



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών

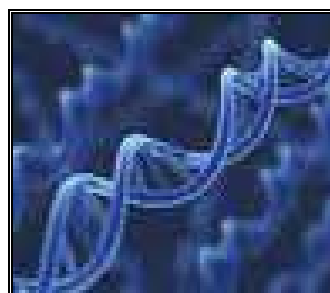
του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ, ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΕΝΤΕΡΟΠΑΘΟΓΟΝΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΣΕ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΜΕΝΑ
ΤΡΟΦΙΜΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ ΜΕ ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ**



ΒΑΪΟΥ ΜΑΡΙΑ

Λάρισα 2010

**Ανίχνευση εντεροπαθογόνων βακτηρίων σε επεξεργασμένα τρόφιμα
φυτικής προέλευσης με μοριακές μεθόδους**

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΓΙΑΝΝΟΥΛΗ ΠΕΡΣΕΦΟΝΗ (ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ)

Επίκουρος καθηγήτρια, Διευθύντρια Εργαστηρίου Τεχνολογίας και Ελέγχου Ποιότητας και Ασφάλειας Τροφίμων
Τμήμα Γεωπονίας, Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΜΑΡΚΟΥΛΑΤΟΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ

Καθηγητής Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας με έμφαση στη Βιοτεχνολογία
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΠΕΤΕΙΝΑΚΗ ΕΥΘΥΜΙΑ

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας
Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Σαν ελάχιστο δείγμα εκτίμησης και ευγνωμοσύνης απευθύνω τις πιο θερμές μου ευχαριστίες μου στην επιβλέπουσα της μεταπτυχιακής μου διατριβής κ. Γιαννούλη Περσεφόνη, Επίκουρο Καθηγήτρια, Διευθύντρια Εργαστηρίου Τεχνολογίας και Ελέγχου Ποιότητας και Ασφάλειας Τροφίμων του Τμήματος Γεωπονίας, Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για την έμπρακτη υποστήριξη και βοήθειά της, το αμέριστο ενδιαφέρον της και τη συμβολή της στον σχεδιασμό και στη διεξαγωγή των πειραμάτων καθώς και στη τελική διαμόρφωση και διόρθωση του κειμένου της εργασίας, της οποίας υπήρξε εμπνευστής.

Επίσης, θα ήθελα να απευθύνω τις θερμές μου ευχαριστίες στην κ. Πετεινάκη Ευθυμία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής για την συνδρομή της στο μικροβιολογικό κομμάτι της παρούσας εργασίας, παρά τον εργασιακό της φόρτο εκείνη την περίοδο λόγω της έξαρσης του ιού της γρίπης των χοίρων.

Επιπλέον, ευχαριστώ θερμά τον κ. Μαρκουλάτο Παναγιώτη, Καθηγητή Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας με έμφαση στη Βιοτεχνολογία του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, για τη συνηγόρησή του στην ανάληψη της παρούσας εργασίας.

Δεν μπορώ επίσης να παραλείψω να ευχαριστήσω θερμά και τον κ. Λιάκο Παναγιώτη, Επίκουρο Καθηγητή Ιατρικής Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για το αδιάλειπτο ενδιαφέρον του, τις εποικοδομητικές παρατηρήσεις του και την παροχή εξειδικευμένων γνώσεων στην πραγματοποίηση της παρούσας μελέτης.

Τέλος, ευχαριστίες οφείλω για την βοήθειά τους και για την πολύ καλή συνεργασία στις κ. Σοφία Γκούγκουρα, μεταδιδακτορική ερευνήτρια και κ. Μαρία Σταυροπούλου, Τεχνολόγο Ιατρικών Εργαστηρίων.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη	8
1. Εισαγωγή	10
1.1 Τρόφιμα	10
1.1.1. Τρόφιμα φυτικής προέλευσης	10
1.1.2. Επεξεργασία τροφίμων	10
1.1.3. Τρόφιμα φυτικής προέλευσης που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη	13
1.2 Τρόφιμα και παθογόνοι μικροοργανισμοί	15
1.2.1. Τροφογενείς ασθένειες	15
1.2.2. Παθογόνοι μικροοργανισμοί	17
1.2.3. Εντεροπαθογόνα βακτήρια	19
1.2.3.1 Παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη των βακτηρίων στα τρόφιμα	19
1.2.3.2 Gram ⁺ σποριογονικά βακτήρια	21
1.2.3.3 <i>Escherichia coli</i> O157:H7	22
1.2.3.4 <i>Listeria monocytogenes</i>	23
1.2.3.5 <i>Campylobacter jejuni</i>	23
1.2.3.6 <i>Yersinia enterocolitica</i> , <i>Vibrio species</i> , <i>Shigella species</i>	23
1.2.3.7 <i>Salmonella</i>	24
1.2.3.7.1 Ταξινόμηση	24
1.2.3.7.2 Παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη της <i>Salmonella</i>	25
1.2.3.7.3 Πηγές μόλυνσης των τροφίμων με <i>Salmonella</i>	26
1.2.3.7.4 Εξάρσεις τροφογενούς σαλμονέλλωσης (Foodborne outbreaks)	26
1.2.3.7.5 Παθογένεση της <i>Salmonella</i> -Χαρακτηριστικά των ασθενειών	29
1.2.3.7.6 Μολυσματικοί παράγοντες	30
1.2.3.8 <i>Staphylococcus aureus</i>	32
1.2.3.8.1 Δομή του <i>Staphylococcus aureus</i>	33
1.2.3.8.2 Πηγές μόλυνσης των τροφίμων με <i>Staphylococcus aureus</i>	35
1.2.3.8.3 Σταφυλοκοκκικές τροφικές δηλητηριάσεις	35
1.3 Μέθοδοι ανίχνευσης των παθογόνων βακτηρίων στα τρόφιμα	36
1.3.1. Μικροβιολογικές μέθοδοι	36
1.3.2. Βιοχημικές δοκιμασίες, ειδικά υποστρώματα και μέσα	38
1.3.3. Μοριακές μέθοδοι	40
1.3.3.1 Μέθοδοι υβριδισμού	40
1.3.3.2 Polymerase Chain Reaction (PCR)	42
1.3.3.2.1 Πλεονεκτήματα και περιορισμοί της εφαρμογής της PCR στα τρόφιμα	43

1.3.3.2.2 Εφαρμογές της PCR για την ανίχνευση της <i>Salmonella</i> στα τρόφιμα	46
1.3.3.2.3 Εφαρμογές της PCR για την ανίχνευση του <i>Staphylococcus aureus</i> στα τρόφιμα	47
1.3.4. Άλλες μέθοδοι ενίσχυσης και ανοσοενζυμικές τεχνικές για την ανίχνευση των παθογόνων βακτηρίων στα τρόφιμα	49
1.4. Σκοπός	51
2. Υλικά και μέθοδοι	52
2.1 Δείγματα	52
2.1.1. Δείγματα επεξεργασμένων τροφίμων φυτικής προέλευσης	52
2.1.2. Στελέχη βακτηρίων	53
2.2. Μέθοδοι	53
2.2.1. Προετοιμασία των δειγμάτων τροφίμων	53
2.2.2. Καλλιέργεια σε στερεά θρεπτικά υλικά	53
2.2.2.1. Στερεά θρεπτικά υλικά ανάπτυξης των μικροοργανισμών	54
2.2.3. Απομόνωση του βακτηριακού DNA	55
2.2.4. Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός απομονωμένου DNA	56
2.2.5. Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης	56
2.2.6. Δοκιμασία για τον προσδιορισμό της ευαισθησίας της μεθόδου PCR για την ανίχνευση του βακτηριακού DNA των παθογόνων βακτηρίων <i>Salmonella</i> και <i>Staphylococcus aureus</i>	57
2.2.7. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR	58
2.2.8. Τεχνητή επιμόλυνση χαλβά Φαρσάλων με τα παθογόνα βακτήρια	58
a) <i>Salmonella</i> και b) <i>Staphylococcus aureus</i>	58
2.2.8.1. Πρότυπο θολερότητας McFarland	58
2.2.8.2. Τεχνητή επιμόλυνση του χαλβά Φαρσάλων με <i>Salmonella</i>	59
2.2.8.2.a Προετοιμασία του βακτηριακού εναιωρήματος	60
2.2.8.2.b Μέθοδος επιμόλυνσης του χαλβά	60
2.2.8.3. Τεχνητή επιμόλυνση του χαλβά Φαρσάλων με <i>Staphylococcus aureus</i>	61
2.2.8.3.a Προετοιμασία του βακτηριακού εναιωρήματος	61
2.2.8.2.b Μέθοδος επιμόλυνσης του χαλβά	61
3. Αποτελέσματα	62
3.1. Ανίχνευση των παθογόνων βακτηρίων <i>Salmonella</i> και <i>Staphylococcus aureus</i> σε δείγματα επεξεργασμένων τροφίμων φυτικής προέλευσης με μακροσκοπικό έλεγχο των καλλιεργητικών θρεπτικών υλικών	62
3.2. Προτύπωση των συνθηκών της PCR	65
3.3. Ανίχνευση των παθογόνων βακτηρίων <i>Salmonella</i> και <i>Staphylococcus aureus</i> σε δείγματα επεξεργασμένων τροφίμων φυτικής προέλευσης με τη μέθοδο της PCR	66
3.3.1. Ανίχνευση του παθογόνου βακτηρίου <i>Salmonella</i>	67
3.3.2. Ανίχνευση του παθογόνου βακτηρίου <i>Staphylococcus aureus</i>	70

3.4. Έλεγχος των επιπέδων ευαισθησίας της μεθόδου PCR για την ανίχνευση του βακτηριακού DNA των παθογόνων βακτηρίων <i>Salmonella</i> και <i>Staphylococcus aureus</i>	74
3.5. Έλεγχος των επιπέδων ευαισθησίας της μεθόδου PCR για την ανίχνευση των βακτηρίων <i>Salmonella</i> και <i>Staphylococcus aureus</i> σε χαλβά Φαρσάλων μετά από τεχνητή επιμόλυνση.....	76
3.5.1. Τεχνητή επιμόλυνση του χαλβά Φαρσάλων με το παθογόνο βακτήριο <i>Salmonella</i>	76
3.5.2. Τεχνητή επιμόλυνση του χαλβά Φαρσάλων με το παθογόνο βακτήριο <i>Staphylococcus aureus</i>	76
4. Συζήτηση	80
Βιβλιογραφία	85

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Από τα παθογόνα βακτήρια, ιδιαίτερης σημασίας είναι τα στελέχη του *Staphylococcus aureus* και τα είδη του γένους *Salmonella* καθώς αποτελούν τις κυριότερες αιτίες τροφογενών ασθενειών παγκοσμίως. Συνήθως, τροφικές λοιμώξεις από *Salmonella* αλλά και δηλητηριάσεις σταφυλοκοκκικής προέλευσης αποδίδονται σε μολυσμένα τρόφιμα ζωϊκής προέλευσης. Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια, παρατηρείται μία αύξηση της έξαρσης τροφογενών κρουσμάτων σαλμονέλλωσης και σταφυλοκοκκικής δηλητηρίασης που σχετίζονται με την κατανάλωση τροφίμων φυτικής προέλευσης, λόγω αλλαγών στις αγρονομικές πρακτικές και στις διαιτητικές συνήθειες, γεγονός που έχει στρέψει το ενδιαφέρον της διεθνούς έρευνας στην ανίχνευση αυτών των δύο παθογόνων στα συγκεκριμένα τρόφιμα. Ώθηση στην έρευνα αυτή έχει δώσει τα τελευταία χρόνια η εισαγωγή στο πεδίο διάγνωσης των βακτηρίων στα τρόφιμα, των λεγόμενων «γρήγορων τεχνικών», μεταξύ των οποίων, η PCR κατέχει την κυριότερη θέση. Στην παρούσα λοιπόν μελέτη εφαρμόστηκε η μέθοδος της PCR για την ανίχνευση των εντεροπαθογόνων βακτηρίων *Salmonella* και *S. aureus* σε επεξεργασμένα τρόφιμα φυτικής προέλευσης. Τα αποτελέσματα που λήφθηκαν από την PCR συγκρίθηκαν με εκείνα από τον μακροσκοπικό έλεγχο των καλλιεργητικών θρεπτικών υλικών. Επιλέχθηκαν να εξεταστούν δείγματα τροφίμων από προϊόντα που κυκλοφορούσαν στο εμπόριο. Οι συνθήκες αντίδρασης της PCR προτυπώθηκαν επιλέγοντας ζεύγη εκκινητών που στοχεύουν ειδικά στις αλληλουχίες *Its* και *nuc* των βακτηρίων *Salmonella* και *Staphylococcus aureus* αντίστοιχα. Συγκεκριμένα, το παθογόνο βακτήριο *Salmonella* δεν ανιχνεύτηκε με τον μακροσκοπικό έλεγχο των αντίστοιχων καλλιεργητικών θρεπτικών υλικών σε κανένα από τα υπό εξέταση δείγματα τροφίμων. Ωστόσο, τα αποτελέσματα από την αναζήτηση *Salmonella* με τη μέθοδο της PCR δείχνουν ότι το συγκεκριμένο βακτήριο ανιχνεύτηκε στο χαλβά Φαρσάλων με άμυλο αραβοσίτου. Για πρώτη φορά γίνεται η ανίχνευση *Salmonella* στο συγκεκριμένο είδος τροφίμου. Από την άλλη, το παθογόνο βακτήριο *Staphylococcus aureus* δεν ανιχνεύτηκε σε κανένα από τα υπό εξέταση δείγματα τροφίμων, τόσο με την εφαρμογή της μεθόδου PCR όσο και με την μακροσκοπική εξέταση των αντίστοιχων καλλιεργητικών θρεπτικών υλικών. Επίσης, έγιναν και οι πρώτες προσπάθειες εκτίμησης των επιπέδων ευαισθησίας της PCR για την ανίχνευση των συγκεκριμένων βακτηρίων, πραγματοποιώντας για πρώτη φορά τεχνητή επιμόλυνση δείγματος από χαλβά Φαρσάλων. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η ευαισθησία που επιτεύχθηκε ήταν υψηλή με ελάχιστο όριο ανίχνευσης για τη *Salmonella* ίσο με με 10^4 CFU/g μετά από εμπλουτισμό του δείγματος στο BPW, ενώ για τον *S. aureus* ίσο με 10^2 CFU/g μετά από εμπλουτισμό στο εκλεκτικό μέσο Giolitti Cantoni. Τέλος, εκτιμήθηκε και η ευαισθησία ανίχνευσης του βακτηριακού DNA των παθογόνων βακτηρίων *Salmonella* και *S. aureus* με τη μέθοδο της PCR, χρησιμοποιώντας DNA απομονωμένο από τους αντίστοιχους θετικούς μάρτυρες. Το ελάχιστο όριο ανίχνευσης της *Salmonella* και του *S. aureus* βρέθηκε ίσο με 100pg DNA και με 250 pg DNA αντίστοιχα. Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα αυτά θέτουν τις βάσεις για την ανάπτυξη μελλοντικά μίας γενικής μεθοδολογίας βασισμένης στην τεχνική της PCR με σκοπό την ανίχνευση των

παθογόνων βακτηρίων *Salmonella* και *Staphylococcus aureus* σε επεξεργασμένα
τρόφιμα φυτικής προέλευσης.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Τρόφιμα

Τα τρόφιμα είναι προϊόντα πρωτογενούς παραγωγής ή προϊόντα που προέρχονται από αυτά με κατάλληλη επεξεργασία. Τα θρεπτικά στοιχεία των τροφίμων αποτελούν οι πρωτεΐνες, τα λίπη, οι υδατάνθρακες, οι βιταμίνες, το νερό και τα ανόργανα στοιχεία ή άλατα. Με τα θρεπτικά τους στοιχεία τα τρόφιμα παρέχουν ενέργεια στον οργανισμό με τη διάσπαση των υδατανθράκων, των λιπών και των πρωτεϊνών, προάγουν την ανάπτυξη και τη συντήρηση του οργανισμού και ρυθμίζουν βασικές λειτουργίες του με τη συμβολή των πρωτεϊνών, των αλάτων και των βιταμινών. Επίσης, τα τρόφιμα είναι δυνατόν να περιέχουν και άλλα στοιχεία, όπως ένζυμα, φυτικές ίνες, οργανικά οξέα, χρωστικές, αρωματικές και άλλες ουσίες (Μπλούκας Ι.Γ.2004).

