βακτηριακό ελαιώρημα σε όλη την επιφάνεια του θρεπτικού υλικού με κυκλικές κινήσεις.
- ☑ Τα τρυβλία αναποδογυρίζονται και τοποθετούνται προς επώαση στην κατάλληλη θερμοκρασία.

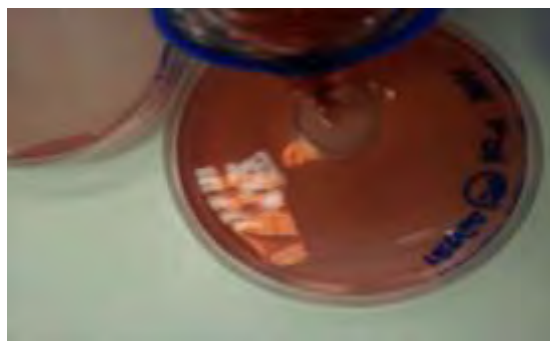
Στην περίπτωση των εξειδικευμένων θρεπτικών υποστρωμάτων για τη *Listeria spp* στην περίπτωση μας χρησιμοποιήσαμε το ALOA: Χρησιμοποιήσαμε συνολικά για κάθε δείγμα 1 τρυβλίο με στερεό υπόστρωμα, 0,1mL από την πρώτη αραιώση εξαπλώνεται σε τρυβλίο με το ίδιο θρεπτικό υλικό.

2.4.5 Ενοφθαλμισμός θρεπτικών υποστρωμάτων για *Enterobacteriaceae*

Ο ενοφθαλμισμός του βακτηριακού ελαιωρήματος θα γίνει με την τεχνική της ενσωμάτωσης (pour plate technique).



Εικόνα 3: Μέθοδος ενσωμάτωσης 1^ο στρώμα.



Εικόνα 4: Μέθοδος ενσωμάτωσης 2^ο στρώμα .

Στην τεχνική της ενσωμάτωσης, οι μικροοργανισμοί διασπείρονται ομοιόμορφα στην μάζα ρευστού θρεπτικού υποστρώματος το οποίο αφήνεται στην συνέχεια να στερεοποιηθεί. Η τεχνική της ενσωμάτωσης προτιμάται σε περιπτώσεις προαιρετικά αναερόβιων μικροοργανισμών.

- ☑ Η βάση των τρυβλίων επισημαίνεται με τους συντελεστές αραιώσης με τους οποίους θα ενοφθαλμιστεί το θρεπτικό υλικό.
- ☑ Τοποθετούμε σε κενό τρυβλίο 1ml από την από τους δοκιμαστικούς σωλήνες με την αντίστοιχη αναγραφόμενη αραιώση.
- ☑ Αποχύνουμε ποσότητα θρεπτικού υλικού στα τρυβλία με τα ενοφθαλμισμάτα.
- ☑ Ήπια ανάδευση δεξιόστροφα και αριστερόστροφα.
- ☑ Αφού στερεοποιηθεί το υλικό γίνεται επικάλυψη του ενοφθαλμισμένου μέσου με το ίδιο θρεπτικό υλικό.
- ☑ Μετά την στερεοποίηση του υλικού τα τρυβλία αναποδογυρίζονται και τοποθετούνται προς επώαση στην κατάλληλη θερμοκρασία.

Στην περίπτωση του θρεπτικού υλικού VRBGA που χρησιμοποιήσαμε για τα *Enterobacteriaceae*: θα χρησιμοποιηθούν 2 κενά τρυβλία και σε κάθε ένα από αυτά θα γίνει έγχυση 1 mL από 2 διαδοχικές αραιώσεις 10^{-1} , 10^{-2} .

2.4.6 Επώαση θρεπτικών υποστρωμάτων

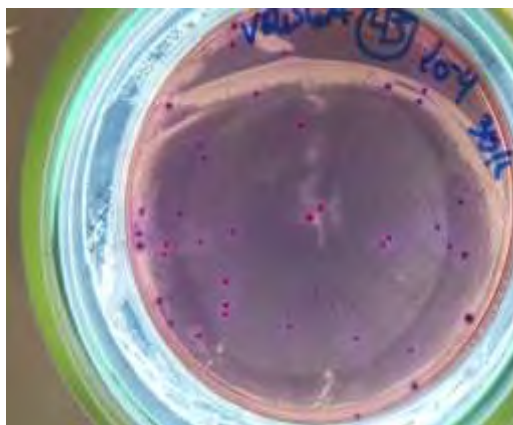
Οι συνθήκες επώασης πρέπει να εξασφαλίζουν τη βέλτιστη μικροβιακή αύξηση. Εκτός από τη χρήση του κατάλληλου μέσου αύξησης και τη κατάλληλη ατμόσφαιρα, οι υπόλοιπες απαιτούμενες συνθήκες είναι η θερμοκρασία και ο χρόνος επώασης.

Πίνακας 2.2 Θρεπτικών υποστρωμάτων, θερμοκρασίας και χρόνου επώασης.

Θρεπτικό μέσο ανάπτυξης	Μικροοργανισμοί που αναπτύσσονται	Τεχνική ενοφθαλμισμού	Θερμοκρασία επώασης (°C)	Χρόνος επώασης
ALOA	<i>Listeria Spp</i>	Sprend plate	37±2	24h
VRBGA	<i>Enterobacteriaceae</i>	Pour plate	37±2	24h
TSA	Διαφοροι μικροοργανισμοί	Sprend plate	37±2	24h
MacConkey	<i>Enterobacteriaceae</i>	Sprend plate	37±2	24h

2.4.7 Αρίθμηση αποικιών.

Η πιο συνηθισμένη μέθοδος προσδιορισμού του μικροβιακού φορτίου ενός προϊόντος αποτελεί η αρίθμηση των αποικιών (colony count) που σχηματίζονται σε ενοφθαλμισμένο στερεό θρεπτικό υλικό. Στηρίζεται στη θεωρία ότι ένα βακτηριακό κύτταρο ή μια ομάδα κυττάρων δημιουργούν μια αποικία. Έτσι ο αριθμός των αποικιών που αναπτύσσονται σε ένα ήδη ενοφθαλμισμένο θρεπτικό υλικό αντιπροσωπεύει τον πραγματικό μικροβιακό πληθυσμό. Η μέτρηση των αποικιών ανά τρυβλίο γίνεται με γυμνό μάτι και με τη χρήση εργαστηριακού οργάνου μέτρησης αποικιών.



Εικόνα 5: Καταμέτρηση στο μετρητή αποικιών.

- Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε cfu/g μετά την επεξεργασία τους μέσω αριθμητικών τύπων.