Έχουν προταθεί διάφορα συστήματα ταξινόμησης των χιλιάδων ειδών τροφίμων που καταναλώνει ο άνθρωπος. Έτσι, τα τρόφιμα διακρίνονται σε δύο κύριες κατηγορίες: τα τρόφιμα φυτικής προέλευσης και τα τρόφιμα ζωϊκής προέλευσης.

1.1.1 Τρόφιμα φυτικής προέλευσης

Τα τρόφιμα φυτικής προέλευσης, συγκριτικά με τα ζωϊκά προϊόντα αποτελούν σημαντική πηγή υδατανθράκων. Από αυτούς, το άμυλο παράγεται από όλα τα πράσινα φυτά και αποτελεί ένα σημαντικό συστατικό της ανθρώπινης διαίτας. Τρόφιμα πλούσια σε άμυλο είναι το ρύζι, το καλαμπόκι, το σιτάρι, το κάστανι, τα όσπρια, η πατάτα, η γλυκοπατάτα και η cassava.

Το άμυλο χρησιμεύει ως πηγή ενέργειας και είναι το αντίστοιχο του γλυκογόνου των ζώων. Συνιστά το 30-60% του καθαρού βάρους των αποξηραμένων φυτικών ιστών και αποτελείται κατά 20% περίπου από αμυλόζη και κατά 70% περίπου από αμυλοπηκτίνη. Το υπόλοιπο ~10-20% αποτελείται από νερό και μικρές ποσότητες φωσφορικών αλάτων, πυριτικού οξέος κ.λ.π. Το μόριο της αμυλόζης είναι γραμμικό και αποτελείται από μικρό αριθμό μονάδων γλυκόζης ενωμένων με $\alpha(1\rightarrow4)$ δεσμούς, ενώ το μόριο της αμυλοπηκτίνης είναι πολύ μεγαλύτερο και διακλαδισμένο. Οι γλυκοζιτικοί δεσμοί του κορμού της αλυσίδας είναι $\alpha(1\rightarrow4)$, ενώ των διακλαδώσεων $\alpha(1\rightarrow6)$. Στους αμυλόκοκκους η αμυλόζη και η αμυλοπηκτίνη έχουν ημικρυσταλλική διάταξη. Όταν ένα αιώρημα αμυλόκοκκων σε νερό θερμανθεί σε μία ορισμένη θερμοκρασία (θ. ζελατινοποίησης), το νερό εισδύει ανάμεσα στα μόρια αμυλόζης και αμυλοπηκτίνης και το αιώρημα μετατρέπεται σε πηκτή (Stephen A.M. 1995, Μαρκάκη Π. 1996).

1.1.2 Επεξεργασία τροφίμων

Ως επεξεργασία των τροφίμων ορίζεται το σύνολο των διαδικασιών με τις οποίες οι ακατέργαστες ουσίες που αποτελούν τροφή για τον άνθρωπο μετατρέπονται σε προϊόντα κατάλληλα για κατανάλωση, μαγείρεμα ή αποθήκευση, δηλαδή σε τρόφιμα. Η επεξεργασία των τροφίμων περιλαμβάνει γενικά την βασική προετοιμασία των

τροφίμων, τη μετατροπή της μίας μορφής ενός τροφίμου σε άλλη και τις τεχνικές συντήρησης και αποθήκευσης. Η επιλογή της κατάλληλης μεθόδου επεξεργασίας και συντήρησης για ένα συγκεκριμένο προϊόν εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως είναι η φυσική και χημική σύσταση του προϊόντος, ο επιδιωκόμενος στόχος, ο χρόνος που μπορεί να συντηρηθεί το προϊόν με τη συγκεκριμένη μέθοδο, η αποτελεσματικότητα της μεθόδου να διασφαλίζει την υγεία του καταναλωτή, να διατηρεί τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του προϊόντος και να ελαχιστοποιεί τις απώλειες σε θρεπτικά στοιχεία και το κόστος (Μπλούκας Ι.Γ.2004) . Ορισμένες από τις μεθόδους επεξεργασίας και συντήρησης που υφίστανται τα τρόφιμα παρουσιάζονται παρακάτω.

➤ **Συμπύκνωση:** Ως συμπύκνωση χαρακτηρίζεται η επεξεργασία απομάκρυνσης από τα τρόφιμα ενός μέρους του νερού που περιέχουν. Η περιεκτικότητα σε υγρασία στα συμπυκνωμένα προϊόντα κατά κανόνα διατηρείται πάνω από 20-30%, με αποτέλεσμα αυτά να παραμένουν ρευστά. Η μείωση της δραστηριότητας του νερού (a_w) που επέρχεται με τη συμπύκνωση συμβάλλει στη μικροβιολογική σταθερότητα του προϊόντος σε συνδυασμό με άλλη μέθοδο συντήρησης. Η συμπύκνωση των τροφίμων μπορεί να γίνει: **α)** με εξάτμιση, **β)** με κατάψυξη και διαχωρισμό των παγοκρυστάλλων και **γ)** με ημιπερατές μεμβράνες.

Ως εξάτμιση ορίζεται η μερική απομάκρυνση του νερού από το τρόφιμο με τη μορφή υδρατμών κάτω από συνθήκες βρασμού. Η εξάτμιση πραγματοποιείται μέσα στον εξατμιστή και εφαρμόζεται στη συμπύκνωση των χυμών φρούτων και λαχανικών, όπως στον τοματοχυμό, τον τοματοπολτό και στο συμπυκνωμένο χυμό πορτοκαλιού, στη συμπύκνωση της ζάχαρης και του αλατιού, στη συμπύκνωση του γάλακτος, στην παραγωγή της μαρμελάδας και των γλυκών του κουταλιού και στη συμπύκνωση εκχυλισμάτων και άλλων υγρών προϊόντων.

Στη συμπύκνωση με κατάψυξη το ρευστό προϊόν αρχικά καταψύχεται, με αποτέλεσμα μέρος του νερού που περιέχει να μετατρέπεται σε παγοκρυστάλλους. Οι παγοκρυστάλλοι στη συνέχεια μπορούν να απομακρυνθούν με κατάλληλη μέθοδο. Εφαρμόζεται κυρίως σε θερμοευαίσθητα τρόφιμα, όπως τα εκχυλίσματα και οι χυμοί φρούτων.

Στη συμπύκνωση των ρευστών προϊόντων με τη χρησιμοποίηση ημιπερατών μεμβρανών, το ρευστό προϊόν κινείται με εφαιπτόμενη ροή κατά μήκος της επιφάνειας της μεμβράνης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα ένα μέρος του ρευστού προϊόντος να διέρχεται μέσα από τη μεμβράνη ως διήθημα, ενώ το υπόλοιπο μέρος του ρευστού να μην μπορεί να διέλθει και να αποτελεί το συμπύκνωμα. Εφαρμόζεται κυρίως στη συμπύκνωση χυμών φρούτων, ενζύμων, αμύλου, γάλακτος, καφέ, σιροπιών και ασπραδιού αυγών (Μπλούκας Ι.Γ.2004).

➤ **Αφυδάτωση:** Χαρακτηρίζεται η μέθοδος συντήρησης που στηρίζεται στην απομάκρυνση του νερού από τα τρόφιμα, έτσι ώστε η υγρασία τους να μειωθεί σε πολύ χαμηλά επίπεδα και τα προϊόντα να καταστούν στερεά. Με τον τρόπο αυτό, μειώνεται η δραστηριότητα νερού του τροφίμου σε τιμές που αναστέλλεται η ανάπτυξη των μικροοργανισμών οι οποίοι θα μπορούσαν να αλλοιώσουν το προϊόν. Σε σχέση με τη

συμπύκνωση η αφυδάτωση διαφέρει στο ότι η ποσότητα νερού που απομακρύνεται είναι σημαντικά μεγαλύτερη και το τελικό προϊόν είναι πάντοτε στερεό, ικανό να συντηρηθεί σε συνθήκες περιβάλλοντος. Τρόφιμα που υφίστανται αφυδάτωση είναι τα φρούτα, τα λαχανικά, το βοδινό κρέας και πολλά αλιεύματα, τα προϊόντα γάλακτος τα εκχυλίσματα καφέ και τσαγιού και άλλα. Οι κύριοι μέθοδοι αφυδάτωσης των τροφίμων είναι: **α)** με την εφαρμογή θερμότητας, **β)** με ώσμωση και **γ)** με μηχανικά μέσα. Στην αφυδάτωση των τροφίμων με την εφαρμογή θερμότητας περιλαμβάνονται οι εξής επιμέρους μέθοδοι: i) ξήρανση στον ήλιο, ii) έκθεση του προϊόντος σε ρεύμα θερμού αέρα, iii) επαφή του προϊόντος με θερμή επιφάνεια, iv) έκθεση του προϊόντος σε μικροκύματα ή υπέρυθρη ακτινοβολία, v) αφυδάτωση με εκτόνωση και vi) λυοφιλίωση. Από αυτές η ξήρανση στον ήλιο αποτελεί την αρχαιότερη, απλούστερη και οικονομικότερη μέθοδο αφυδάτωσης των τροφίμων με φυσικό τρόπο. Εφαρμόζεται ακόμη και σήμερα για την αφυδάτωση φρούτων, λαχανικών, οσπρίων, σιτηρών και ξηρών καρπών (Μπλούκας Ι.Γ.2004, Μαρκάκη Π. 1996, Caballero B. et al. 2003).

➤ **Προσθήκη ουσιών που δεσμεύουν το νερό:** Ορισμένες τροφές συντηρούνται μέσω της προσθήκης αλατιού ή ζάχαρης, ώστε να μειωθεί η ενεργότητα του νερού σε αυτά. Οι τροφές που συντηρούνται με την προσθήκη ζάχαρης είναι κυρίως φρούτα, όπως μαρμελάδες, γλυκά του κουταλιού, ζελέ και κομπόστες. Εκείνες που συντηρούνται με αλάτι είναι ως επί το πλείστον κρέας και ψάρια (Caballero B. et al. 2003)

➤ **Θερμική Επεξεργασία:** Ορίζεται η θέρμανση που εφαρμόζεται στα τρόφιμα, σε ορισμένη θερμοκρασία και για ορισμένο χρόνο. Αποτελεί μία από τις σημαντικότερες μεθόδους επεξεργασίας και συντήρησης των τροφίμων, καθώς μπορούν να παραχθούν τρόφιμα χωρίς χημικά συντηρητικά, τα οποία όταν συσκευαστούν κατάλληλα σε αποστειρωμένους περιέκτες, μπορούν να διατηρηθούν για μεγάλο χρονικό διάστημα. Η θέρμανση εφαρμόζεται σε πολλές μεθόδους επεξεργασίας και συντήρησης των τροφίμων, όπως κατά το ζεμάτισμα, την αποστείρωση, την παστερίωση, την κονσερβοποίηση την ασηπτική επεξεργασία, τη συμπύκνωση με εξάτμιση, την αφυδάτωση και το μαγείρεμα των τροφίμων.

Μαγείρεμα: Με το μαγείρεμα επέρχονται στα τρόφιμα μεταβολές που βελτιώνουν τα οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά και την πεπτικότητά τους και τα κάνουν εδώδιμα και ελκυστικά. Κατά το μαγείρεμα των τροφίμων καταστρέφεται ορισμένος αριθμός μικροοργανισμών και σε ορισμένες περιπτώσεις αποβάλλεται υγρασία με αποτέλεσμα τη μείωση της δραστηριότητας του νερού. Το μαγείρεμα μπορεί να γίνει με υγρή και ξηρή θέρμανση, με τη βοήθεια λιπών και ελαίων, με υπέρυθρη ακτινοβολία και με μικροκύματα. Οι μέθοδοι μαγειρέματος οι οποίες διαφέρουν μεταξύ τους ανάλογα με τον τρόπο θέρμανσης είναι το βράσιμο, το σιγοβράσιμο, το βράσιμο με ατμό, το βράσιμο υπό πίεση, το ψήσιμο, το τηγάνισμα και τα μικροκύματα (Μπλούκας Ι.Γ.2004).

➤ **Ζύμωση/Οξίνιση:** Διάφορα τρόφιμα παρασκευάζονται με ειδικές ζυμώσεις. Τα συγκεκριμένα τρόφιμα έχουν τελείως διαφορετικές οργανοληπτικές και θρεπτικές ιδιότητες και κατά κανόνα συντηρούνται καλύτερα από την αρχική ύλη από την οποία προήλθαν. Η τελευταία αυτή ιδιότητα οφείλεται στην μείωση του pH των τροφίμων,

λόγω της παραγωγής γαλακτικού οξέος από τη ζύμωση που υφίστανται οι υδατάνθρακες από τα ενζυμικά συστήματα ειδικών βακτηριακών στελεχών και ζυμών. Παραδείγματα προϊόντων ζύμωσης είναι διάφορα γαλακτομικά προϊόντα, όπως είναι το τυρί, το ανθότυρο, το γιαούρτι, το ξινόγαλο και διάφορα προϊόντα φυτικής προέλευσης, όπως είναι οι ελιές και το ξινολάχανο (*Madigan M.T. et al. 2005*).

1.1.3 Τρόφιμα φυτικής προέλευσης που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη

Τα τρόφιμα φυτικής προέλευσης που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη αναφέρονται στην ενότητα *Υλικά και Μέθοδοι*. Εδώ παρουσιάζονται αναλυτικά ορισμένα στοιχεία για το κάθε ένα τρόφιμο.

✓ **Ελιές:** Οι επιτραπέζιες ελιές αποτελούν σημαντικό τμήμα της Μεσογειακής διατροφής, ενώ η παγκόσμια παραγωγή τους κατά την περίοδο 2005/2006 έφτασε τους 1.762.000 τόνους (*Lopez A.L. et al. 2009*). Η περιεκτικότητά τους σε σάκχαρα, πρωτεΐνες, ανθοκυανιδίνες, βιταμίνες και φαινολικά συστατικά είναι πλήρως ισορροπημένη και προσαρμοσμένη στις θρεπτικές ανάγκες του ανθρώπου (*Unal K. and Nergiz C. 2003*). Ο καρπός της ελιάς σπάνια μπορεί να καταναλωθεί χωρίς να υποστεί επεξεργασία που θα τον κάνει πιο γευστικό αλλά και που θα τον διατηρήσει για μεγάλο χρονικό διάστημα. Τρείς είναι οι κύριες τεχνικές βιομηχανικής επεξεργασίας που υφίσταται το προϊόν: η ισπανικού τύπου (Spanish style) τεχνική, η τύπου Καλιφόρνιας (Californian style) και η ελληνικού τύπου (Greek Style). Η ισπανικού τύπου τεχνική επεξεργασίας περιλαμβάνει ξεπίκρισμα των ελιών σε διάλυμα NaOH, ξέπλυμα για την απομάκρυνσή του NaOH, ζύμωση στην άρμη, διαλογή των ελιών ως προς το μέγεθός τους και τέλος πακετάρισμά τους. Στη μέθοδο Καλιφόρνιας, οι ελιές επεξεργάζονται σε διάλυμα NaOH, υφίστανται οξείδωση στον αέρα και ξεπλένονται πολύ καλά. Το χρώμα τους διατηρείται σε διάλυμα γλυκονικού σιδήρου, ενώ η συσκευασία τους απαιτεί αποστείρωση και άρμη. Τέλος, η ελληνική μέθοδος είναι πιο ήπια από τις δύο προηγούμενες και περιλαμβάνει το ξεπίκρισμα των ελιών με τρόπο φυσικό σε άρμη ακολουθούμενη από την οξείδωσή τους στον αέρα για την βελτίωση του χρώματος, τη διαλογή τους και το πακετάρισμά τους (*Boskou G. et al. 2006*).