2.4.8 Καλλιέργεια σε TSA άγαρ

Η θρεπτική σύνθεση του Άγαρ Σόγιας Trypticase (TSA) το έχει καταστήσει ένα δημοφιλές υλικό, τόσο στη μη συμπληρωμένη του μορφή όσο και ως βάση για υλικά που περιέχουν αίμα. Ο συνδυασμός πεπτονών καζεΐνης και σόγιας στη βάση του Άγαρ Σόγιας Trypticase (TSA II) καθιστούν το υλικό ιδιαίτερα θρεπτικό λόγω της παροχής οργανικού αζώτου και ιδιαίτερα αμινοξέων και πεπτιδίων μακρύτερης αλυσίδας. Το χλωριούχο νάτριο διατηρεί την οσμωτική ισορροπία.



Εικόνα 6. Καλλιέργεια σε TSA πριν και μετά.

Οι παράγοντες ανάπτυξης που περιέχει βελτιώνουν τις αιμολυτικές αντιδράσεις. Το απινωδογονωμένο αίμα προβάτου είναι το πλέον ευρέως χρησιμοποιούμενο αίμα για εμπλουτισμό των υλικών καλλιέργειας με βάση το άγαρ.

- ☑ Με τη βοήθεια μικροβιολογικού κρίκου παίρνουμε μια αποικία από το τρυβλίο.
- ☑ Κυλώντας τον κρίκο πάνω σε μια μικρή περιοχή της επιφάνειας στο άκρο, μετά επιστρώστε από αυτή την ενοφθαλμισμένη περιοχή.
- ☑ Επωάζουμε στους 37°C για 24±2 ώρες.

2.4.9 Καλλιέργεια σε MacConkey άγαρ

Το άγαρ MacConkey είναι μία από τις πρώτες συνθέσεις (δημοσιεύτηκε το 1900 από τον MacConkey) για την απομόνωση, την καλλιέργεια και την ταυτοποίηση του *Enterobacteriaceae* και συγκεκριμένων αζυμοτικών. Αργότερα, το υλικό αυτό τροποποιήθηκε αρκετές φορές.

Το άγαρ MacConkey είναι μόνον ελαφρώς επιλεκτικό επειδή η συγκέντρωση των χολικών αλάτων,



Εικόνα 7: Άγαρ MacConkey πριν και μετά.

η οποία αναστέλλει τους gram θετικούς μικροοργανισμούς, είναι χαμηλή σε σύγκριση με άλλα εντερικά υλικά καλλιέργειας σε τρυβλία.

Αυτό το υλικό καλλιέργειας συνιστάται για χρήση με δείγματα που είναι πιθανόν να περιέχουν μεικτή μικροβιακή χλωρίδα, επειδή επιτρέπει μια προκαταρκτική ομαδοποίηση των εντερικών και πολλών άλλων Gram-αρνητικών βακτηριδίων σε ζυμωτικούς της λακτόζης και αζυμωτικούς της λακτόζης μικροοργανισμούς.

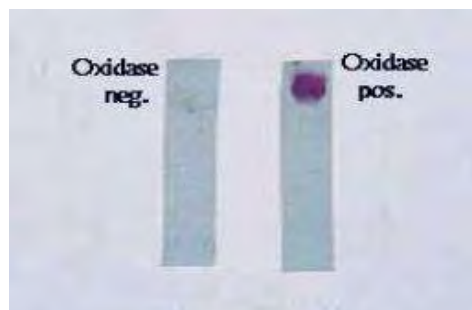
Το κρυσταλλικό ιώδες περιλαμβάνεται για να αναστέλλει τα Gram θετικά βακτηρίδια, ιδίως τους εντερόκοκκους και τους σταφυλόκοκκους. Η διαφοροποίηση μεταξύ των εντερικών μικροοργανισμών επιτυγχάνεται με το συνδυασμό της λακτόζης και του ουδέτερου ερυθρού δείκτη του pH. Παράγονται άχρωμες ή ροζ έως ερυθρές αποικίες ανάλογα με την ικανότητα του απομονωμένου οργανισμού να ζυμώσει τον υδατάνθρακα

- ☑ Με τη βοήθεια μικροβιολογικού κρικού παίρνουμε μια αποικία από το τρυβλίο.
- ☑ Επιστρώνουμε γραμμωτά την αποικία, σε 4-5 διαδοχικές επιστρώσεις το συντομότερο δυνατό, χρησιμοποιώντας διαφορετικούς κρίκους για κάθε επίστρωση.
- ☑ Επωάζουμε στους 37°C για 24± 2 ώρες.

2.4.10 Δοκιμή της οξειδάσης

Η αρχή της δοκιμής βασίζεται στην παρουσία ενός ενδοκυττάριου συστήματος οξειδάσης κυτοχρώματος, το οποίο ενεργοποιεί την οξείδωση του αναγομένου κυτοχρώματος από το μοριακό οξυγόνο. Το κυτόχρωμα χρησιμεύει ως δέκτης ηλεκτρονίων στο τελικό στάδιο του συστήματος μεταφοράς ηλεκτρονίων.

Οι μικροοργανισμοί που παράγουν το ενζυμο της οξειδάσης, το οποίο παρουσία ατμοσφαιρικού οξυγόνου, του κυτοχρώματος c και του αντιδραστηρίου οξειδάσης, οξειδώνουν το αντιδραστήριο για το σχηματισμό μιας έγχρωμης ένωσης, της ινδοφαινόλης. Η αντίδραση γίνεται αντιληπτή, συνήθως εντός 10 δευτερόλεπτων, με την παράγωγή βαθύ μώβ χρώματος (MacFaddin, J.F. 2000).



Εικόνα 8: Δοκιμή οξειδάσης.

- ☑ Κάτω από ασηπτικές συνθήκες, παίρνεται ποσότητα κυττάρων από το επωασμένο τρυβλίο με τη βοήθεια μικροβιολογικού κρίκου.
- ☑ Το δείγμα των κυττάρων εξαπλώνεται στην εμποτισμένη με οξειδάση περιοχή.
- ☑ Μετά από σχεδόν 10-30 δευτερόλεπτα, γίνεται παρατήρηση της περιοχής για τυχόν αλλαγή χρώματος.

2.4.11 Υλικό KLIGLER

Το υλικό Kligler μπορεί να μας δείξει: Τη διάσπαση της γλυκόζης, της λακτόζης, την παραγωγή αερίου και υδροθείου. Περιέχει γλυκόζη, λακτόζη, θειοθειικό νάτριο και θειικό εναμμόνιο σίδηρο. Το υλικό περιέχει επίσης δείκτη ερυθρό της φαινόλης και φυσιολογικά είναι κοκκινωπό.

Μετά την αποστείρωση, σε σωληνάριο, αφήνουμε το υλικό να πήξει σε λοξή θέση, ώστε στον πυθμένα να υπάρχει μια ευθεία στήλη 2-3 cm και μια λοξή επιφάνεια πάνω από αυτή. Κάτω υπάρχει η γλυκόζη (10 φορές μεγαλύτερη ποσότητα και βαρύτερη) και επάνω στη λοξή επιφάνεια λακτόζη. Η αλλαγή χρώματος κόκκινο σε κίτρινο δείχνει ζύμωση των σακχάρων, οι φυσαλίδες την παραγωγή αερίου, ενώ η ανάπτυξη μαύρου χρώματος την παραγωγή υδροθείου (με αναγωγή θειοθειικού νατρίου παράγεται υδρόθειο και αυτό αντιδρά με θειικό εναμμόνιο σίδηρο προς παραγωγή μαύρου χρώματος θειούχου σιδήρου).