✓ **Φασόλια ξερά:** Τα κοινά ξερά φασόλια παράγονται μετά από ξήρανση με φυσικό τρόπο των σπερμάτων κατά τη διάρκεια ωρίμανσης των καρπών των καλλιεργούμενων ειδών φασολιάς (*Roberts T.A. et al. 1998*). Αποτελούν σημαντικό τμήμα της Μεσογειακής διατροφής καθώς είναι πλούσια σε άμυλο, πρωτεΐνες, φυτικές ίνες, ανόργανα στοιχεία όπως Fe, K, Ca, Mg και Zn, θειαμίνη, βιταμίνη B6 και φολικό οξύ (*Reddy N.R. and Pierson M.D. 1984*).

✓ **Ρύζι:** Είναι το σιτηρό με την υψηλότερη παγκόσμια παραγωγή μετά το καλαμπόκι, αποτελώντας βασική τροφή για εκατομμύρια ανθρώπους στη ΝΑ Ασία, ενώ μεγάλες ποσότητές του καταναλώνονται και σε άλλα μέρη του κόσμου. Το ρύζι

αποτελεί βασικό τμήμα της ανθρώπινης διατροφής, λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς του σε άμυλο, πρωτεΐνες, λιπίδια, μεταλλικά στοιχεία και βιταμίνες. Το άλεσμα, η θερμική εξώθηση και το σιγοβράσιμο (parboiling) αποτελούν κοινές μέθοδοι βιομηχανικής επεξεργασίας του ρυζιού, ενώ το μαγείρεμα υπό πίεση και ο απλός βρασμός ή ο βρασμός σε ατμό αποτελούν συνήθεις μεθόδους οικιακής επεξεργασίας του (Sagum R. and Arcot J.2000). Από αυτές το άλεσμα συνιστά την κυριότερη διαδικασία επεξεργασίας του ρυζιού, προκειμένου να μπορεί να μαγειρευτεί εύκολα και να μετατραπεί σε ελκυστική τροφή. Το πρώτο βήμα της άλεσης είναι η απομάκρυνση του εξωτερικού φλοιού του κόκκου και το προϊόν που προκύπτει είναι γνωστό ως «καφέ ρύζι». Συνέχιση της διαδικασίας αλέσματος έχει ως αποτέλεσμα τον αποχωρισμό του εδώδιμου ενδοσπερμίου από το «πίτουρο», δηλαδή από τα υπόλοιπα εξωτερικά περιβλήματα και το έμβρυο και το προϊόν που προκύπτει είναι το «αλεσμένο ή λευκό ρύζι».

✓ **Ξηροί καρποί:** Η κατανάλωση ξηρών καρπών στις χώρες της Ε.Ε έχει αυξηθεί σημαντικά. Το 2006 η κατανάλωση ξηρών καρπών έφτασε τα 2.2 εκ. τόνους, μία αύξηση περίπου 10% συγκρινόμενη με τα δεδομένα του 2002 (Little C.L. et al. 2010). Είναι πλούσια σε ω3 λιπαρά οξέα, βιταμίνες Ε και Β2, πρωτεΐνες, φυτικές ίνες και ανόργανα στοιχεία, όπως Mg, P, K, Cu και σελήνιο. Οι ξηροί καρποί υφίστανται ξήρανση με φυσικό τρόπο κατά τη διάρκεια της ωρίμανσής τους, ώστε να επιτευχθεί ενεργότητα νερού αρκετά χαμηλή και ίση περίπου με 0.7. Σε σπάνιες περιπτώσεις μπορεί να εφαρμοστεί και ξήρανση με μηχανικά μέσα, όταν δεν το επιτρέπει το κλίμα μίας περιοχής. Κατόπιν, μπορούν να υποστούν επεξεργασία είτε με την προσθήκη χημικών συντηρητικών, είτε με την εφαρμογή θερμότητας και τέλος ακολουθεί η συσκευασία τους (Little C.L. et al. 2010).

✓ **Ντομάτα:** Είναι το δεύτερο πιο διαδεδομένο λαχανικό σε παγκόσμια κλίμακα μετά την πατάτα. Η θρεπτική της αξία είναι μεγάλη, καθώς είναι πλούσια σε καροτενοειδή, οργανικά οξέα και φαινολικά συστατικά (Ordóñez-Santos L.E et al. 2009). Οι κύριες μέθοδοι επεξεργασίας της βασίζονται στην απομάκρυνση του νερού με την εφαρμογή θερμότητας και περιλαμβάνουν κυρίως τη συμπύκνωσή της για την παραγωγή πάστας, πουρέ, πολτού και την ξήρανσή της για την παραγωγή αποξηραμένου προϊόντος ή σκόνης.

✓ **Χαλβάς Φαρσάλων (σαπουνέ):** Είναι ένα παραδοσιακό προϊόν της πόλης των Φαρσάλων. Είναι γνωστός και ως πανηγυριώτικος, επειδή παλαιότερα συνήθιζαν να τον προσφέρουν στα πανηγύρια. Παρασκευάζεται με βασικά υλικά το άμυλο, το βούτυρο, το νερό και τη ζάχαρη και το ψήσιμό του πραγματοποιείται σε πολύ υψηλές θερμοκρασίες. Συνήθως, προστίθενται μέσα στον χαλβά και διάφοροι ξηροί καρποί (κυρίως αμύγδαλα). Το άμυλο που χρησιμοποιείται κυρίως για την παρασκευή του προέρχεται από το καλαμπόκι (εμπορική ονομασία «νισεστές»), ενώ και άλλων ειδών άμυλα μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν, όπως είναι το άμυλο ρυζιού ή πατάτας

✓ **Γλυκό του κουταλιού:** Για την παρασκευή των γλυκών του κουταλιού μπορούν να χρησιμοποιηθούν φρούτα ή διάφορα μέρη τους, ορισμένα λαχανικά, πέταλα λουλουδιών και ανώριμοι πράσινοι καρποί, όπως είναι το κάστανο, τα φουντούκια, τα καρύδια και άλλα. Η συνολική μέθοδος προετοιμασίας περιλαμβάνει το βράσιμο των φρούτων σε νερό με την προσθήκη ζάχαρης. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η ζάχαρη συντελεί στη συντήρηση του τροφίμου, προκαλώντας μείωση της ενεργότητας του νερού (Caballero B. et al. 2003).

1.2 Τρόφιμα και παθογόνοι μικροοργανισμοί

Αν οι συνθήκες προετοιμασίας, επεξεργασίας, συντήρησης, μεταφοράς και αποθήκευσης των τροφίμων δεν είναι κατάλληλες ή επαρκείς, τότε ενδέχεται να αναπτυχθούν σε αυτά παθογόνοι μικροοργανισμοί που με τη σειρά τους μπορεί να οδηγήσουν σε νόσους με υπολογίσιμα ποσοστά θνησιμότητας.

1.2.1 Τροφογενείς ασθένειες

Σήμερα, είναι γνωστό ότι πάνω από 200 γνωστές ασθένειες μεταδίδονται μέσω της κατανάλωσης των τροφίμων, ενώ οι κυριότεροι παράγοντες πρόκλησής τους περιλαμβάνουν τους παθογόνους μικροοργανισμούς στους οποίους ανήκουν τα βακτήρια, οι ιοί, τα παράσιτα και τα πρίον. Τα συμπτώματα μπορούν να κυμαίνονται από ήπια γαστρεντερίτιδα έως πιο σοβαρά και χρόνια προβλήματα, όπως μηνιγγίτιδα, αιμολυτικό ουρεμικό σύνδρομο, Guillain-Barre σύνδρομο ενώ μπορεί να προκληθεί ακόμη και ο θάνατος. Μικρότερης σημασίας είναι οι τοξίνες και τα μέταλλα, που ευθύνονται για ένα πολύ μικρό ποσοστό των τροφογενών ασθενειών (Mead P.S. et al. 1999, Rodriguez L.D. and Hernandez M. 2006, Altekruze S.F. et al. 1997).

Οι τροφογενείς ασθένειες (Foodborne diseases) «εξελίσσονται στο πιο σημαντικό ίσως παγκόσμιο πρόβλημα υγείας και σε έναν από τους κυριότερους παράγοντες πλήξης της οικονομίας στις σύγχρονες κοινωνίες», όπως επισημάνθηκε το 1983 από την ειδική επιτροπή των οργανώσεων Food and Agriculture Organization/World Health Organization. Πρόσφατες έρευνες έδειξαν ότι ετησίως στις αναπτυγμένες χώρες πάνω από το 10% του πληθυσμού νοσεί από τροφογενείς ασθένειες με τις εγκύους, τους ηλικιωμένους, τα παιδιά και τα ανοσοκατεσταλμένα άτομα να αποτελούν τις πιο ευαίσθητες ομάδες, ενώ η κατάσταση αυτή είναι πιο σοβαρή στις αναπτυσσόμενες χώρες (Kafirstein F.K. et al. 1997).

Οι τροφογενείς ασθένειες εκδηλώνονται είτε ως σποραδικά κρούσματα είτε ως επιδημίες μαζικής μορφής και εμφανίζουν ανοδική πορεία την τελευταία 20ετία. Η αύξηση τους οφείλεται στην μαζική παραγωγή και μαζική κατανάλωση των τροφίμων, στην κεντρική παραγωγή και διακίνησή τους σε όλο και μεγαλύτερη γεωγραφική έκταση, στην μαζική μετακίνηση πληθυσμών για διάφορους λόγους, στις δημογραφικές μεταβολές, στις αλλαγές των διαιτητικών συνηθειών, στην κατάρρευση των συστημάτων υγείας σε πολλές χώρες και στη προσαρμογή των παθογόνων

μικροοργανισμών στις σύγχρονες πρακτικές επεξεργασίας των τροφίμων στα αντιβιοτικά (Kaferstein F.K. et al. 1997, Altekruse S.F. et al. 1997).

Οι επιδημιολογικές έρευνες που διεξάγονται από τα συστήματα επιτήρησης των τροφογενών ασθενειών είναι βασικές για το σχεδιασμό αποτελεσματικών προγραμμάτων ασφάλειας τροφίμων καθώς παρέχουν πληροφορίες σχετικά με τα είδη των τροφίμων που εμπλέκονται σε τροφογενείς εξάρσεις, με τους πληθυσμούς που βρίσκονται σε κίνδυνο και με τις πρακτικές που οδηγούν σε ανάπτυξη και επιβίωση των παθογόνων μικροοργανισμών. Συγκεκριμένα, το Centers for disease Control and Prevention (CDCP) είναι μία ομοσπονδιακή αντιπροσωπεία που συλλέγει, αναλύει, συνοψίζει και εκθέτει τα στατιστικά δεδομένα από όλες τις ασθένειες που προσβάλλουν τον άνθρωπο. Το κυριότερο του σύστημα επιτήρησης των τροφογενών ασθενειών στις ΗΠΑ αποτελεί το Foodborne Active Surveillance Network (Foodnet) που ιδρύθηκε το 1996 και στο οποίο συμμετέχουν το Food Safety and Inspection Service of the US Department of Agriculture, το Food and Drug Administration (FDA) καθώς και άλλες κρατικές υπηρεσίες υγείας. Κύρια δράση του είναι η συλλογή δεδομένων από 9 παθογόνα (*Campylobacter*, *E. Coli O157:H7*, *L. monocytogenes*, *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio*, *Yersinia*, *Cryptosporidium*, *Cyclospora*) από sites σε 9 πολιτείες της Αμερικής (Caballero B. et al. 2003, Wallace D.J. et al. 2000, Beverly J. et al. 2004, Jay J.M. et al. 2005).

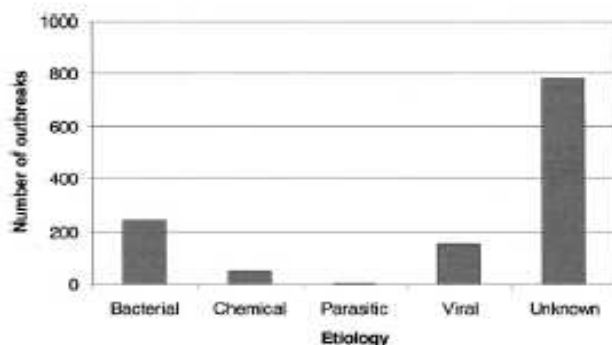
Αξίζει να αναφερθεί ότι στις ΗΠΑ, σύμφωνα με το CDCP, σημειώνονται ετησίως από την κατανάλωση τροφίμων περίπου 76 εκ. ασθένειες, 325000 νοσηλείες και 5000 θάνατοι, ενώ εκτιμάται ότι οι γνωστοί παθογόνοι μικροοργανισμοί ευθύνονται για 14 εκ. ασθένειες, 60000 νοσηλείες και 1800 θανάτους. Συγκεκριμένα, τα βακτήρια είναι υπεύθυνα για το 30% των τροφογενών ασθενειών, το 60% των νοσηλειών και το 72% των θανάτων, με τη *Salmonella*, τη *Listeria* και το *Toxoplasma* να είναι υπεύθυνα για περισσότερους από 1500 θανάτους κάθε χρόνο. Από την άλλη, οι ιοί ευθύνονται για το 67% των τροφογενών ασθενειών, το 34% των νοσηλειών και το 7% των θανάτων, ενώ για τα παράσιτα οι αριθμοί αυτοί είναι 3%, 5% και 21% αντίστοιχα (Πίνακας 1) (Jay J.M. et al. 2005, Mead P.S. et al. 1999).

Πίνακας 1: Εκτίμηση ετήσιας εμφάνισης τροφογενών νοσών στις ΗΠΑ (Mead P.S. et al.1999).

Disease or agent	Illnesses			Hospitalizations			Deaths		
	Total	Food-borne	% of total foodborne	Total	Food-borne	% of total foodborne	Total	Food-borne	% of total foodborne
Bacterial									
<i>Bacillus cereus</i>	27,360	27,360	0.2	8	8	0.0	0	0	0.0
Botulism, foodborne	58	58	0.0	46	46	0.1	4	4	0.2
<i>Brucella</i> spp.	1,554	777	0.0	122	61	0.1	11	6	0.3
<i>Campylobacter</i> spp.	2,453,926	1,963,141	14.2	13,174	10,539	17.3	124	99	5.5
<i>Clostridium perfringens</i>	248,520	248,520	1.8	41	41	0.1	7	7	0.4
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	73,480	62,458	0.5	2,168	1,843	3.0	61	52	2.9
<i>E. coli</i> , non-O157 STEC	36,740	31,229	0.2	1,084	921	1.5	30	26	1.4
<i>E. coli</i> , enterotoxigenic	79,420	55,594	0.4	21	15	0.0	0	0	0.0
<i>E. coli</i> , other diarrheogenic	79,420	23,826	0.2	21	6	0.0	0	0	0.0
<i>Listeria monocytogenes</i>	2,518	2,493	0.0	2,322	2,298	3.8	504	499	27.6
<i>Salmonella typhi</i>	824	659	0.0	618	494	0.8	3	3	0.1
<i>Salmonella</i> , nontyphoidal	1,412,498	1,341,873	9.7	16,430	15,608	25.6	582	553	30.6
<i>Shigella</i> spp.	448,240	89,648	0.6	6,231	1,246	2.0	70	14	0.8
Staphylococcus food poisoning	185,060	185,060	1.3	1,753	1,753	2.9	2	2	0.1
Streptococcus, foodborne	50,920	50,920	0.4	358	358	0.6	0	0	0.0
<i>Vibrio cholerae</i> , toxigenic	54	49	0.0	18	17	0.0	0	0	0.0
<i>V. vulnificus</i>	94	47	0.0	86	43	0.1	37	18	1.0
<i>Vibrio</i> , other	7,880	5,122	0.0	99	65	0.1	20	13	0.7
<i>Yersinia enterocolitica</i>	96,368	86,731	0.6	1,228	1,105	1.8	3	2	0.1
Subtotal	5,204,934	4,175,565	30.2	45,826	36,466	59.9	1,458	1,297	71.7
Parasitic									
<i>Cryptosporidium parvum</i>	300,000	30,000	0.2	1,989	199	0.3	66	7	0.4
<i>Cyclospora cayetanensis</i>	16,264	14,638	0.1	17	15	0.0	0	0	0.0
<i>Giardia lamblia</i>	2,000,000	200,000	1.4	5,000	500	0.8	10	1	0.1
<i>Toxoplasma gondii</i>	225,000	112,500	0.8	5,000	2,500	4.1	750	375	20.7
<i>Trichinella spiralis</i>	52	52	0.0	4	4	0.0	0	0	0.0
Subtotal	2,541,316	357,190	2.6	12,010	3,219	5.3	827	383	21.2
Viral									
Norwalk-like viruses	23,000,000	9,200,000	66.6	50,000	20,000	32.9	310	124	6.9
Rotavirus	3,900,000	39,000	0.3	50,000	500	0.8	30	0	0.0
Astrovirus	3,900,000	39,000	0.3	12,500	125	0.2	10	0	0.0
Hepatitis A	83,391	4,170	0.0	10,841	90	0.9	83	4	0.2
Subtotal	30,833,391	9,282,170	67.2	123,341	21,167	34.8	433	129	7.1
Grand Total	38,629,641	13,814,924	100.0	181,177	60,854	100.0	2,718	1,809	100.0

1.2.2 Παθογόνοι μικροοργανισμοί

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, σημαντικοί παράγοντες πρόκλησης των τροφογενών ασθενειών είναι οι παθογόνοι μικροοργανισμοί, στους οποίους ανήκουν τα βακτήρια, οι ιοί, τα παράσιτα και τα πρίον. Από αυτούς, σύμφωνα με το CDCP οι ιοί και τα βακτήρια αποτελούν τους πιο σημαντικούς παράγοντες πρόκλησης τροφογενών εξάρσεων, παρόλο που η αιτιολογία των περισσότερων κρουσμάτων που σημειώνονται δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί (Εικόνα 1) (Beverly J. et al. 2004).