Εικόνα 9:Kligler πριν και μετά την δοκιμή.

Εμβολιάζουμε με ευθύ κρίκο στην επιφάνεια και τρυπάμε μετά ώστε το μικρόβιο να φθάσει και στον πυθμένα. Επωάζουμε 18-24 ώρες.

Κίτρινο χρώμα στο πάνω μέρος = Διάσπαση λακτόζης (τα λακτόζη θετικά στο McConkey, E.coli, Klebsiella κ.α.)

Κόκκινο χρώμα στο πάνω μέρος = λακτόζη αρνητικό μικρόβιο (π.χ. σαλμονέλλα, σιγκέλλα, πρωτέας κ.α.)

Κίτρινο χρώμα στο κάτω μέρος = Διάσπαση γλυκόζης (όλα τα εντεροβακτηριακά)

Κόκκινο χρώμα στο κάτω μέρος = όχι διάσπαση γλυκόζης (αζυμωτικό).

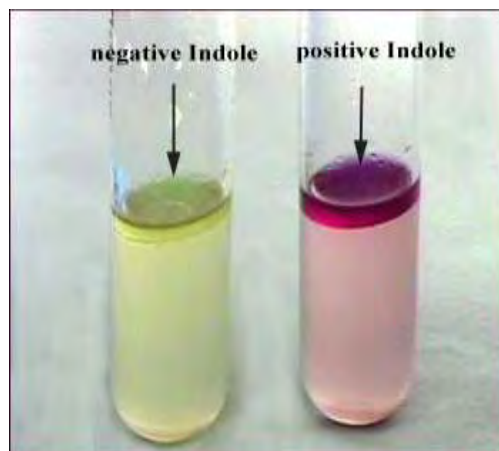
Μαύρο χρώμα στις θέσεις εμβολιασμού = Παραγωγή υδρόθειου (σαλμονέλλα, πρωτέας κ.α.)

Φυσαλίδες μέσα στο υλικό ή και κάτω από αυτό αν παράγεται αέριο (E.coli, Salmonella κ.α.)

2.4.12 Δοκιμή ινδόλης

Με τη δοκιμή αυτή διερευνάται η ικανότητα ορισμένων βακτηρίων να αποδομούν το αμινοξύ τρυπτοφάνη προς ινδόλη. Η ινδόλη η οποία παράγεται ανιχνεύεται με τη βοήθεια της paradimethyl-aminobenzaldehyde με την οποία σχηματίζει έγχρωμη ένωση.

- ☑ Με τη βοήθεια ενός μικροβιολογικού κρίκου ενοφθαλμίζονται σωλήνες με Peptone Water (B-77 ή καλύτερα με Tryptone Water(B-109) διότι η πεπτόνη η οποία χρησιμοποιείται πρέπει να είναι πλούσια σε τρυπτοφάνη.
- ☑ Επωάζονται στους 37οC για 48 ώρες.
- ☑ Προσθέτονται 0,2ml αντιδραστηρίου Kovacs (A-8) σε 5ml καλλιέργειας και το περιεχόμενο του σωλήνα αναδεύεται ελαφρά.
- ☑ Θετική θεωρείται η δοκιμή όταν η στιβάδα της αμυλικής αλκοόλης πάρει κόκκινο χρώμα.



Εικόνα 10 : Δοκιμή ινδόλης

2.4.13 Ταυτοποίηση- Σύστημα MICROGEN GnA+GnB –ID SYSTEM

Το σύστημα MICROGEN GnA+GnB –ID SYSTEM αποτελεί μια μικρογραφία των συμβατικών βιοχημικών δοκιμών που χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση των μελών της οικογενείας Enterobacteriaceae και κάποιων ακόμα Gram ⁻ βακτηρίων. Το σύστημα χρησιμοποιεί μια πλαστική ταινία με 20 χωριστές θέσεις και δίνει την δυνατότητα πραγματοποίησης 20 διαφορετικών βιοχημικών δοκιμών. Κάθε θέση αποτελείται από ένα σωληνάριο και ένα κυπέλλιο. Στα σωληνάρια υπάρχουν αφυδατωμένα υποστρώματα για τις βιοχημικές δοκιμές.

Αναφορικά με τους ελέγχους ταυτοποίησης είναι απαραίτητο να προετοιμαστούν βακτηριακά αιωρήματα που να προσεγγίζουν κάποιο πρότυπο συγκέντρωσης. Στην προκειμένη περίπτωση χρησιμοποιήθηκε αιώρημα κυττάρων από φρέσκια καλλιέργεια (48 ωρών) του υπό εξέταση στελέχους (τρυβλία με θρεπτικό υλικό MacConkey) σε αποστειρωμένο φυσιολογικό ορό (0,85% NaCl, 5ml/σωλήνα, αποστείρωση στους 121°C για 15 λεπτά) σε συγκέντρωση τέτοια, που με γυμνό μάτι να ταυτίζεται με τη θολερότητα ενός προεπιλεγμένου πρότυπου (McFarland 0,5). Στη συνέχεια εμβολιαστήκαν με αυτό το αιώρημα τα πηγαδάκια της ταινίας. Τα πηγαδάκια με τις δοκιμές Lisine, Ornithine, H₂S, Urease από τη στήλη GNA και Arabinose, και Arginine από τη στήλη GNB πληρώθηκαν με το αιώρημα ενώ στο τέλος πληρώθηκαν με αποστειρωμένο παραφινέλαιο γιατί χρειάζονται αναερόβιες συνθήκες επώασης.

Μετά την επώαση 18-24h και αφού είχαν πραγματοποιηθεί οι αντιδράσεις, προστεθήκαν σε κάποια σωληνάρια ορισμένα αντιδραστήρια (σύμφωνα πάντα με τον κατασκευαστή) και καταγράφηκαν τα αποτελέσματα. Οι αντιδράσεις διαβάστηκαν σύμφωνα με τον πίνακα ανάγνωσης και η ταυτοποίηση έγινε χρησιμοποιώντας το λογισμικό ταυτοποίησης που παρέχεται από την εταιρία. Πιο συγκεκριμένα ως προς την ταυτοποίηση, αυτή προκύπτει

ένα αριθμητικό προφίλ. Τα σωληνάρια ομαδοποιούνται σε ομάδες των τριών και σε κάθε σωληνάριο αντιστοιχεί κάποια βαθμολογία 1,2 ή 4(σημειώνεται ότι βαθμολογούνται μόνο τα σωληνάρια που έδωσαν θετική αντίδραση).



Εικόνα 11: MICROGEN GnA+GnB –ID SYSTEM μετά από την επώαση και πίνακας καταγραφής αριθμητικών δεδομένων.

Προστίθεται η βαθμολογία των σωληνάριων ανά τρία και το αποτέλεσμα αναγράφεται στο κάτω μέρος της αντίστοιχης ομάδας. Ο τελικός επταψήφιος αριθμός που θα προκύψει με τον τρόπο αυτό θα χρησιμοποιηθεί για την αναζήτηση του είδους του μικροοργανισμού στον αναλυτικό κατάλογο που παρέχει ο κατασκευαστής. Ας σημειωθεί ότι η αντίδραση της οξειδάσης αποτελεί την 21 εξέταση, της οποίας το αποτέλεσμα έχει προκύψει σε προηγούμενο στάδιο.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.

3.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Αφού γίνει η καταμέτρηση των τρυβλίων καταγράφουμε τους αριθμούς και με τη χρήση μαθηματικών τύπων βγάζουμε τα αποτελέσματα.

Για τον προσδιορισμό των cfu/gr της *L.monocytogenes* χρησιμοποιήθηκε ο παρακάτω τύπος:

Για 0 cfu/τρυβλίο τότε:

$$N < 1/d \times v = \text{cfu/gr}$$

d= ο συντελεστής αραίωσης της αρχικής αραίωσης.

v= ο όγκος του ενοφθαλμισμένου δείγματος σε κάθε τρυβλίο (κατά προσέγγιση θεωρήθηκε ότι 1 gr αντιστοιχεί σε 1 ml δείγματος, ενοφθαλμίστηκαν 100 μl ή 0.1 ml).

π.χ: $N < 1/0,1 \times 0,1 = 1/0.01 = 100$

Άρα $N < 100 \text{ cfu/gr}$

Για τον προσδιορισμό των cfu/gr στα *Enterobacteriaceae* όταν αναπτύχθηκαν <15 cfu/τρυβλίο χρησιμοποιήθηκε ο παρακάτω τύπος:

$$N = y/d \times v$$

y= ο αριθμητικός Μ.Ο των αποικιών που μετρήθηκαν σε όλα τα τρυβλία

d= ο συντελεστής αραίωσης της αρχικής αραίωσης (1/10 ή 0.1).

v = ο όγκος του ενοφθαλμισμένου δείγματος σε κάθε τρυβλίο (1 ml για τα *Enterobacteriaceae*).

π.χ: τρυβλίο 1= 12 τρυβλίο 2=0

$$N=12/0,1 \times 1=12/0,1=120$$

Άρα $N= 120\text{cfu/gr}$

Για τον προσδιορισμό των cfu/gr των *Enterobacteriaceae* όταν αναπτύχθηκαν >15 cfu/ τρυβλίο χρησιμοποιήθηκε ο παρακάτω τύπος:

$$N= \Sigma a/ V (n_1 + 0,1+ n_2) d$$

Όπου:

Σa = άθροισμα αποικιών από όλα τα τρυβλία ενός δείγματος (όλων των αραιώσεων).

V = είναι ο όγκος που ενοφθαλμίστηκε στο τρυβλίο.

n_1 = είναι ο αριθμός των τρυβλίων της 1^{ης} αραιώσης.

n_2 = είναι ο αριθμός των τρυβλίων της 2^{ης} αραιώσης.

d = ο συντελεστής αραιώσης της 1^{ης} χρησιμοποιηθείσας αραιώσης.

π.χ: τρυβλίο 1= Μη μετρήσιμο τρυβλίο 2=180 τρυβλίο 3= 60

$$N =240/1 \times (1+0,1 \times 1) \times 0,1= 240/0,11= 2.181$$

Άρα $N =2.181 \text{ cfu/gr}$

Αφού έλαβαν χώρα οι δόκιμες και οι διαδικασίες που αναλύονται στο προηγούμενο κεφάλαιο, τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 3.1: Πίνακας συνολικών αποτελεσμάτων των θετικών δειγμάτων.

Αρ.Δείγ/τος	<i>L.monocytogenes</i> Cfu/gr	Enterobacteriaceae Cfu/gr	Οξειδάση	Λακτόζη	Γλυκόζη	Ινδόλη	Αποτελέσματα ταυτοποίησης
Θετικά δειγμάτα τυποποιημένων παγωτών.							
7	<100cfu/gr	418 cfu/gr	-	MAYPO KLIGLER		ΔΕΝ ΕΓΙΝΕ	<i>Proteus vulgaris</i>
9	<100cfu/gr	218 cfu/gr	-	MAYPO KLIGLER		ΔΕΝ ΕΓΙΝΕ	<i>Proteus mirabilis</i>
19	<100cfu/gr	140 cfu/gr	-	MAYPO KLIGLER		ΔΕΝ ΕΓΙΝΕ	<i>Proteus mirabilis</i>
Θετικά δειγμάτα παγωτού ζαχαροπλαστείου.							
28	<100cfu/gr	120 cfu/gr	-	-	+	-	<i>Pantoea dispersa</i>
				+	+	-	<i>Enterobacter clocae</i>
				+	+	-	<i>Enterobacter asburve</i>
29	<100cfu/gr	20 cfu/gr	-	MAYPO	KLIGLER	-	<i>Proteus vulgaris</i>
				-	+	-	<i>Citrobacter youngae</i>
31	<100cfu/gr	40 cfu/gr	-	+	+	-	<i>Pantoea agglomerans</i>
33	<100cfu/gr	10 cfu/gr	-	+	+	-	<i>Pantoea agglomerans</i>
34	<100cfu/gr	60 cfu/gr	-	+	+	-	<i>Pantoea agglomerans</i>
35	<100cfu/gr	20 cfu/gr	-	+	+	-	<i>Pantoea agglomerans</i>
36	<100cfu/gr	90 cfu/gr	-	MAYPO KLIGLER		ΔΕΝ ΕΓΙΝΕ	<i>Proteus mirabilis</i>
37	<100cfu/gr	40 cfu/gr	-	+	+	-	<i>Pantoea agglomerans</i>
38	<100cfu/gr	171 cfu/gr	-	+	+	-	<i>Enterobacter clocae</i>
39	<100cfu/gr	100 cfu/gr	-	+	+	-	<i>Enterobacter clocae</i>
40	<100cfu/gr	60 cfu/gr	-	+	+	-	<i>Enterobacter clocae</i>
41	<100cfu/gr	236 cfu/gr	-	+	+	-	<i>Enterobacter clocae</i>
42	<100cfu/gr	80 cfu/gr	-	+	+	-	<i>Enterobacter clocae</i>
43	<100cfu/gr	536 cfu/gr	-	+	+	-	<i>Enterobacter clocae</i>
44	<100cfu/gr	60 cfu/gr	-	+	+	-	<i>Enterobacter clocae</i>
45	<100cfu/gr	890 cfu/gr	-	+	+	-	<i>Enterobacter clocae</i>
46	<100cfu/gr	527 cfu/gr	-	+	+	-	<i>Pantoea agglomerans</i>