Εικόνα 1: Παράγοντες πρόκλησης τροφογενών εξάρσεων (CDCP, 2001) (Beverly J. et al. 2004).

Περισσότερα από 40 είδη διαφορετικών βακτηρίων είναι γνωστό ότι προκαλούν τροφογενείς ασθένειες με πιο κοινά τα *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* και *Bacillus aureus*, τα οποία μπορούν να αναπτυχθούν σε τρόφιμα πλούσια σε πρωτεΐνες, όπως είναι το κρέας, τα πουλερικά, τα θαλασσινά, το γάλα και τα αυγά καθώς και στα περισσότερα τρόφιμα που έχουν υποστεί κάποιου είδους επεξεργασία (Rodriguez L.D. and Hernandez M. 2006, Caballero B. et al. 2003).

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, το 67% των τροφογενών λοιμώξεων που σημειώνονται στις ΗΠΑ είναι ιϊκής προέλευσης με το 99% να οφείλεται στους ιούς τύπου Norwalk που ανήκουν στην οικογένεια *Caliciviridae* (Beverly J. et al. 2004). Οι ροταϊοί, οι αστροϊοί και η ηπατίτιδα Α συνδέονται κάθε χρόνο με 100000 κρούσματα τροφογενών ασθενειών συνολικά (Madigan M.T. et al. 2005). Οι ιοί σχετίζονται κυρίως με θαλασσινά και χαμηλές θερμοκρασίες, ενώ το τρόφιμο μπορεί να μολυνθεί άμεσα από εργαζόμενο που έχει μολυνθεί με ιό ή έμμεσα όταν έρθει σε επαφή με ανεπεξέργαστα απόβλητα (Caballero B. et al. 2003, Ζεμπετάκης Γ. & Γδοντέλης Ν. 2006).

Ένας περιορισμένος αριθμός τροφογενών ασθενειών οφείλεται σε παράσιτα με σημαντικότερα τα *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium parvum* και *Cyclospora cayetanensis*, που εξαπλώνονται μέσω των τροφών, πιθανώς μέσω της μόλυνσης του νερού που χρησιμοποιείται για το ξέπλυμα, την άρδευση ή τον ψεκασμό των γεωργικών φυτών με κόπρανά. Τροφές που ενοχοποιούνται ως πηγές κυκλοσπορίωσης είναι ο βασιλικός, το μαρούλι και τα βατόμουρα. Επίσης, περισσότερο από το 1/3 των προκαλούμενων από *Toxoplasma gondii* λοιμώξεων οφείλεται σε κατανάλωση νωπού ή ανεπαρκώς μαγειρεμένου κρέατος. Έχει βρεθεί ότι το εξονυχιστικό μαγείρεμα των ωμών κρεάτων ή θαλασσινών και η συντήρηση των τροφίμων σε πολύ χαμηλές θερμοκρασίες μπορούν να οδηγήσουν σε καταστροφή όλων των παρασίτων (Caballero B. et al. 2003, Breslow L. 2002, Madigan M.T. et al. 2005.).

Μία ασθένεια που συνδέεται με τα πρίον και μεταδίδεται με την κατανάλωση βοδινού κρέατος από ζώα που έχουν προσβληθεί από σπογγώδη εγκεφαλοπάθεια των βοοειδών (BSE) είναι η VCJD (παραλλαγή της ασθένειας Creutzfeldt-Jakob). Πρόκειται για μία βραδεία εκφυλιστική νόσο του νευρικού συστήματος που προκάλεσε πάνω από 100 θανάτους στη Μ. Βρετανία και σε άλλες Ευρωπαϊκές χώρες. Αν και ο μηχανισμός αντιγραφής των πρίον δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως, φαίνεται ότι η κατανάλωση κρέατος που περιέχει πρίον της BSE προκαλεί με κάποιον τρόπο αλλαγές στη διαμόρφωση ορισμένων παραπλήσιων πρωτεϊνών του ανθρώπου, οδηγώντας στην εμφάνιση της νόσου (Caballero B. et al. 2003, Breslow L. 2002, Madigan M.T. et al. 2005.).

Άρα, όπως γίνεται αντιληπτό είναι πλέον αναγκαίος ο συστηματικός έλεγχος των διαδικασιών της παραγωγής και διανομής των τροφίμων για τον έλεγχο και την πρόληψη των τροφογενών ασθενειών. Μία συστηματική προσέγγιση αποτελεί η εφαρμογή του HACCP για την αναγνώριση και την εκτίμηση των κινδύνων που σχετίζονται με όλα τα στάδια παραγωγής ενός τροφίμου, εξασφαλίζοντας με αυτόν τον τρόπο την ασφάλεια των προϊόντων που φτάνουν στον τελικό καταναλωτή (Kaferstein F.K. et al. 1997).

1.2.3 Εντεροπαθογόνα βακτήρια

Τα παθογόνα βακτήρια προκαλούν στον άνθρωπο τροφικές δηλητηριάσεις και λοιμώξεις. Οι τροφικές δηλητηριάσεις προκαλούνται από παραγωγή τοξινών συγκεκριμένων βακτηρίων στα τρόφιμα, ενώ οι τροφικές λοιμώξεις (γαστρεντερίτιδες) προκαλούνται μετά από κατανάλωση τροφίμων μολυσμένων με εντεροπαθογόνα βακτήρια (Ζεμπετάκης Γ. & Γδοντέλης Ν. 2006). Παρακάτω αναφέρονται οι παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξή τους στα τρόφιμα και παρουσιάζονται αναλυτικά ορισμένα στοιχεία για τα πιο σημαντικά εντεροπαθογόνα βακτήρια.

1.2.3.1 Παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη των βακτηρίων στα τρόφιμα

➤ **pH:** Αποτελεί βασικό παράγοντα επιλογής των βακτηρίων που αναπτύσσονται στο τρόφιμο, καθώς επηρεάζει τις ενζυμικές λειτουργίες και τη μεταφορά των θρεπτικών μέσα στο κύτταρο. Τα περισσότερα βακτήρια αναπτύσσονται σε pH που μπορεί να κυμαίνεται από 4.5-9.0 με βέλτιστο από 6.5-7.5, ενώ ορισμένα αναπτύσσονται και σε pH<4. Τα φρούτα, οι χυμοί, το κρασί και το ξίδι είναι προϊόντα με αρκετά χαμηλό pH για να υποστηρίξουν την αύξηση των βακτηρίων, ενώ αντίθετα τα είδη κρέατος και τα θαλασσινά έχουν pH περίπου 5.6, αποτελώντας ιδανικό υπόστρωμα για την βακτηριακή ανάπτυξη. Έχει βρεθεί ότι η *Listeria monocytogenes* παρουσιάζει αρκετά μεγάλη αντοχή σε χαμηλά pH καθώς μπορεί να αναπτυχθεί και σε pH=4.3 (Jay M.J et al. 2005, Cotter P.D et al. 2002). Επίσης, τα εντεροαιμορραγικά στελέχη *E. coli* (EHEC) μπορούν να επιβιώσουν σε μία μεγάλη ποικιλία τιμών pH, καθώς έξαρση κρουσμάτων σημειώθηκε από το στέλεχος *E. coli* O157:H7 μετά από την κατανάλωση μηλίτη, ενός ιδιαίτερα όξινου προϊόντος με pH που κυμαίνεται από 3.7-3.9 (Besser R.E. et al. 1993).

➤ **Η περιεκτικότητα του τροφίμου σε νερό:** Οι απαιτήσεις των βακτηρίων σε υγρασία εκφράζονται χρησιμοποιώντας τον όρο ενεργότητα νερού (a_w), η οποία ορίζεται ως ο λόγος της τάσης ατμών του τροφίμου προς την τάση ατμών του καθαρού νερού στην ίδια θερμοκρασία και έχει τιμές από 0-1 (Μπλούκα Ι.Γ. 2004). Σε γενικές γραμμές τα βακτήρια χρειάζονται υψηλότερες τιμές a_w από ό,τι οι μύκητες με τα Gram⁻ να απαιτούν πιο υψηλές τιμές για την ανάπτυξή τους από ό,τι τα Gram⁺. Από τα παθογόνα βακτήρια ο *Staphylococcus aureus* μπορεί να αυξάνεται σε χαμηλές τιμές a_w ~0.86, αλλά προκαλείται αναστολή της έκκρισης της εντεροτοξίνης, η *Listeria monocytogenes* μπορεί να αναπτυχθεί σε τιμές a_w <0.93 και το εντεροαιμορραγικό στέλεχος της *E. coli* μπορεί να επιβιώσει σε μία μεγάλη ποικιλία τιμών a_w (Mao Y. et al. 2003, Jay J.M et al. 2005). Τα περισσότερα τρόφιμα έχουν ενεργότητα νερού από 0.90-0.99, ευνοώντας τη βακτηριακή ανάπτυξη, εκτός από τα φρούτα που είναι λιγότερο ευαίσθητα λόγω του πιο χαμηλού pH και της χαμηλής a_w που έχουν εξαιτίας της περιεκτικότητάς τους σε σάκχαρα. Μείωση της ενεργότητας νερού στο περιβάλλον των βακτηρίων παρεμποδίζει την πρόσληψη των θρεπτικών συστατικών και τις μεταβολικές

διεργασίες, ενώ αυξάνει την οσμωτική πίεση που ασκείται στην κυτταρική μεμβράνη, οδηγώντας σταδιακά στον θάνατο του βακτηρίου (Jay J.M et al. 2005, Bibek Ray 2004).

➤ **Οξειδοαναγωγικό δυναμικό:** Τα φρέσκα φυτικά προϊόντα διαθέτουν θετικό οξειδοαναγωγικό δυναμικό (Eh) που κυμαίνεται από +300-400mV, με αποτέλεσμα να μολύνονται κυρίως από μύκητες ή από αερόβια βακτήρια. Αντίθετα, το κρέας, η σάρκα των ψαριών, το γάλα και τα τυριά αποτελούν αναγωγικά περιβάλλοντα, με συνέπεια να κινδυνεύουν από προαιρετικά αναερόβια που προκαλούν οξίνιση ή από αυστηρά αναερόβια που προκαλούν σήψη, όπως είναι τα γένη του *Clostridium* (Jay J.M et al. 2005).

➤ **Η περιεκτικότητα του τροφίμου σε θρεπτικά και σε αντιμικροβιακά συστατικά-Βιολογική δομή των τροφίμων:** Τα βακτήρια για να αναπτυχθούν χρειάζονται νερό, πηγή άνθρακα, πηγή αζώτου, ιχνοστοιχεία και αυξητικούς παράγοντες, με τα Gram⁻ να παρουσιάζουν την χαμηλότερη απαίτηση ακολουθούμενα από τους μύκητες και τα Gram⁺. Ωστόσο, σε κάποια τρόφιμα η ανάπτυξη των βακτηρίων αναστέλλεται, χάρη στη φυσική παρουσία ενώσεων που παρουσιάζουν αντιμικροβιακή δράση. Παραδείγματα τέτοιων ενώσεων είναι η αλλισίνη στα σκόρδα, η κινναμική αλδεΐδη και η ευγενόλη στην κανέλλα, ο ισοθιακυνικός αλλυλεστέρας στη μουστάρδα, η λακτοφερίνη και η κονγκλουτίνη στο αγελαδινό γάλα (Jay J.M et al. 2005, Bibek Ray 2004).

➤ **Θερμοκρασία:** Ένας από τους κυριότερους παράγοντες ανάπτυξης των βακτηρίων στα τρόφιμα είναι η θερμοκρασία. Μελέτες έδειξαν ότι η *Listeria monocytogenes* μπορεί να επιβιώσει σε μία μεγάλη ποικιλία θερμοκρασιών από 1-45°C και ότι είναι πιο θερμοανθεκτική στα μέσα καλλιέργειας και στα τρόφιμα σε σχέση με άλλα μη σποριογόνα παθογόνα βακτήρια (Doyle M.E et al. 2002). Επίσης, οι Strong and Canada μελέτησαν την ικανότητα επιβίωσης του *Clostridium perfringens* σε πολύ χαμηλές θερμοκρασίες και βρέθηκε ότι μόνο το 4% των κυττάρων επιβίωσε για 180 μέρες στους 17.7 °C (Jay J.M et al. 2005). Σε μία άλλη μελέτη βρέθηκε ότι το στελέχος *E. coli* O157:H7 μπορεί να παράγει σε ικανοποιητικά επίπεδα την τοξίνη stx1 στους 37 °C στο γάλα και στο κρέας, αλλά όχι στους 25 °C και στους 30 °C (Weeratna R.D. and Doyle M.P 1991).

➤ **Σχετική υγρασία-σύσταση ατμοσφαιρικού αέρα στο χώρο διατήρησης των τροφίμων:** Η σχετική υγρασία (Relative humidity) είναι σημαντική παράμετρος, διότι επηρεάζει την ενεργότητα νερού των τροφίμων και κατά συνέπεια την βακτηριακή ανάπτυξη. Όταν τρόφιμα με χαμηλό a_w βρεθούν σε περιβάλλον με υψηλή RH, τότε απορροφούν υγρασία μέχρι να αποκατασταθεί ισορροπία, με αποτέλεσμα να αυξάνεται η a_w των τροφίμων και να καθίστανται πιο ευαλλοίωτα. Για το λόγο αυτό τρόφιμα που είναι ευαίσθητα σε επιφανειακή αλλοίωση από βακτήρια ή μύκητες θα πρέπει να αποθηκεύονται σε συνθήκες με χαμηλή RH ή εναλλακτικά θα πρέπει να διαφοροποιείται η σύσταση του ατμοσφαιρικού αέρα με τη χρήση CO₂ ή O₃ (τροποποιημένη ατμόσφαιρα) (Jay J.M et al. 2005). Μελέτες έδειξαν ότι το O₃ είναι πολύ ισχυρός οξειδωτικός και αντιμικροβιακός παράγοντας αφού προκάλεσε καταστροφή του στελέχους *E. coli* O157:H7 μέσα σε 20-50min όταν εφαρμόστηκε σε c= 3-18 ppm (Byun et al. 1998).