47	<100cfu/gr	10 cfu/gr	-	+	+	-	<i>Citrobacter freundii</i>
50	<100cfu/gr	10 cfu/gr	-	-	+	-	<i>Citrobacter youngae</i>

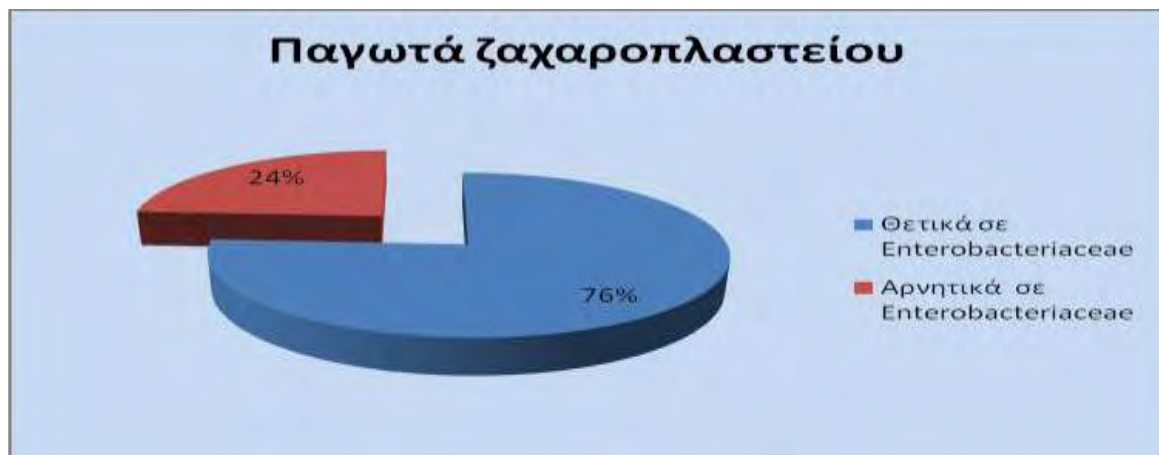
3.2 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.

Αξιολογώντας τα αποτελέσματα βλέπουμε ότι από τα 25 δείγματα τυποποιημένου παγωτού βλέπουμε ότι τα 22 δείγματα είναι αρνητικά στη *L.monocytogenes* και τα *Enterobacteriaceae*, ενώ τα 3 δείγματα είναι αρνητικά στη *L.monocytogenes* και θετικά

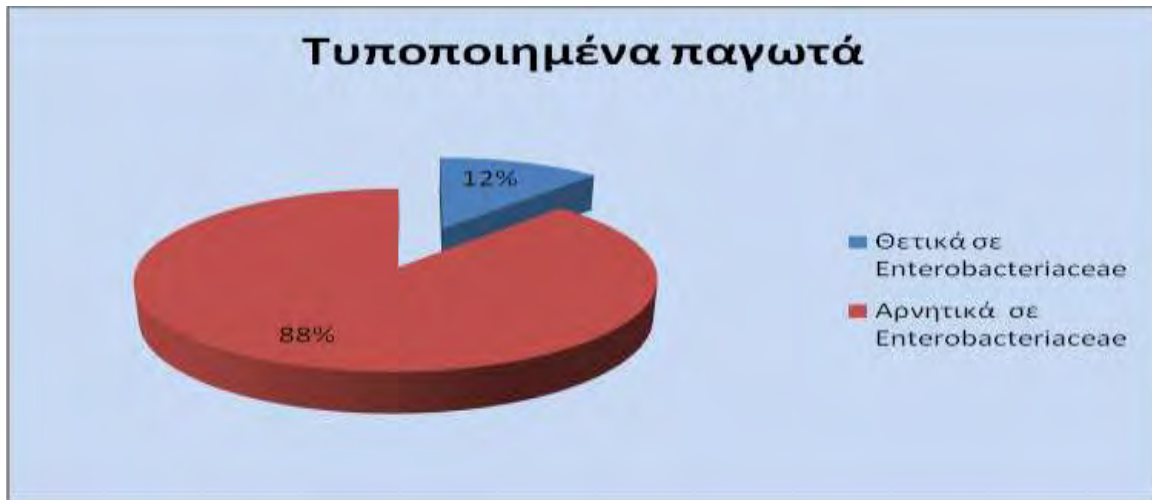


στα *Enterobacteriaceae*. Από τα 25 δείγματα παγωτού ζαχαροπλαστέιου και τα 25 δείγματα βρέθηκαν να είναι αρνητικά στη *L.monocytogenes* και 19 δείγματα ήταν θετικά και τα 6 ήταν αρνητικά στα *Enterobacteriaceae*.

Διάγραμμα 3.1: Διάγραμμα αποτελεσμάτων.



Διάγραμμα 3.2: Ποσοστό επιμολυσμένων παγωτών ζαχαροπλαστείου με *Enterobacteriaceae*.



Διάγραμμα 3.3: Ποσοστό επιμολυσμένων τυποποιημένων παγωτών με *Enterobacteriaceae*.

Αφού έγινε η ταυτοποίηση με το σύστημα MICROGEN GN-ID A+B PANEL βρέθηκε ότι από τα 3 θετικά δείγματα των τυποποιημένων παγωτών το ένα ταυτοποιήθηκε *Proteus vulgaris* και τα δυο *Proteus mirabilis*. Από τα παγωτά ζαχαροπλαστείου βρέθηκαν 19 θετικά δείγματα τα οποία ταυτοποιήθηκαν ως εξής ένα δείγμα *Citrobacter freundii*, δυο δείγματα *Citrobacter youngae*, εννέα δείγματα *Enterobacter cloacae*, ένα δείγμα *Enterobacter asburiae*, ένα δείγμα *Pantoea dispersa*, έξι δείγματα *Pantoea agglomerans*, ένα δείγμα *Proteus vulgaris*, και ένα δείγμα *Proteus mirabilis*. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στα παρακάτω διαγράμματα:



Διάγραμμα 3.4: Συνολικά αποτελέσματα ταυτοποίησης.



Διάγραμμα 3.5: Αποτελέσματα ταυτοποίησης δειγμάτων τυποποιημένων παγωτών.



Διάγραμμα 3.6: Αποτελέσματα ταυτοποίησης δειγμάτων παγωτών ζαχαροπλαστέιου.

Αναλύοντας λοιπόν τα αποτελέσματα βλέπουμε ξεκάθαρα ότι σε όλα τα δείγματα δεν υπάρχει παρουσία *L. Monocytogenes*, υπάρχουν όμως Εντεροβακτηριακά, τα παγωτά ζαχαροπλαστέιου είναι τα πιο επιβαρυνμένα σε σχέση με τα τυποποιημένα παγωτά αυτό μπορεί να οφείλεται στους παρακάτω παράγοντες:

- Στα παγωτά ζαχαροπλαστέιου υπάρχει ποικιλία υλικών όπως μπισκότα, ξηροί καρποί, και φρούτα τα οποία δεν υπόκεινται σε κάποια επεξεργασία.
- Η παραγωγή του παγωτού ζαχαροπλαστέιου δεν είναι πλήρως αυτοματοποιημένη και σε πολλά στάδια υπάρχει ο ανθρωπινός παράγοντας.
- Μερικά από τα ζαχαροπλαστέια που λήφθηκαν τα δείγματα δεν χρησιμοποιούσαν κάποιο σύστημα ποιότητας ή HACCP.
- Το γεγονός ότι το scoop του παγωτού χρησιμοποιείται για όλες τις γεύσεις και τοποθετείται σε ένα ποτήρι με νερό μετά από κάθε χρήση και διατηρείται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.
- Οι θερμοκρασίες συντήρησης ίσως να μην είναι οι κατάλληλες.
- Η μη εκπαίδευση του προσωπικού σε θέματα υγιεινής και ασφάλειας τροφίμων.
- Η συσκευασία πωλησης να μην έχει αποστειρωθεί σωστά και να υπάρχει επιμόλυνση του περιεχομένου.

4.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.

4.1 Ξενόγλωσση βιβλιογραφία.

1.Norton, D. M., & Braden, C. R. (2007). Foodborne listeriosis. In E. T. Ryser, & E. H. Marth(Eds.), *Listeria*, listeriosis, and food safety.

2.Ramaswamy, V., Cresence, V. M., Reijitha, J. S., Lekshmi, M. U., Dharsana, K. S., Prasad, S. P., et al. (2007). *Listeria*-review of epidemiology and pathogenesis. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*.

3.Wesley, I. (2009). Public health impact of food-borne illness: impetus for the international food safety effort. In N. Heredia, I. Wesley, & S. Garcia (Eds.), *Microbiologically safe foods* (pp. 3e13). United States of America: Wiley, A John Wiley & Sons, Inc.

4.EFSA European Food Safety Authority. (2011). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2009. *EFSA Journal*.

5.EFSA European Food Safety Authority. (2012). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2010. *EFSA Journal*.

6.Ooi, S. T., & Lorber, B. (2005). Gastroenteritis due to *Listeria monocytogenes*. *Clinical Infectious Diseases*.

7.Maijala, R., Lyytikäinen, O., Johansson, T., Autio, T., Aalto, T., Haavisto, L., et al. (2001). Exposure of *Listeria monocytogenes* within an epidemic caused by butter in Finland. *International Journal of Food Microbiology*.

8.Gellin BG, Broome CV, Bibb WF, et al. (1991)The epidemiology of listeriosis in the United States, 1986. *Am J Epidemiol*.

9.Dawson KG, Emerson JC, Burns JL. (1999)Fifteen years of experience with bacterial meningitis. *Pediatr Infect Dis J*.

10.Anaissie E, Kontoyiannis DP, Kantarjian H, et al.(1992) Listeriosis in patients with chronic lymphocytic leukemia who were treated with fludarabine and prednisone. *Ann Intern Med*.

11.Ho JL, Shands KN, Friedland G, et al. (1986) An outbreak of type 4b *Listeria monocytogenes* infection involving patients from eight Boston hospitals. *Arch Intern Med*.

- 12.Evans JR, Allen AC, Stinson DA, et al.**(1985) Perinatal listeriosis: report of an outbreak. *Pediatr Infect Dis.*
- 13.McLauchlin J.**(1990) Human listeriosis in Britain, 1967-85, a summary of 722 cases. Listeriosis during pregnancy and in the newborn. *Epidemiol Infect.*
- 14.Linnan JM, Mascola L, Lou XD, et al.**(1988)Epidemic listeriosis associated with Mexican-style cheese. *N Engl J Med.*
- 15.Goulet V, Marchetti P.**(1996) Listeriosis in 225 non-pregnant patients in 1992: clinical aspects and outcome in relation to predisposing conditions. *Scand J Infect Dis.*
- 16.Schmidt K and Tirado C.** (2001) WHO Surveillance Programme for Control of Foodborne Infections and Intoxications in Foodborne Disease Prevention. *International Journal of Food Microbiology.*
- 17.Stallings, W. S.**(1979) Ice Creams and Water Ices in 17th and 18th Century England. London: Prospect Books. Issued as a supplement to *Petites propos culinaires* 3.
- 18.G.D. Miller, J.K. Jarvis & L.D. McBean.**(2000)“Dairy Foods and Nutrition”, second edition, National Dairy Council, CRC,Press.
- 19.Tuba Erkaya,Elif Dağdemir, Mustafa Şengül.**(2011)Influence of Cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.) addition on the chemical and sensory characteristics and mineral.
- 20.Anil Pooran, Nadira Seepersadsingh, Karla Georges and Abiodun A. Adesiyun.** (2012)Evaluation of the bacteriological quality of ice cream sold in Trinidad,
- 21.Hennessy,T.W.,C,W.Hendberg, L slutsker, K.W. White, M.S. Besser-wiek, M.E.Moen, F.B.S. John,W.W. Coleman, L.M Edmonson, K.L. MacDonald and M.T. Osterholm.**(1996). A national outbreak of salmonella enteritidis infection from ice cream.
- 22.Dijuretic ,T, and P.G. Wall and G , Nichols.**(1997), General outbreaks of infectious intestinal diseases associated with milk and dairy products in England and Wales 1992-1996.
- 23.Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology,** (1986).
- 24.Jones, D.** (1988). The place of *Listeria* among gram-positive bacteria. *Infection* 16
- 25.Jay, M.J.**(2000). Modern food microbiology,6th edition. Aspen Publishers Inc., Gaithersburg, MD.
- 26.Seeloger HPR. And Jones D.** (1992). Ch.71 The genus *Listeria* in the Prokaryotes 2nd edition. A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation,Identification, Applications (Ed.Ballows A., Truper H.G., Dworkin M.,Harder W., and Schleifer K.) New York Springer-Hafner.