➤ **Παρουσία άλλων μικροοργανισμών:** Έχει βρεθεί ότι ορισμένοι μικροοργανισμοί παράγουν αντιβιοτικά, βακτηριοσίνες, H_2O_2 και οργανικά οξέα που αναστέλλουν την ανάπτυξη ορισμένων παθογόνων βακτηρίων. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι το *Clostridium botulinum* δεν μπορεί να αναπτυχθεί και να παράγει τις τοξίνες του παρουσία άλλων μικροοργανισμών. Ωστόσο, παρουσία των μυκήτων οι οποίοι παράγουν αυξητικούς παράγοντες παρατηρείται ανάπτυξη και παραγωγή τοξίνης από το συγκεκριμένο βακτήριο σε χαμηλό pH=4. Από την άλλη έχει αναφερθεί ότι βακτήρια του γαλακτικού οξέος μπορούν είτε να επάγουν την ανάπτυξη του *Clostridium botulinum* μέσω μείωσης του Eh, είτε να την αναστείλουν μέσω ανταγωνισμού (Jay J.M et al. 2005, Jos H.J and Huis in't Veld 1996).

1.2.3.2 Gram⁺ σποριογονικά βακτήρια

Η κατηγορία αυτή περιλαμβάνει τα *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum*, και *Bacillus cereus*, που ανήκουν στην οικογένεια *Bacillaceae* (Olsen J.E. et al. 1995).

Το *Clostridium perfringens* είναι ένας θετικός κατά Gram αναερόβιος σποριογονικός βάκιλλος που βρίθκει στο έδαφος και στο νερό, ενώ σε μικρούς αριθμούς επιβιώνει στον εντερικό σωλήνα πολλών ζώων. Με βάση το σχηματισμό 4 κύριων εξωτοξινών (α,β,ε,ι) διακρίνονται 5 τύποι (A,B,C,D,E), με τα στελέχη τύπου A να ευθύνονται για τις τροφικές δηλητηριάσεις. Σύμφωνα με το CDC τα συγκεκριμένα στελέχη αποτελούν το συνηθέστερο αίτιο τροφικών δηλητηριάσεων στις ΗΠΑ καθώς εκτιμάται ότι ετησίως ευθύνονται για 248000 κρούσματα, ενώ από το 1993-1994 έχουν σημειωθεί 40 τροφογενείς εξάρσεις. Το γονίδιο *cpe* που κωδικοποιεί για την εντεροτοξίνη perfringens (CPE), τον κύριο παράγοντα πρόκλησης της νόσου εντοπίζεται χρωμοσωμικά στα στελέχη τύπου A που ευθύνονται για τις τροφικές δηλητηριάσεις, ενώ στα στελέχη τύπου A που προκαλούν γαστρεντερίτιδες μη τροφογενείς βρίσκεται στο πλασμίδιο. Συγκεκριμένα, η εντεροτοξίνη CPE μέσω σχηματισμού μεμβρανικών συμπλεγμάτων επάγει αλλαγές στη διαπερατότητα του εντερικού επιθηλίου και είσοδο των Ca^{+2} στο εσωτερικό του κυττάρου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αλληλεπίδραση της CPE με την πρωτεΐνη των σφιχτών συνδέσεων, οκλουδίνη, σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο ~200kDa που προκαλεί την ενδοκύτωση της οκλουδίνης και την επακόλουθη καταστροφή των σφιχτών συνδέσεων, με συνέπεια την πρόκληση διάρροιας και κραμπών στο έντερο συνήθως χωρίς πυρετό ή εμετό. Η νόσος προκαλείται από την πρόσληψη υψηλών δόσεων του βακτηρίου ($>10^8$ κύτταρα) από μολυσμένα κρέατα, πουλερικά και ψάρια (Beverly J. et al. 2004, Aguilera M.O. et al. 2005, Jay J.M. et al. 2005, Doyle M.P. and Beuchat L.R. 2007).

Το *Clostridium botulinum* είναι ένα Gram⁺ αναερόβιο βακτήριο που επιβιώνει στο έδαφος και στο νερό, προκαλώντας μετά από κατανάλωση τροφίμων (π.χ. λαχανικά που διατηρούνται χωρίς οξίνιση, καπνιστά και ωμά ψάρια) που περιέχουν αλαντοτοξίνη σοβαρή τροφική δηλητηρίαση. Η συγκεκριμένη νευροτοξίνη δεσμεύεται στις προσυναπτικές τελικές μεμβράνες των νευρομυϊκών συνάψεων, αναστέλλοντας την απελευθέρωση της ακετυλοχολίνης και προκαλώντας το θάνατο μετά από αναπνευστική παράλυση ή καρδιακή ανακοπή. Νεογνική αλλαντίαση εμφανίζεται μετά από

κατανάλωση ωμού μελιού ή σιροπιού. Τα περισσότερα κρούσματα αλλαντίασης έχουν καταγραφεί στην Δ. Ασία, σε ορισμένες περιοχές της Ευρώπης, στο Ιράν, στη Ρωσία και στη Ν. Αφρική, ενώ στις ΗΠΑ δεν υπερβαίνουν τα 50 ετησίως με τα περισσότερα (384 στον αριθμό) να έχουν σημειωθεί κατά την περίοδο 1930-1939 (Jay J.M. et al. 2005, Doyle M.P. and Beuchat L.R. 2007).

Ο *Bacillus cereus* είναι ένα αερόβιο Gram⁺ βακτήριο που παράγει 2 ειδών τοξίνες α) την cereulide, ένα ιονοφόρο K⁺ που αναστέλλει τη μιτοχονδριακή διαπερατότητα και παράγεται από αναπτυσσόμενα κύτταρα στα τρόφιμα, προκαλώντας εμετό και β) τις εντεροτοξίνες που παράγονται κατά τη βλαστική ανάπτυξη του βακτηρίου στο λεπτό έντερο, προκαλώντας διάρροια. Στην τελευταία κατηγορία ανήκουν η αιμολυσίνη HBL, η μη αιμολυτική εντεροτοξίνη NHE και η εντεροτοξίνη CytK, η οποία ευθύνεται για την πρόκληση πιο σοβαρών συμπτωμάτων, όπως είναι η νεκρωτική εντερίτιδα. Τροφές με υψηλή περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες σχετίζονται με την πρόκληση εμετού, ενώ τρόφιμα όπως το κρέας, οι σουπες, τα λαχανικά, το γάλα και οι σάλτσες σχετίζονται με την πρόκληση διάρροιας (Ankolekar C. et al. 2009, Doyle M.P. and Beuchat L.R. 2007, Jay J.M. et al. 2005, Beverly J. et al. 2004, Lee M.-Y. et al. 2009).

1.2.3.3 *Escherichia coli* O157:H7

Ανάλογα με τις τοξίνες που παράγουν και τα νοσήματα που προκαλούν τα στελέχη *Escherichia coli* ταξινομούνται: α) στα εντεροαιμορραγικά (EHEC), β) στα εντεροτοξιγόνα (ETEC), γ) στα εντεροπαθογόνα (EHEC), δ) στα εντεροεπιθητικά (EAEC), και ε) στα εντεροδιεισδυτικά (enteroinvasive) (EIEC). Από αυτά το εντεροαιμορραγικό στέλεχος *E. coli* O157:H7 ευθύνεται κάθε χρόνο στις ΗΠΑ για 73480 κρούσματα και 61 θανάτους, συνιστώντας τον κυριότερο παράγοντα πρόκλησης αιμορραγικής κολίτιδας και αιμολυτικού ουρεμικού συνδρόμου (UHS), την κυρίαρχη αιτία νεφρικής ανεπάρκειας στα παιδιά στις ΗΠΑ. Στους μηχανισμούς παθογένειας του συγκεκριμένου στελέχους περιλαμβάνονται κυρίως α) η παραγωγή των Shiga τοξινών stx1/stx2 που αναστέλλουν την πρωτεϊνσύνθεση στα κύτταρα-στόχους, β) τα προϊόντα των *eae* γονιδίων που εμπλέκονται στην πρόκληση βλαβών στα κύτταρα του εντέρου και γ) η παραγωγή της αιμολυσίνης. Το 1993 σημειώθηκε έξαρση κρουσμάτων λόγω της κατανάλωσης μολυσμένου hamburger, ενώ πηγή της μόλυνσης αποδείχτηκε ότι ήταν ορισμένα περιφερειακά κέντρα διανομής του προϊόντος από τα οποία προκλήθηκε διασπορά της νόσου σε διάφορες αμερικανικές πολιτείες. Σε μία άλλη περίπτωση έξαρσης κρουσμάτων που σημειώθηκε το 1996 στην Ιαπωνία πηγή της μόλυνσης ήταν ραπανάκια, προκαλώντας 11826 ασθένειες και 12 θανάτους. Συνηθέστερη αιτία της λοίμωξης από *E. coli* O157:H7 είναι η κατανάλωση ωμού κρέατος, γάλακτος, μαρουλιού και μηλίτη, ενώ εξάρσεις έχουν καταγραφεί και στον Καναδά, την Αφρική και την Αγγλία (Doyle M.P. and Beuchat L.R. 2007, Olsen J.E. et al. 1995, Li Y. and Mustapha A. 2004, Fratamico P.M. and Strobaugh T.P 1998, Altekruze S.F et al. 1997).

1.2.3.4 *Listeria monocytogenes*

Είναι ένα Gram⁺ ψυχρόφιλο βακτηρίδιο, αρκετά διαδεδομένο στο έδαφος και το νερό. Εισέρχεται στο σώμα μέσω του γαστρεντερικού σωλήνα με την κατανάλωση μολυσμένης τροφής, ακολουθώντας μία σειρά βημάτων που περιλαμβάνουν: την πρόσληψη του από τα φαγοκύτταρα μέσω των φαγοσωμάτων, τη μεσολαβούμενη από τη λιστεριοσίνη (LLO) και τις φωσφολιπάσες C λύση τους, την απελευθέρωση του βακτηρίου στο κυτταρόπλασμα των φαγοκυττάρων, όπου αναπτύσσεται και πολλαπλασιάζεται και τέλος τη διασπορά του σε γειτονικούς ιστούς, όπως το ήπαρ και η σπλήν. Η οξεία μορφή της νόσου χαρακτηρίζεται συνήθως από βακτηραιμία, μηνιγγίτιδα και αποβολές εμβρύου ενώ η θνησιμότητα της αγγίζει το 20-30%. Άτομα με μειωμένη κυτταρική ανοσία, όπως οι ηλικιωμένοι, τα νεογνά και οι ασθενείς που ακολουθούν ανοσοκατασταλτική φαρμακευτική αγωγή έχουν αυξημένη ευπάθεια στη λιστερίωση. Συνήθως, πηγές της νόσου είναι τα μεταποιημένα τρόφιμα άμεσης κατανάλωσης, όπως τα προϊόντα κρέατος (Norrung B. et al 1999), τα μη παστεριωμένα γαλακτομικά, τα θαλασσινά, τα φρούτα και τα λαχανικά (Guerra M. et al. 2001). Δύο εξάρσεις κρουσμάτων σημειώθηκαν το 1985 στην Καλιφόρνια και το 2000 στη Ν. Καρολίνα από την κατανάλωση μη παστεριωμένων προϊόντων τυριού. Το 2000 σημειώθηκε έξαρση λιστερίωσης σε 11 αμερικανικές πολιτείες με κύρια πηγή μόλυνσης επεξεργασμένο κρέας γαλοπούλας, ενώ εξάρσεις έχουν καταγραφεί στη Μασαχουσέτη το 1979, στη Σκοτία και τον Καναδά το 1981 και στην Αγγλία το 1989-1990 (Doyle M.P. and Beuchat L.R. 2007, Lin C.-M. et al.1996, Berrada H. et al. 2006, Beuchat L.R. 1996, Caballero B. et al. 2003).

1.2.3.5 *Campylobacter jejuni*

Οι βακτηριακές τροφογενείς λοιμώξεις με το μεγαλύτερο επιπολασμό στις ΗΠΑ οφείλονται σε είδη του γένους *Campylobacter* με το *Campylobacter jejuni* να ευθύνεται για 4 εκ. κρούσματα ετησίως. Μετά την κατανάλωση τροφής μολυσμένης, το παθογόνο εισέρχεται και πολλαπλασιάζεται στο λεπτό έντερο, διεισδύει στο επιθήλιο και προκαλεί φλεγμονές που οδηγούν σε υψηλό πυρετό, αδιαθεσία, ναυτία και έντονη διάρροια με υδαρείς συχνά αιμορραγικές κενώσεις. Οι επιπλοκές είναι σπάνιες, αλλά μπορεί να περιλαμβάνουν ηπατίτιδα, παγκρεατίτιδα και πιο σπάνια Guillain-Barre σύνδρομο. Τα περισσότερα κρούσματα είναι σποραδικά και σχετίζονται με την κατανάλωση μη σωστά μαγειρεμένων πουλερικών, ενώ από το 1978-2003 900 εξάρσεις καμπυλοβακτηρίωσης έχουν σημειωθεί παγκοσμίως και οφείλονται κυρίως στην κατανάλωση ωμού γάλακτος ή μη χλωριωμένου νερού (Altekruse S.F. et al 1997, Caballero B. et al. 2003).

1.2.3.6 *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio species*, *Shigella species*

Η *Yersinia enterocolitica* είναι ένα βακτήριο πολύ κοινό στο έντερο των οικόσιτων ζώων και προκαλεί τροφογενείς λοιμώξεις, όπως τον εντερικό πυρετό που θέτουν σε

κίνδυνο την ανθρώπινη ζωή. Οι εξάρσεις γερσινιάσης είναι σπάνιες με τις περισσότερες να σχετίζονται με την κατανάλωση ωμού γάλακτος και χοιρινού (Caballero B. et al. 2003, Doyle M.P. and Beuchat L.R. 2007) .

Διάφορα είδη του γένους *Vibrio* προκαλούν τροφικές δηλητηριάσεις μέσω κατανάλωσης μολυσμένων θαλασσινών, με πιο σημαντικά τα *V. parahaemolyticus* και *V. vulnificus*. Στην Ιαπωνία στο διάστημα 1965-1974 το *V. parahaemolyticus* ήταν υπεύθυνο για το 24% των βακτηριακών τροφικών δηλητηριάσεων, ενώ στις ΗΠΑ και στην Ευρώπη το ποσοστό της νόσου είναι χαμηλό. Αντίθετα, το *V. vulnificus* ευθύνεται για το ~95% όλων των θανάτων που σχετίζονται με την κατανάλωση θαλασσινών στις ΗΠΑ, ενώ στην Φλώριδα αποτελεί την πρωταρχική αιτία των θανάτων που προκαλούνται από τροφογενείς ασθένειες (Blake P.A et al. 1980, Centers for Disease Control and Prevention 1996).

Τα είδη του γένους *Shigella* είναι υπεύθυνα για το 12% των τροφικών δηλητηριάσεων που σημειώθηκαν στις ΗΠΑ την περίοδο 1973-1987, ενώ τρόφιμα όπως θαλασσινά, φρούτα, λαχανικά, σαλάτες και κοτόπουλα θεωρούνται κύριες πηγές της νόσου (Bean N.H and Griffin P.M 1990).