- 27.Faber, J.M , and Peterkin , P.I.** (1991). *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen Microbiology.
- 28.Adams M.R. & Moss M.O.,** 5th edition, (1995). Food Microbiology. The Royal Society of Chemistry.
- 29.Hudson, J. A., Mott, S. J., and Penney, N.** (1994). Growth of *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila*, and *Yersinia enterocolitica* on vacuum and saturated carbon dioxide controlled atmosphere-packaged sliced roast beef. J. Food Prot. 57: 204-208.
- 30.Tienungoon, S., Ratkowsky, D. A., McMeekin, T. A., and Ross, T.** (2000). Growth limits of *Listeria monocytogenes* as a function of temperature, pH, NaCl, and lactic acid. Appl. Environ. Microbiol. 66: 4979-4987 .
- 31.Chan, Y. C., and Wiedmann, M.** (2009). Physiology and genetics of *Listeria monocytogenes* survival and growth at cold temperatures. Crit. Rev. Food Sci. 49: 237-253.
- 32.Lado, B. H., and Yousef, A. E.** (2007). Characteristics of *Listeria monocytogenes* important to food processors. In: E. T. Ryser, and E. H. Marth (ed.), *Listeria*, Listeriosis, and Food Safety. CRC Press, Boca Raton, FL. p. 157- 213.
- 33.Palumbo, S., and Williams, A. C.** (1991). Resistance of *Listeria monocytogenes* to freezing in foods. Food Microbiol.
- 34.Farber, J., Pagotto M. F., and Scherf, C.** (2007). Incidence and behavior of *Listeria monocytogenes* in meat products. In: E. T. Ryser, and E. H. Marth (ed.), *Listeria*, Listeriosis, and Food Safety. CRC Press, Boca Raton, FL. p. 503-570.
- 35.Parish, M. E., and Higgins, D. P.** (1989). Survival of *Listeria monocytogenes* in low pH model broth systems. J. Food Prot. 52: 144-147.
- 36.Lado, B. H., and Yousef, A. E.** (2007). Characteristics of *Listeria monocytogenes* important to food processors. In: E. T. Ryser, and E. H. Marth (ed.), *Listeria*, Listeriosis, and Food Safety. CRC Press, Boca Raton, FL. p. 157- 213.
- 37.Johnson, J. L., Doyle, M. P., Cassens, R. G., and Schoeni, J. L.** (1988). Fate of *Listeria monocytogenes* in tissues of experimentally infected cattle and in hard salami. Appl. Environ. Microbiol. 54: 497-501.
- 38.Caggia, C., Scifò, G. O., Restuccia, C., and Randazzo, C. L.** (2009). Growth of acid-adapted *Listeria monocytogenes* in orange juice and in minimally processed orange slices. Food Control 20: 59-66.

- 39.Gahan, C. G., O'Driscoll, B., and Hill, C.** (1996). Acid adaptation of *Listeria monocytogenes* can enhance survival in acidic foods and during milk fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 3128-3132.
- 40.Skandamis, P. N., Yoon, Y., Stopforth, J. D., Kendall, P. A., and Sofos, J. N.** (2008). Heat and acid tolerance of *Listeria monocytogenes* after exposure to single and multiple sublethal stresses. *Food Microbiol.* 25: 294-303.
- 41.Nolan, D.A., Chamblin, D.C., and Troller, J.A.** (1992). Minimal water activity levels for growth and survival of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*. *Int. J. Food Microbiol.* 16: 323-335.
- 42.Larson, A. E., Johnson, E. A., and Nelson, J. H.** (1999). Survival of *Listeria monocytogenes* in commercial cheese brines. *J. Dairy Sci.*
- 43.Schmid, B., Klumpp, J., Raimann, E., Loessner, M. J., Stephan, R., and Tasara, T.** (2009). Role of cold shock proteins in growth of *Listeria monocytogenes* under cold and osmotic stress conditions. *Appl. Environ. Microbiol.*
- 44.Sergelidis, D., and Abraham, A.** (2009). Adaptive response of *Listeria monocytogenes* to heat and its impact on food safety. *Food Control.*
- 45.Skandamis, P. N., Stopforth, J. D., Yoon, Y., Kendall, P. A., and Sofos, J. N.** (2009). Heat and acid tolerance responses of *Listeria monocytogenes* as affected by sequential exposure to hurdles during growth. *Food Tech.*
- 46.Heldman, D. R., and Newsome, R. L.** (2003). Kinetic models for microbial survival during processing. *Food Technol.*
- 47.Doyle, M. E., Mazzotta, A. S., Wang, T., Wiseman, D. W., and Scott, V. N.** (2001). Heat resistance of *Listeria monocytogenes*. *J. Food Pro.*
- 48.Bunčić, S., Avery, S. M., Rocourt, J., and Dimitrijevic, M.** (2001). Can food-related environmental factors induce different behavior in two key serovars, 4b and 1/2a, of *Listeria monocytogenes*? *Int. J. Food Microbiol.*
- 49.El-Shenawy, M. A., Yousef, A. E., and Marth, E. H.** (1989). Thermal injury and inactivation of *Listeria monocytogenes* in reconstituted nonfat dry milk. *Milchwissenschaft.*
- 50.Seeliger, H. P. R., and Höhne, K.** (1979). Serotyping of *Listeria monocytogenes* and related species. *Method. Microbio.*

- 51.Graves, L. M., Swaminathan, B., and Hunter, S. B. (2007).** Subtyping *Listeria monocytogenes*. In: E. T. Ryser, and E. H. Marth (ed.), *Listeria, Listeriosis, and Food Safety*. CRC Press, Boca Raton.
- 52.Doumith, M., Buchrieser, C., Glaser, P., Jacquet, C., and Martin, P. (2004).** Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.*
- 53.Gasanov, U., Hughes, D., and Hansbro, P. M. (2005).** Methods for the isolation and identification of *Listeria spp.* and *Listeria monocytogenes*. *FEMS Microbiol. Rev.*
- 54.Chen, J., Zhang, X., Mei, L., Jiang, L., and Fang, W. (2009).** Prevalence of *Listeria* in Chinese food products from 13 provinces between 2000 and 2007 and virulence characterization of *Listeria monocytogenes* isolates. *Foodborne Pathog.*
- 55.Miettinen, H., and Wirtanen, G. (2006).** Ecology of *Listeria spp.* in a fish farm and molecular typing of *L. monocytogenes* from fish farming and processing companies. *Int. J. Food Microbiol.*
- 56.Ramaswamy, V., Cresence, V. M., Reijitha, J. S., Lekshmi, M. U., Dharsana, K. S., Prasad, S. P., and Vijila, H. M. (2007).** *Listeria*- review of epidemiology and pathogenesis. *J. Microbiol. Immunol.*
- 57.Lyytikäinen, O., Autio, T., Maijala, R., Ruutu, P., Honkanen- Buzalski, T., Miettinen, M., Hatakka, M., Mikkola, J., Anttila, V.-J., Johansson, T., Rantala, L., Aalto, T., Korkeala, H., and Siitonen, A. (2000).** An outbreak of invasive *Listeria monocytogenes* serotype 3a infections from butter in Finland. *J. Infect. Dis.*
- 58.Lundén, J. M., Autio, T. J., and Korkeala, H.J. (2002).** Transfer of persistent *Listeria monocytogenes* contamination between food-processing plants associated with a dicing machine. *J. Food Prot.*
- 59.Rørvik, L. M., Aase, B., Alvestad, T., and Caugant, D.(2000).** Molecular epidemiological survey of *Listeria monocytogenes* in seafoods and seafood-processing plants. *Appl. Environ. Microbiol.*
- 60.Greer, G. G., Nattress, F., Dilts, B., and Baker, L. (2004).** Bacterial contamination of recirculating brine used in the commercial production of moisture-enhanced pork. *J. Food Prot.*
- 61.Donnely, C. W. and Nyachuba, D. G. (2007).** Conventional methods to detect and isolate *Listeria monocytogenes*. In: E. T. Ryser, and E. H. Marth (ed.), *Listeria, Listeriosis, and Food Safety*. CRC Press, Boca Raton.