1.2.3.7 *Salmonella*

Τα είδη του γένους *Salmonella* είναι αρνητικά κατά Gram αερόβια και δυνητικώς αναερόβια ραβδόμορφα βακτήρια που ανήκουν στην οικογένεια *Enterobacteriaceae*. Εντοπίζονται στη φύση ως παράσιτα του εντερικού σωλήνα του ανθρώπου και των θερμόαιμων ζώων, με αποτέλεσμα να υπάρχουν μεγάλες ποσότητες στα αποχετευτικά συστήματα, ενώ σχεδόν όλα τα είδη *Salmonella* είναι παθογόνα για τον άνθρωπο. Επίσης, αποτελούν τους σημαντικότερους αιτιολογικούς παράγοντες βακτηριακών τροφογενών ασθενειών, καθώς μπορεί να βρεθούν κυρίως στα τρόφιμα ζωϊκής προέλευσης και λιγότερο συχνά στα τρόφιμα φυτικής προέλευσης, λόγω των απλών θρεπτικών απαιτήσεών τους και της ικανότητάς τους να αναπτύσσονται τόσο υπό αερόβιες όσο και υπό αναερόβιες συνθήκες. Όλα τα στελέχη διασπούν τη γλυκόζη με παραγωγή αερίου και οξέος, ενώ λίγα μόνο διασπούν τη λακτόζη. Επίσης, είναι αρνητικά στην οξιδάση, ενώ παράγουν καταλάση και υδροθείο και αποκαρβοξυλιώνουν τη λυσίνη (Παπαναγιώτου Κ.Π & Δαλαϊνά Β.Κ 2004).

1.2.3.7.1 Ταξινόμηση

Σύμφωνα με το σχήμα ταξινόμησης του Kauffman-White, τα στελέχη *Salmonella* διαχωρίζονται σε 51 οροομάδες με βάση διαφορές στους επιτόπους των λιποπολυσακχαριτών (LPS), το κυριότερο συστατικό της εξωτερικής μεμβράνης των Gram⁻ βακτηρίων. Ο λιποπολυσακχαρίτης γνωστός και ως σωματικό (O) αντιγόνο αποτελείται από το λιπίδιο A, τον κορμό του πολυσακχαρίτη και την πλάγια αλυσίδα, η οποία περιέχει επαναλαμβανόμενες ομάδες ολιγασακχαριτών προσδίδοντας εξειδίκευση στην αντίστοιχη οροομάδα. Στελέχη από τα οποία απουσιάζει η πλάγια αλυσίδα

σχηματίζουν αποικίες R (Rough), ενώ αποτυγχάνουν να προσκολληθούν και τον ομόλογο αντι-ορό. Κάθε οροομάδα καθορίζεται από ένα ειδικό O αντιγόνο. Συγκεκριμένα, για τις ομάδες A,B,C,D και E τα διαγνωστικά αντιγόνα είναι τα O2,O4,O6 και O9 αντίστοιχα, ενώ μερικές οροομάδες περιλαμβάνουν και υποομάδες, οι οποίες διακρίνονται με βάση άλλα O αντιγόνα, όπως τα O6,7 και O6,8 για τις υποομάδες C1 και C2 αντίστοιχα.

Μέσα στις οροομάδες τα στελέχη διακρίνονται περαιτέρω σε οροτύπους με βάση βλεφαριδικά (H) αντιγόνα του μαστιγίου. Ο ένας τύπος βλεφαριδικού αντιγόνου είναι κοινός σε λίγα μόνο στελέχη και αποτελεί το βλεφαριδικό αντιγόνο της «φάσεως 1 ή της ειδικής φάσης», ενώ ο άλλος είναι κοινός σε πολλά στελέχη *Salmonella* και αποτελεί τη «φάση 2 ή μη ειδική φάση» του βλεφαριδικού αντιγόνου. Λίγοι ορότυποι είναι μονοφασικοί, ενώ οι περισσότεροι είναι διφασικοί, δηλαδή μπορούν να βρίσκονται και στις 2 φάσεις.

Από το 1996 έχουν ταυτοποιηθεί ~ 2435 ορότυποι της *S. enterica* με το 58.9% να ανήκει στο υποείδος *enterica*, το οποίο περιλαμβάνει και τους περισσότερους οροτύπους που προκαλούν τροφογενείς ασθένειες στον άνθρωπο (Robinson R.K et al. 1999, Παπαναγιώτου Κ.Π & Δαλαϊνα Β.Κ 2004).

Τέλος, από επιδημιολογική άποψη τα στελέχη *Salmonella* διακρίνονται σε 3 ομάδες: α) σε αυτή που προσβάλλει αποκλειστικά τον άνθρωπο και περιλαμβάνει τα *S. typhi*, *S. paratyphi A* και *S. paratyphi C*, b) σε αυτή που περιλαμβάνει οροτύπους προσαρμοσμένους στο περιβάλλον των ξενιστών (host-adapted), ορισμένοι από τους οποίους είναι παθογόνοι για τον άνθρωπο και μπορούν να μεταδοθούν και μέσω μολυσμένης τροφής και c) σε αυτή στην οποία ανήκουν παθογόνα για τον άνθρωπο και τα ζώα, περιλαμβάνοντας και τους περισσότερους οροτύπους που ευθύνονται για τροφογενείς ασθένειες (Jay J.M et al. 2005).

1.2.3.7.2 Παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη της *Salmonella*

Θερμοκρασία: Ορισμένα στελέχη *Salmonella* μπορούν να επιβιώσουν σε υψηλές θερμοκρασίες ($\geq 54^{\circ}\text{C}$), ενώ άλλα παρουσιάζουν ψυχотροφικές ιδιότητες, αφού μπορούν να αναπτυχθούν και σε τρόφιμα που έχουν αποθηκευτεί στους $2-4^{\circ}\text{C}$. Ωστόσο, ανάπτυξη σε θερμοκρασία $<7^{\circ}\text{C}$ και σε θερμοκρασία $>48^{\circ}\text{C}$ έχει παρατηρηθεί μόνο σε βακτηριολογικά μέσα και σε μεταλλαγμένα στελέχη αντίστοιχα. Η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης είναι 37°C , αφού το φυσικό ενδιαίτημα των περισσότερων στελεχών είναι ο γαστρεντερικός σωλήνας των θερμόαιμων ζώων. Επίσης, έχει βρεθεί ότι η *Salmonella* καταστρέφεται σε θερμοκρασίες πάνω από τη μέγιστη τιμή ανάπτυξης, όπως αυτές που επικρατούν κατά τη διάρκεια της παστερίωσης, ενώ η χρονική διάρκεια επιβίωσης της σε χαμηλές θερμοκρασίες εξαρτάται και από άλλους παράγοντες, όπως το pH και το a_w (Robinson R.K et al. 1999).

pH: Το βέλτιστο pH ανάπτυξης κυμαίνεται από 6.5-7.5, ενώ ανάπτυξη έχει παρατηρηθεί και σε $\text{pH}<4.05$, γεγονός που εξαρτάται από το μέσο οξίνισης που έχει χρησιμοποιηθεί. Έχει βρεθεί ότι η *S. enteritidis* παρουσιάζει αυξημένη επιβίωση, όταν χρησιμοποιείται ως μέσο υποξίνισης στη μαγιονέζα το κιτρικό οξύ σε σχέση με το οξικό

οξύ (Robinson R.K et al. 1999). Επίσης, μελέτες έχουν δείξει ότι τα στελέχη *Salmonella* παρουσιάζουν αυξημένη ικανότητα ανάπτυξης υπό συνθήκες χαμηλού pH (≤ 5.0) ή υψηλής αλατότητας ($\geq 2\%$ NaCl) παρουσία αυξημένων θερμοκρασιών (Ferreira M.A and Lund B.M 1987, Thomas L.V et al. 1992). Γενικά, η *Salmonella* παρουσιάζει 3 μηχανισμούς ανθεκτικότητας στην οξύτητα (Acid Tolerance Response, ATR): α) ATR-εξαρτώμενο από το pH, β) ανεξάρτητο από το pH και RpoS- μεσολαβούμενο ATR και γ) ATR- ανεξάρτητο από το pH. Το (α) ενεργοποιείται στην εκθετική φάση, ενώ τα (β) και (γ) στη στάσιμη φάση. Συγκεκριμένα, στην (α) περίπτωση επάγεται η σύνθεση 43 acid shock και εξωμεμβανικών πρωτεϊνών, ενώ παρατηρείται μειωμένος ρυθμός ανάπτυξης και ομοιόσταση του pH, όπως αποδεικνύεται από τη διατήρηση του ενδοκυτταρικού pH σε τιμές 7.0-7.1 και 5.0-5.5, μετά από την εφαρμογή εξωκυτταρικού pH 5.0 και 3.3 αντίστοιχα. Επίσης, σημαντικό ρόλο στη διατήρηση του ενδοκυτταρικού pH σε τιμές ≥ 5.0 παίζουν η Mg^{+2} - εξαρτώμενη ATPάση, η οποία με την κατανάλωση ενέργειας μεταφέρει τα πρωτόνια στο εξωτερικό του κυττάρου και οι επαγόμενες αποκαρβοξυλάσες των αμινοξέων. Στην (γ) περίπτωση όπου επάγεται η σύνθεση 15 acid shock πρωτεϊνών ο μηχανισμός ATR ενεργοποιείται σε pH <5.5 , ενώ λειτουργεί πιο αποτελεσματικά σε pH=4.3. Τέλος, στη (β) περίπτωση ο μηχανισμός ATR είναι ανεξάρτητος από το εξωτερικό pH, ενώ σημαντικό ρόλο παίζει ο παράγοντας σ που κωδικοποιείται από το *groS* γονίδιο (Doyle M.P and Beuchat L.R 2007).

Ενεργότητα νερού (a_w): Στελέχη *Salmonella* αναπτύσσονται σε $a_w=0.999-0.945$ σε βακτηριολογικά μέσα, κάτω από 0.93 στα τρόφιμα, ενώ παρουσιάζει βέλτιστο $a_w=0.995$. Σε τρόφιμα χαμηλής τιμής a_w , όπως η σοκολάτα, το φυστικοβούτυρο και η πάστα, η χρονική διάρκεια φτάνει και τους μήνες. Επίσης, έχει βρεθεί ότι το NaCl που χρησιμοποιείται ως μέσο συντήρησης των τροφίμων, αναστέλλει την ανάπτυξη της *Salmonella* σε $c=3-4\%$, αλλά η ανθεκτικότητά της αυξάνεται καθώς η θερμοκρασία πλησιάζει σε τιμές 10-30 °C (Robinson R.K et al. 1999).

1.2.3.7.3 Πηγές μόλυνσης των τροφίμων με *Salmonella*

Σημαντικότερη πηγή της *Salmonella* αποτελεί ο γαστρεντερικός σωλήνας του ανθρώπου και των θερμόαιμων ζώων. Συνήθως, ο μικροοργανισμός μεταδίδεται στα τρόφιμα από φορείς-άτομα της μόλυνσης που εργάζονται στη μεταποίηση ή εμπορία των αντίστοιχων τροφίμων. Υπάρχει επίσης πιθανότητα τα ζώα των οργανωμένων μονάδων πτηνοτροφίας και βοοτροφίας να είναι φορείς στελεχών *Salmonella*, μεταδίδοντας το βακτήριο στο τελικό νωπό προϊόν, όπως είναι τα αυγά, το κρέας και τα γαλακτομικά (Robinson R.K et al. 1999, Caballero B. et al. 2003, Doyle M.P et al. and Beuchat L.R 2007).

1.2.3.7.4 Εξάρσεις τροφογενούς σαλμονέλλωσης (Foodborne outbreaks)

Τα είδη του γένους *Salmonella* ευθύνονται για τον μεγαλύτερο αριθμό των καταγεγραμμένων τροφογενών εξάρσεων που σημειώνονται παγκοσμίως μετά το

Campylobacter jejuni (Robinson R.K et al. 1999). Εκτιμάται ότι περίπου 1.5 εκ. κρούσματα μη τυφοειδούς σαλμονέλλωσης σημειώνονται ετησίως στις ΗΠΑ με το 95% να σχετίζεται με την κατανάλωση τροφίμων (Li Y. and Mustapha A. 2004, Mao Y. et al. 2003). Η *S. enteritidis* αποτελεί τον κυριότερο αιτιολογικό παράγοντα μόλυνσης των πουλερικών, αυγών και ωμών ή μη καλά μαγειρεμένων τροφίμων (Robinson R.K et al. 1999, Caballero B. et al. 2003, Altekruze S.F et al. 1997). Το 1994 σε 41 πολιτείες της Αμερικής ασθένησαν από *S. enteritidis* 224000 άτομα, λόγω της κατανάλωσης παγωτών που είχαν παρασκευαστεί από μολυσμένο γάλα. Η μόλυνση προκλήθηκε λόγω της μεταφοράς του γάλακτος με φορτηγά που προηγουμένως περιείχαν ωμά αυγά. Το 1985 σημειώθηκαν στο Ιλινόις, έξαρση κρουσμάτων από μολυσμένο παστεριωμένο γάλα με κύριο αιτιολογικό παράγοντα τη *S. typhimurium*. (Robinson R.K et al. 1999, Jay M.J et al 2005) Χαρακτηριστικά παραδείγματα γαλακτομικών προϊόντων που έχουν εμπλακεί σε σοβαρές τροφογενείς εξάρσεις σαλμονέλλωσης παρουσιάζονται στον **πίνακα 2**.

Πίνακας 2: Τροφογενείς εξάρσεις σαλμονέλλωσης από την κατανάλωση γαλακτομικών προϊόντων (Doyle M.P. and Beuchat L.R. 2007)

Year	Country	Vehicle	Serovar	No.	
				Cases ^a	Deaths
1973	Trinidad	Milk powder	Derby	3,000 ^b	NS ^c
1976	Australia	Raw milk	Typhimurium PT9	>500	NS ^c
1981	Scotland	Raw milk	Typhimurium PT204	654	2
1984	Canada	Cheddar cheese	Typhimurium PT10	2,700	0
1985	United States	Pasteurized milk	Typhimurium	16,284	7
1994	United States	Ice cream	Enteritidis PT8	740	0
1998	Canada	Cheddar cheese	Enteritidis PT8	700	0

^a Confirmed cases, unless stated otherwise.
^b Estimated number of cases.
^c NS, not specified.

Επίσης, τις τελευταίες δεκαετίες έχουν σημειωθεί εξάρσεις σαλμονέλλωσης από τη κατανάλωση φρέσκων φρούτων και λαχανικών (**Πίνακας 3**). Συγκεκριμένα, εξάρσεις σημειώθηκαν από την κατανάλωση φασολιών, βλαστών και ντοματών στην Αγγλία, την Φιλανδία και τις ΗΠΑ αντίστοιχα (Lin C.-M. et al. 1996), ενώ στην Ιταλία βρέθηκε ότι το 68% των μαρουλιών και το 72% του μάραθου ήταν μολυσμένα με *Salmonella* (Francis G.A et al. 1999). Επίσης, κρούσματα σημειώθηκαν και από την κατανάλωση μη παστεριωμένου χυμού πορτοκαλιού και μηλίτη, λόγω της ανθεκτικότητας της *Salmonella* σε όξινα pH (Fratamico P. M and Strobaugh T.P 1998).

Άλλα τρόφιμα που έχουν συνδεθεί με εξάρσεις σαλμονέλλωσης είναι το κρέας και τα παράγωγά του, τα καρυκευμένα αλλά όχι μαγειρεμένα κρέατα, λουκάνικα και

πουλερικά. Χαρακτηριστικά παραδείγματα παρουσιάζονται στον **πίνακα 4**. Ακόμη, μία άλλη έξαρση σαλμονέλλωσης σημειώθηκε στη Γερμανία το 1994, λόγω κατανάλωσης τσιπς που περιείχαν μολυσμένη σκόνη πάπρικας, ενώ από το 1990 έχουν καταγραφεί πολλαπλά κρούσματα από ένα νέο στέλεχος *S. typhimurium* DT104, το οποίο φέρει γονίδια ανθεκτικότητας σε διάφορα αντιβιοτικά.

Πίνακας 3: Τροφογενείς εξάρσεις σαλμονέλλωσης από την κατανάλωση φρούτων και λαχανικών (Doyle M.P. and Beuchat L.R. 2007).

Year(s)	Country	Vehicle	Serovar	No.	
				Cases ^a	Deaths
1981	The Netherlands	Salad base	Indiana	600 ^b	0
1984	United States	Salad bars	Typhimurium	751	0
1991	United States and Canada	Cantaloupes	Poona	>400	NS ^c
1991	Germany	Fruit soup	Enteritidis	600	NS
1993	United States	Tomatoes	Montevideo	100	0
1994	Finland and Sweden	Alfalfa sprouts	Bovismorbificans	492	0
1995	United States	Orange juice	Hartford	62	0
1996	United States	Alfalfa sprouts	Gaminara	481	1
			Montevideo		
1998	United States	Toasted oat cereal	Meleagridis	209	0
1999	Australia	Orange juice	Agona	427	NS
1999	Canada	Alfalfa sprouts	Typhimurium	427	NS
1999	Japan	Peanut sauce	Paratyphi B (Java)	>53	NS
1999	United States and Canada	Orange juice	Enteritidis PT1	644	NS
1999	United States	Tomatoes	Muenchen	>220	0
1999	United States and Brazil	Mangoes	Baildon	86	3
2000	United States	Orange juice	Newport	78	2
2000	United States	Mung bean sprouts	Enteritidis	>74	0
2000	The Netherlands	Bean sprouts	Enteritidis	>45	0
2000	Europe (five countries)	Lettuce	Enteritidis PT4b	12	0
2000	Canada and United States	Raw almonds	Typhimurium PT204b	>392	0
2000–2001	United States and Canada	Cantaloupe	Enteritidis PT30	168	0
2001	United States	Alfalfa sprouts	Poona	155	1
2001	Canada and Australia	Shandong peanuts	Kottbus	31	NS
2001	Europe and Australia	Halva	Stanley	93	NS
2002	United States	Roma tomatoes	Typhimurium DT104	>70	NS
2002–2003	Australia and New Zealand	Tahini	Javiana	159	0
2003	Germany	Aniseed herbal tea	Montevideo	68	NS
2003–2004	United States and Canada	Raw almonds	Agona	42	0
2004	United States and Canada	Roma tomatoes	Enteritidis	29	0
2004	United Kingdom	Lettuce	Braenderup	125	0
			Javiana	390	0
			Typhimurium	27	0
			Anatum	5	0
			Thompson	4	0
2004	United Kingdom	Lettuce	Muenchen	4	0
2005	Austria	Mixed salad	Newport	>372	0
2005	Finland	Iceberg lettuce	Enteritidis PT21	85	0
			Typhimurium var. Copenhagen DT104b	60	0

^a Confirmed cases, unless stated otherwise.

^b Estimated number of cases.

^c NS, not specified.

Πίνακας 4: Τροφογενείς εξάρσεις σαλμονέλλωσης από την κατανάλωση προϊόντων κρέατος (Doyle M.P. and Beuchat L.R. 2007)

Year(s)	Country	Vehicle	Serovar	No.	
				Cases ^a	Deaths
1984	France and England	Liver pâté	Goldcoast	756	0
1984	International	Aspic glaze	Enteritidis PT4	866	2
1997	United States	Stuffed ham	Heidelberg	746	1
2000	United States	Hamburger buns/ infected worker	Thompson	55	0
2001	United States	Pork	Uganda	24	NS ^b
2003	United States	Ground beef	Typhimurium DT104	58	0
2004	United States	Ground beef	Typhimurium	>31	0
2004	Germany	Raw minced pork	Give	115	NS
2004	United States	Roast beef	<i>Salmonella</i> spp.	28	NS
2004–2005	Germany	Raw pork	Bovismorbificans PT24	402	1
2005	Canada	Deli meats	Typhimurium PTU302	55	0
2005	The Netherlands	Imported raw beef	Typhimurium PT104	165	0
2005	Honduras	Cooked chicken	<i>Salmonella</i> spp.	>600	NS
2005	Spain	Cooked chicken	Hadar	2,138	1
2005	United States	Cooked turkey	Enteritidis	>304	1
2005	Canada	Roast beef	<i>Salmonella</i> spp.	155	0
2005	England	Kebab	Enteritidis PT1	195	NS

^a Confirmed cases, unless stated otherwise.

^b NS, not specified.

1.2.3.7.5 Παθογένεση της *Salmonella*-Χαρακτηριστικά των ασθενειών

Οι κλινικές εκδηλώσεις των λοιμώξεων από *Salmonella* στον άνθρωπο παρουσιάζονται υπό 2 μορφές (Πίνακας 5):

Α) Τυφοειδής πυρετός ή κοιλιακός τύφος: Η μόλυνση γίνεται από ασθενείς, οι οποίοι αποβάλλουν με τα κόπρανα τη *S. typhi*, ενώ πολλαπλά κρούσματα της νόσου οφείλονται συνήθως στη μόλυνση του ύδατος, διαφόρων τροφίμων και οστρακοφόρων μαλακίων, που έχουν αλιευθεί σε μολυσμένα σημεία της θάλασσας. Εκτός, από τη *S. typhi*, η *S. paratyphi A* και η *S. paratyphi B* εισέρχονται στην κυκλοφορία, προκαλώντας νόσο που μοιάζει κλινικά με τον τυφοειδή πυρετό, αλλά τα συμπτώματά της είναι σχετικά ελαφρότερα. Τα στελέχη αφού διαπεράσουν τον όξινο φραγμό του στομάχου μεταφέρονται στο λεπτό έντερο και από εκεί εισέρχονται στα μεσεντέρια λεμφογάγγλια. Από εκεί και δια του θωρακικού πόρου φτάνουν στην κυκλοφορία, με αποτέλεσμα να προκαλείται μικροβαιμία, ενώ μεταφέρονται στο ήπαρ, στη χοληδόχο κύστη, στο σπλήνα και στο μυελό των οστών, όπου πολλαπλασιάζονται εντός των φαγοκυττάρων. Αφού τα φαγοκύτταρα καταστραφούν, απελευθερώνονται τα στελέχη τα οποία εισέρχονται στην κυκλοφορία, με αποτέλεσμα την εξάπλωση της λοίμωξης σε άλλους ιστούς. Μετά από περίοδο επώασης ~ 8-28 ημερών, μέσα στην πρώτη εβδομάδα εμφανίζονται υδαρής διάρροια, ατονία, και δερματικά στίγματα στα άκρα. Μετά από τη διέλευση των 2 εβδομάδων, τα συμπτώματα μπορεί είτε να υποχωρήσουν είτε να εξελιχθούν σε πιο σοβαρές καταστάσεις, όπως διάτρηση εντέρου, οστεομυελίτιδα και

μηνιγγίτιδα. Ο ρυθμός θνησιμότητας της νόσου ποικίλλει από 1% στις αναπτυγμένες χώρες έως 10% στις υπανάπτυκτες χώρες (Jean-Yves D'Aoust 1991, Tietjen M. and Fung D.Y.C. 1995).

B) Εντεροκολίτιδα: Προκαλείται από την κατανάλωση μολυσμένων τροφίμων με μη τυφοειδή στελέχη *Salmonella* και τα συμπτώματα διαρκούν ~ 5μέρες. Μετά από μία περίοδο επώασης ~8-72 h εμφανίζονται πόνοι, ναυτία, υδαρής διάρροια, ανορεξία, εμετός και πυρετός μικρής διάρκειας. Συνηθέστερο αίτιο των τροφικών δηλητηριάσεων είναι η *S. typhimurium* αλλά και άλλα στελέχη *Salmonella*. Συγκεκριμένα, μετά την κατανάλωση μολυσμένης τροφής, τα βακτήρια αφού επιβιώσουν στο χαμηλό pH, επιτίθενται στα κύτταρα του εντερικού επιθηλίου και στα Μ κύτταρα του Peyer's. Προϊόντα των γονιδίων *inv* διευκολύνουν τη συγκέντρωση των Ca^{+2} , οδηγώντας σε πτύχωση της μεμβράνης, σχηματισμό ινιδίων ακτίνης και ενδοκύττωση των βακτηρίων. Η παραγωγή της εντεροτοξίνης προκαλεί συσσώρευση υγρού και ανισορροπία ηλεκτρολυτών, οδηγώντας σε απελευθέρωση προσταγλανδινών, οι οποίες ίσως προκαλούν την υπερσυσσώρευση υγρού στο εντερικό σωλήνα. Η μη τυφοειδής σαλμονέλλωση περιορίζεται στον εντερικό σωλήνα, προκαλώντας στη στιβάδα συνδετικού ιστού του βλεννογόνου φλεγμονώδη αντίδραση των PMN (πολυμορφοπύρηνα κύτταρα). Τα βρέφη, οι ηλικιωμένοι και τα ανοσοκατεσταλμένα άτομα παρουσιάζουν αυξημένη ευαισθησία στην συγκεκριμένη ασθένεια (Jean –Yves D'Aoust 1991, Robinson R.K et al. 1999).

Πίνακας 5: Κλινικές εκδηλώσεις των λοιμώξεων από *Salmonella* στον άνθρωπο (Jean – Yves D'Aoust 1991)

Symptom	Typhoid (Enteric Fever)	Non-typhoid (PMN-Inflammatory Response)
Incubation period	8–28 days	8–72 h
Diarrhea	+(constipation)	+ + + (watery)
Abdominal pain	+ +	+ + +
Fever	+ + (prolonged/spiking)	+ (< 48 h)
Systemic spread	+ + + (≥ 7 days after onset)	rare (<i>S. choleraesuis</i> <i>S. dublin</i>)
Rose spots (cutaneous)	+	–
Duration	≤ 30 days	≤ 5 days

1.2.3.7.6 Μολυσματικοί παράγοντες

A) LPS: Το μήκος των πλάγιων αλυσίδων των λιποπολυσακχαριτών, ο βαθμός γλυκοσυλίωσής τους, η σύστασή τους και η ποσότητα των LPS που παράγεται επηρεάζουν την μολυσματικότητα των στελεχών της *Salmonella*. Έχει βρεθεί ότι μεγάλου μεγέθους πλάγιες αλυσίδες εμποδίζουν στερικά την ικανότητα των συστατικών του συμπληρώματος να δεσμευτούν στην κυτταρική επιφάνεια, αναστέλλοντας έτσι τη λύση των βακτηριακών κυττάρων.

B) Προσκόλληση σε κύτταρα των ξενιστών: Ο αποικισμός των κυττάρων της *Salmonella* στις εντερικές λάχνες διευκολύνεται από τους κροσσούς-τύπου1 (ευαίσθητους στη μαννόζη) ή από τους ανθεκτικούς στη μαννόζη κροσσούς, τις χρωμοσωμικά κωδικοποιούμενες προσκολλητίνες της βακτηριακής επιφάνειας, τις ανθεκτικές στη μαννόζη αιμαγλουτίνες και από την επαγωγή από τα επιθηλιακά κύτταρα των βακτηριακών πολυπεπτιδίων που είναι απαραίτητα για την προσκόλληση και την επίθεση στα κύτταρα του ξενιστή. Τα ινίδια αποτελούνται από 14kDa υπομονάδες και έχουν περιγραφεί εκτενώς στη *S. enteritidis* καθώς και στην οροομάδα D. Οι SEF17 που έχουν περιγραφεί στη *S. enteritidis* και στο διαρρογενετικό στέλεχος της *E. coli* είναι υδρόφοβα ινίδια που δεσμεύονται ισχυρά στη φμπρονεκτίνη, συμμετέχοντας στην προσκόλληση.

C) Εντεροτοξίνες: Η διαρροϊκή εντεροτοξίνη παράγεται από διάφορα στελέχη *Salmonella* και απελευθερώνεται στον εντερικό σωλήνα, προκαλώντας την έναρξη των διαρροϊκών συμπτωμάτων. Συγκεκριμένα, ενεργοποιεί την αδενυλοκυκλάση, η οποία με τη σειρά της προκαλεί την αύξηση της συγκέντρωσης του cAMP, το οποίο οδηγεί σε αύξηση της συγκέντρωσης του Na^+ και του Cl^- , με αποτέλεσμα την υπερσυσσώρευση υγρού στον εντερικό σωλήνα. Πρόσφατα, έχει βρεθεί ότι η εντεροτοξίνη της *Salmonella* αποτελείται από 2 υπομονάδες, τις A και B που προσομοιάζουν με εκείνες της τοξίνης της χολέρας και της *E. coli* και ότι κωδικοποιείται από ένα χρωμοσωμικό γονίδιο, το *stx*. Τα στελέχη *Salmonella* παράγουν επίσης μία μεμβρανο-δεσμευτική πρωτεϊνική κυτοτοξίνη, η οποία ορολογικά και γενετικά διακρίνεται από τις Shiga τοξίνες της *Shigella* και της *E. coli*. Η συγκεκριμένη τοξίνη αναστέλλει την πρωτεϊνοσύνθεση και χηλώνει δισθενή κατίοντα, οδηγώντας σε καταστροφή των κυτταρικών μεμβρανών των ξενιστών.

D) Σιδηροφόρα: Τα κύτταρα του ξενιστή και τα βακτηριακά κύτταρα ανταγωνίζονται για τη πρόσληψη της μειωμένης συγκέντρωσης του σιδήρου μέσα στον εντερικό βλεννογόνο. Τα επιθηλιακά κύτταρα του εντερικού σωλήνα παράγουν έναν μη ειδικό προσδέτη του σιδήρου, την λακτοφερρίνη, ενώ η *Salmonella* παράγει 2 σιδηροφόρα: την υψηλής συγγένειας εντεροχελίνη και την χαμηλής συγγένειας αεροβακτίνη. Πρόσφατα, έχει βρεθεί ότι τα στελέχη που παράγουν την εντεροχελίνη είναι πιο μολυσματικά από αυτά που παράγουν την αεροβακτίνη και ότι διάφορα στελέχη *Salmonella* παράγουν εκτός από αυτά τα 2 σιδηροφόρα και άλλους προσδέτες Fe(III) που ανήκουν στην κατηγορία του υδροξαμικού.

E) Πορίνες: Είναι υδρόφοβες διαμεμβρανικές πρωτεΐνες με M.B=34000-36000 που ενισχύουν την επιθετικότητα της *Salmonella*, μέσω καταστολής της μεσολαβούμενης από τα PMN και τα μακροφάγα φαγοκυττάρωσης, γεγονός που έχει βρεθεί ότι επιτυγχάνεται με ενεργοποίηση της αδενυλοκυκλάσης των μεμβρανών των φαγοκυττάρων, με συνέπεια την αύξηση του ενδοκυτταρικού cAMP.

F) Χρωμοσωμικοί παράγοντες: Έχει βρεθεί ότι σειρές γονιδίων των οποίων τα προϊόντα ή οι λειτουργίες δεν έχουν ακόμα καλά χαρακτηριστεί, τοποθετούνται σε μεγάλες χρωμοσωμικές περιοχές, οι οποίες καλούνται νησίδες παθογένειας. Μία σειρά ~30 γονιδίων, η περιοχή *inv* είναι τοποθετημένη σε μία τέτοια νησίδα την SPI1, μεγέθους 40-50kb και είναι απαραίτητη για την επίθεση στα επιθηλιακά κύτταρα του ξενιστή. Τα συγκεκριμένα γονίδια κατά τη διάρκεια της λογαριθμικής ή στάσιμης

φάσης κάτω από συνθήκες υψηλής οσμωτικότητας και χαμηλής πίεσης O₂ που επικρατούν στα εσωτερικά υγρά του σώματος κωδικοποιούν για ένζυμα και μεταγραφικούς παράγοντες υπεύθυνους για τη ρύθμιση, τη έκφραση και τη μετάθεση σημαντικών δραστικών πρωτεϊνών στην επιφάνεια του κυττάρου ξενιστή. Τα SPI1 γονίδια έχουν αποτελέσει στόχους για την PCR ανίχνευση των στελεχών *Salmonella* στα τρόφιμα, λόγω της υψηλής συντηρητικότητάς τους. Άλλα χρωμοσωμικά στοιχεία, όπως το ρυθμιστικό σύστημα rhoP/rhoQ παρέχουν ανθεκτικότητα σε διάφορα αντιμικροβιακά συστατικά που παράγονται από τα ουδετερόφιλα και τα μακροφάγα, τροποποιώντας χημικά τη δομή του LPS. Επίσης, ρυθμιστικά γονιδιακά προϊόντα, όπως είναι ο παράγων σ RpoH που ρυθμίζει την έκφραση των HSP's πρωτεϊνών, παίζουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της *Salmonella*.