- 62.Allerberger, F.** (2003). *Listeria*: growth, phenotypic differentiation and molecular microbiology. FEMS Immunol. Med. Microbiol.
- 63.Greenwood, M., Willis, C., Doswell, P., Allen, G., and Pathak, K.** (2005). Evaluation of chromogenic media for the detection of *Listeria* species in food. J. Appl. Microbiol.
- 64.Anonymous.** (1996a). Microbiology of food and animal feeding stuffs- Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*: Part 1. Detection method, ISO 11290-1.
- 65.Anonymous.** (1996b). Microbiology of food and animal feeding stuffs- Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*: Part 2. Enumeration method, ISO 11290-2.
- 66.O’Grady, J., Ruttledge, M., Sedano-Balbás, S., Smith, T. J., Barry, T., and Maher, M.** (2009). Rapid detection of *Listeria monocytogenes* in food using culture enrichment combined with real-time PCR. Food Microbiol.
- 67.Hof N, Nichterlein T, Kretschmar M.**(1997)Management of listeriosis. Clin Microbiol Rev.
- 68.Merle-Melet M, Dossou-Gbete L, Maurer P, et al.**(1996) Is amoxicillin-co-trimoxazole the most appropriate antibiotic regimen for *Listeria* meningoenephalitis? Review of 22 cases and the literature. J Infect.
- 69.Abbott S.** (2003) *Klebsiella,Enterobacter,Citrobacter,Serratia,Plesiomonas*,and other *Enterobacteriaceae*. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC. (ed.), Manual of Clinical Microbiology 8th edition 2003.ASM Press Wasihington D,C.
- 70.Farmer J.J**(2003) *Enterobacteriaceae* : Introduction and Identification. In Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC. (ed.) Manual of clinical Microbiology,8th edition 2003 ASM Press, Washington D.C.
- 71.Murray P. R., Rosenthal K. S., Kobayashi G. S., Pfaller M, A.**(1998) *Enterobareriaceae* in : Medical Microbiology Third edition, by Mosby Inc, Missouri,.
- 72.Bailey & Scott.**(2002) *Enterobacteriaceae*. In: Betty A. Forbes, Daniel F. Sahm, Alice S. Welssfeld (ed.) Diagnostic Microbiology. 11th Edition. By Mosby Inc, Missouri.
- 73.Müller H. E., Brenner D. J., Fanning G.R., Grimont P.A. D., and Kampfler P.**(1996) Emended description of *Buttiauxella argestis* with recognition of six new species of *Buttiauxella* and two new species of *Kluyvera*: *Buttiauxella ferragutiae* sp.nov, *Buttiauxella gagginiae* sp. No. *Buttiauxella brennerae* sp. nov, *Buttiauxella izardii* sp. nov,*Buttiauxella noackiae* sp. no., *Buttiauxella wormboldiae* sp. no. *Kluyvera cochleae* sp. nov. and *Kluyvera Georgiana* sp. nov., Int J.Syst Bacteriology.

74.Martinez-Murcia A. J, Beniloch S., and Collins M.D.(1992) Phylogenetic interrelationships of members of the genera *Aeromonas* and *Plesiomonas* as determined by 16S ribosomal DNA sequencing : lack of congruence with results of DNA-DNA hybridizations. Int J. Syst. Bacteriol.

75.Waites KB et al.,(2002) Manual of Commercial Methods of Clinical Microbiology. American Society for Microbiology Washington, D.C.

76.David M.Rollins (2000) *Enterobacteriaceae*. BSCI 424 Pathogenic Microbiology.

77.MacFaddin,J.F.(2000) Biochemical tests for identification of medical bacteria,3rd ed Lippincott Williams& Wilkins, Baltimore.

78.Eisenstein B. I. And Zaleznik D.F. (2000)*Enterobacteriaceae*. In: Mandell, Douglas and Bennett (ed) Principles and Practice of Infectious Diseases Fifth edition.

79. Walstra P. et al. (1999) Dairy Technology : Principle of milk properties and Process Marcell Dekker . New York ..

4.2 Ελληνική βιβλιογραφία.

1.Λεοναρδόπουλος I., Κούρτη E.(1999)Εντεροβακτηριακα . In: Ιατρική Μικροβιολογία. Αντωνιάδης Α., Αντωνιάδης Γρ., Λεγάκης Ν., Τσελέντης Ι. Τόμος ΙΙ. Ιατρικές εκδόσεις Πασχαλίδης. Αθήνα,. σ. 91-120.

2.Αρσένη Α. (1994)*Enterobacteriaceae* I. Κλινική Μικροβιολογία και Εργαστηριακή Διάγνωση Λοιμώξεων. Τέταρτη έκδοση. Αθήνα, Ιατρικές εκδόσεις Ζήτα Τόμος Ι . σ.233-276.

3.Παπαπαναγιώτου Ι, Κυριαζοπούλου –Δαλαΐνα Β. (2001) Εντεροβακτηριοειδή. In: Ιατρική Μικροβιολογία & Ιολογία 1^η έκδοση University Studio Press, Θεσσαλονίκη, σ 91-118.

4.Βαβάτση-Χριστάκη Ν.(1998) PCR. Μικροβιολογικά Χρονικά, Θεσσαλονίκη, Τόμος 14^{ος} , σ 245-246.

5.Αρσένη Α. (1994) *Enterobacteriaceae* ΙΙ. Κλινική Μικροβιολογία και Εργαστηριακή Διάγνωση Λοιμώξεων. Τέταρτη έκδοση, Αθήνα, Ιατρικές εκδόσεις Ζήτα, Τόμος Ι σ. 276-309.

6.Αρσένη Α. (1994)*Enterobacteriaceae* III. Κλινική Μικροβιολογία και Εργαστηριακή Διάγνωση Λοιμώξεων. Τέταρτη έκδοση . Αθήνα, Ιατρικές εκδόσεις Ζήτα, Τόμος Ι σ. 309-356.

7.Αρσένη Α. (1994). κλινική Μικροβιολογία και Εργαστηριακή Διάγνωση Λοιμώξεων Τόμος 1 (Τέταρτη έκδοση) Ζητά Ιατρικές Εκδόσεις.

8.Αντώνιος Ι. Μαντής (.2003)Υγιεινή και τεχνολογία του γάλακτος και των προϊόντων του.

9.Έρευνα της ICAP ,(2002), δημοσιεύτηκε στην εφημερίδα ΕΘΝΟΣ στις 21/6/2003.

10. Μάντης,Α. (2000)Υγιεινή και Τεχνολογία του Γάλακτος και των προϊόντων του. 3η Έκδοση, Εκδοτικός Οίκος Αδερφών Κυριακίδη, Θεσσαλονίκη.

4.3 Ηλεκτρονικές διευθύνσεις

1.www.efet.gr