G) Μολυσματικά πλασμίδια: Διάφορα στελέχη *Salmonella* φέρουν πλασμίδια ειδικά των ορομάδων (SSP's) μεγέθους 30-60MDa, τα οποία διευκολύνουν την βακτηριακή επίθεση και την ανάπτυξη σε ιστούς, όπως είναι το ήπαρ και ο σπλήνας. Έχει βρεθεί ότι η εξάλειψή τους με την εφαρμογή χημικών ή θέρμανσης ή με την εμπλοκή της γενετικής πληροφορίας μέσω ένθεσης των τρανσποζονίων, οδήγησε σε μεταλλάγματα με μειωμένη μολυσματικότητα. Τα συγκεκριμένα πλασμίδια φέρουν μία περιοχή DNA, την *spv*, η οποία περιέχει 5 γονίδια, των οποίων η έκφραση ελέγχεται από τον RpoS και από άλλους παράγοντες, όπως είναι το ενδοκυτταρικό περιβάλλον του ξενιστή, το χαμηλό pH, η χαμηλή διαθεσιμότητα του σιδήρου και ο περιορισμός των θρεπτικών συστατικών. Παρόλα αυτά η ταυτοποίηση και ο ρόλος των πλασμιδιακών γονιδίων στην παθογένεια δεν είναι ακόμα κατανοητές, ενώ έχει βρεθεί ότι στη *S. typhimurium* ένα κωδικοποιούμενο από ένα 11kDa-πλασμίδιο πολυπεπτίδιο, παρέχει ανθεκτικότητα στο σύστημα του συμπληρώματος (Doyle M.P and Beuchat L.R 2007, Jean-Yves D'Aoust 1991, Robinson R.K et al. 1999).

1.2.3.8 *Staphylococcus aureus*

Το γένος των σταφυλοκόκκων περιλαμβάνει τουλάχιστον 27 είδη και 7 υποείδη, τα οποία είναι Gram⁺, αερόβια ή δυνητικά αναερόβια και αποκτούν ενέργεια μέσω της γλυκόλυσης, του δρόμου των μονοφωσφορικών εξοζών και του κύκλου του τρικαρβοξυλικού οξέος. Τα περισσότερα είδη σταφυλοκόκκου αποτελούν μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας του δέρματος και των βλεννογόννων, δίνουν θετική αντίδραση καταλάσης και διαφοροποιούνται μεταξύ τους μέσω διαφόρων βιοχημικών αντιδράσεων (Robinson R.K et al. 1999).

Ο *Staphylococcus aureus* είναι το πιο κοινό είδος στο γένος των σταφυλοκόκκων που ανήκει στην οικογένεια *Micrococcaceae* και είναι ιδιαίτερα παθογόνο, καθώς προκαλεί λοιμώξεις του δέρματος, τροφικές δηλητηριάσεις, μικροβιαιμίες ή και το σύνδρομο του τοξικού shock. Είναι ένα δυνητικά αναερόβιο Gram⁺ βακτήριο, που παράγει κονγκουλάση, καταλάση και θερμοσταθερή νουκλεάση (TNase), ενώ το κυτταρικό του τοίχωμα είναι ανθεκτικό στη λυσοζύμη και ευαίσθητο στη λυσοσταφίνη, η οποία διασπά τη γέφυρα πενταγλυκίνης. Ωστόσο, και άλλα είδη, όπως τα *S. intermedius* και *S. hyicus* είναι θετικά στην κονγκουλάση και στην νουκλεάση.

Λόγω της σύνθετης αντιγονικής δομής του, η διάκριση του είδους σε οροτύπους δεν χρησιμοποιείται πλέον. Επίσης, τα στελέχη του *S. aureus* μπορούν να ανπτυχθούν σε μία μεγάλη ποικιλία θερμοκρασιών από 10-45°C, με βέλτιστη τιμή τους 35 °C και σε μία μεγάλη ποικιλία pH από 4.5-9.3, με βέλτιστη τιμή από 7.0-7.5. Τα στελέχη είναι ανθεκτικά και σε χαμηλές τιμές $a_w=0.83-0.86$, ενώ αναπτύσσονται ικανοποιητικά σε $C_{NaCl} > 10\%$ και σχετικά με χαμηλότερο ρυθμό σε $C_{NaCl}=15\%$ (Robinson R.K et al. 1999, Le Loir Y. et al. 2003).

1.2.3.8.1 Δομή του *Staphylococcus aureus*

- **Κυτταρικό τοίχωμα:** Το κυτταρικό τοίχωμα των στελεχών *Staphylococcus* αποτελείται κατά 50% από πεπτιδογλυκάνη, η οποία περιέχει υπομονάδες N-ακετυλογλυκοζαμίνης και N-ακετυλομουραμικού οξέος συνδεδεμένων με δεσμούς β-1,4. Παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογόνο δράση του βακτηρίου, καθώς προκαλεί την παραγωγή ιντερλευκίνης-1 από τα φαγοκύτταρα, ενεργοποίηση του συμπληρώματος και χημειοτακτισμό για τη συγκέντρωση των πολυμορφοπύρηνων λευκοκυττάρων στο σημείο της φλεγμονής. Τειχοϊκά οξέα συνδεδεμένα με την πεπτιδογλυκάνη του κυτταρικού τοιχώματος είναι δυνατόν να έχουν αντιγονικές ιδιότητες, ενώ κύρια λειτουργία τους είναι η διατήρηση του σωστού ιονικού περιβάλλοντος για τις κυτταροπλασματικές μεμβράνες.
- **Επιφανειακές πρωτεΐνες:** Το κυτταρικό τοίχωμα πολλών στελεχών *Staphylococcus aureus* περιέχει πρωτεΐνες, οι οποίες αποτελούνται από μία αλληλουχία-σήμα έκκρισης, από θετικά φορτισμένα αμινοξέα που επεκτείνονται μέσα στο κυτταρόπλασμα, από μία υδρόφοβη διαμεμβρανική περιοχή, από μία περιοχή αγκυροβόλησης στο κυτταρικό τοίχωμα και από περιοχή δέσμευσης του προσδέτη στο αμινοτελικό άκρο, δίνοντας τη δυνατότητα σε ορισμένες από αυτές τις πρωτεΐνες να δρουν ως προσκολλητίνες. Χαρακτηριστική πρωτεΐνη είναι η πρωτεΐνη A, η οποία συνδέεται με το Fc τμήμα του μορίου IgG, με αποτέλεσμα να παρουσιάζει αντιφαγοκυτταρικές ιδιότητες.
- **Κάψουλες:** Τα περισσότερα στελέχη *Staphylococcus* παράγουν μικροκάψουλες. Από τους 11 οροτύπους που έχουν ταυτοποιηθεί, οι τύποι 5 και 8 ευθύνονται για το 75% των ανθρώπινων λοιμώξεων. Τα περισσότερα ανθεκτικά στη μεθικιλίνη στελέχη *Staphylococcus aureus* είναι τύπου 5.
- **Ένζυμα:** Ο *Staphylococcus aureus* παράγει την κονγκουλάση (ή αλλιώς πηκτάση), η οποία απαντά σε 2 μορφές: την ελεύθερη και την κυτταροδεσμευτική, οι οποίες διαφέρουν ανοσολογικά και λειτουργικά. Η ελεύθερη μορφή της κονγκουλάσης είναι πρωτεΐνη και διάφοροι αντιγονικοί τύποι έχουν ταυτοποιηθεί, ενώ θεωρείται ότι συμβάλλει στην παθογένεση μέσω μετατροπής του φимπρινογόνου σε φимπρίνη, προκαλώντας καθίζηση ινικής στην επιφάνεια του βακτηρίου και γύρω από αυτήν. Άλλα ένζυμα που παράγονται είναι η πρωτεάση, η λιπάση και η υαλουρονιδάση που διευκολύνουν τη μετάδοση της λοίμωξης και στους γειτονικούς ιστούς και η β-λακταμάση που

απενεργοποιεί την πενικιλίνη (Παπαναγιώτου I.K και Δαλαίνα B.K 2004, Lowy F.D 1998).

- **Τοξίνες:** Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν οι εντεροτοξίνες, οι εξωτοξίνες, οι αποφολιδωτικές τοξίνες και η λευκοντονίνη.

Ι) Εντεροτοξίνες: Πρόκειται για διαλυτές, εξωκυτταρικές, χαμηλού μοριακού βάρους θερμοσταθερές τοξίνες που παράγονται από τα περισσότερα στελέχη *Staphylococcus aureus*, αλλά και από άλλα θετικά στη κονγκουλάση στελέχη, όπως τα *S. intermedius* και ο *S. hyicus*, αλλά και από ορισμένους αρνητικούς στη κονγκουλάση σταφυλοκόκκους. Σήμερα, έχουν περιγραφεί 14 διαφορετικά είδη σταφυλοκοκκικών εντεροτοξινών (SEs), οι οποίες παρουσιάζουν ομοιότητες στη δομή και στην αλληλουχία με πιο κοινές τις A,B,C1,C2,C3,D και E. Είναι σταθερές και ανθεκτικές σε πρωτεολυτικά ένζυμα, όπως είναι η πεψίνη και η τρυψίνη, διατηρώντας τη δράσης τους στο πεπτικό σύστημα του ξενιστή. Επίσης, έχει βρεθεί ότι είναι περισσότερο θερμοανθεκτικές στα τρόφιμα από ό,τι στα εργαστηριακά θρεπτικά μέσα, αλλά όταν βρίσκονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις μπορούν να απενεργοποιηθούν από θερμικές επεξεργασίες που εφαρμόζονται στην αποστείρωση των κονσερβοποιημένων τροφίμων. Ακόμη, η παραγωγή των τοξινών B και C ελέγχεται από γονίδια πλασμιδίων κυρίως προς το τέλος της στάσιμης φάσης, ενώ η παραγωγή των τοξινών A, D και E βρίσκεται κάτω από τον χρωμοσωμικό έλεγχο και πραγματοποιείται συνήθως κατά τη διάρκεια της λογαριθμικής φάσης. Οι SE's μπορούν να παραχθούν στα τρόφιμα, όταν τα εντεροτοξιγενικά στελέχη *Staphylococcus* πολλαπλασιάζονται φθάνοντας σε ένα επίπεδο τουλάχιστον 10^6 cfu g⁻¹, ανάλογα βέβαια και με τη θερμοκρασία, το pH, το a_w, τις ατμοσφαιρικές συνθήκες και την παρουσία άλλων μικροοργανισμών.

Οι εντεροτοξίνες ανήκουν στην οικογένεια των πυρετογενών τοξινών (pyrogenic) μαζί με την τοξίνη του συνδρόμου τοξικής καταπληξίας (TSST), τις αποφολιδωτικές τοξίνες A και B και τις πυρογενικές τοξίνες του στρεπτόκοκκου. Όλες οι πυρογενικές τοξίνες έχουν ιδιότητες υπεραντιγόνων καθώς συνδέονται με μόρια MHCII των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων (APC's), με αποτέλεσμα το σύμπλοκο MHCII-SAg να αλληλεπιδρά με την Vβ αλυσίδα του υποδοχέα TCR, οδηγώντας σε μη ειδική ενεργοποίηση και πολλαπλασιασμό των T-κυττάρων και σε μαζική έκκριση κυτοκινών. Ωστόσο, οι SE's εκτός από τη δράση τους ως υπεραντιγόνα παρουσιάζουν και μία επιπλέον εμετική δράση, ενώ έχει βρεθεί ότι οι 2 αυτές ιδιότητες των σταφυλοκοκκικών τοξινών εντοπίζονται σε 2 διαφορετικές πρωτεϊνικές επικράτειες. Επίσης, μελέτες έχουν δείξει ότι γενετικές μεταλλάξεις που μειώνουν την υπεραντιγόνο δράση, προκαλούν και αντίστοιχα μείωση της εμετικής δράσης. Δεν υπάρχουν ακόμα αρκετές πληροφορίες σχετικά με την εμετική δραστηριότητα, στην οποία οφείλονται και οι σταφυλοκοκκικές τροφικές δηλητηριάσεις (Staphylococcal Food Poisoning, SFP), ενώ έρευνες έχουν δείξει ότι η λούπα Cys που εντοπίζεται στη δομή αρκετών SE's πιθανόν να είναι σημαντική για τη συγκεκριμένη δράση. Η τροφική δηλητηρίαση χαρακτηρίζεται από εμετό, διάρροια, μυϊκές κράμπες και ναυτία που εμφανίζονται μέσα σε λίγες ώρες (1-8 h) μετά τη λήψη

μολυσμένης με στελέχη κυρίως *Staphylococcus aureus* τροφής πλούσιας σε υδατανθράκες και πρωτεΐνες. Η πρόκληση εμετού οφείλεται στον ερεθισμό του κέντρου του εμετού του ΚΝΣ μετά τη δράση της εντεροτοξίνης σε νευρικούς υποδοχείς του εντέρου. Πρέπει να σημειωθεί ότι η τροφική δηλητηρίαση οφείλεται μόνο στην εντεροτοξίνη που έχει σχηματιστεί στα τρόφιμα και όχι στο βακτήριο (Robinson R.K et al. 1999, Le Loir Y. et al. 2003, Doyle M.P and Beuchat L.R 2007).

II) Εξωτοξίνες: Σε αυτές περιλαμβάνονται η α, β, γ και δ τοξίνη, οι οποίες προκαλούν το σχηματισμό πόρων και επάγουν προφλεγμονώδεις αλλαγές στα κύτταρα των θηλαστικών.

- **Λευκοντονίνη:** Παράγεται από τον *Staphylococcus aureus* και καταστρέφει τα λευκά αιμοσφαίρια. Στελέχη που παράγουν την εν λόγω τοξίνη ενοχοποιούνται για βαριές λοιμώξεις δέρματος και μαλακών μορίων.
- **Αποφολιδωτικές τοξίνες:** Περιλαμβάνουν τις επιδερμολυτικές τοξίνες Α και Β, στις οποίες οφείλεται το σύνδρομο «ζεματισμένου δέρματος» (Lowy F.D 1998).

1.2.3.8.2 Πηγές μόλυνσης των τροφίμων με *Staphylococcus aureus*

Τα στελέχη του *Staphylococcus aureus* απαντούν στο δέρμα, στις αεροφόρους οδούς, στο γαστρεντερικό σωλήνα και στο ουροποιητικό σύστημα όλων σχεδόν των ανθρώπων, καθώς υπολογίζεται ότι περίπου το 30-50% του πληθυσμού είναι φορείς του συγκεκριμένου βακτηρίου. Περίπου το 40-60% των στελεχών που έχουν απομονωθεί από τον άνθρωπο είναι εντεροτοξιγόνα, με πιο κοινά αυτά που παράγουν την εντεροτοξίνη Α (SEA). Συνήθως, ο μικροοργανισμός μεταδίδεται στα τρόφιμα από άτομα-φορείς του βακτηρίου που εργάζονται στη μεταποίηση ή εμπορία των αντίστοιχων τροφίμων ή από τη χρήση μολυσμένου εξοπλισμού κατά τη διάρκεια επεξεργασίας τους. Άλλοι παράγοντες που μπορούν να οδηγήσουν σε μετάδοση του βακτηρίου στο τελικό προϊόν περιλαμβάνουν ανεπαρκή ψύξη ή μαγείρεμα των τροφίμων, μη σωστή τήρηση των κανόνων προσωπικής υγιεινής και κατανάλωση ξαναζεσταμένων πιάτων, με αποτέλεσμα να επάγεται η παραγωγή τοξίνης. Επίσης, στα ζώα ο *Staphylococcus aureus* εντοπίζεται στο δέρμα και στις βλεννώδεις μεμβράνες, ενώ κύρια πηγή μόλυνσης κυρίως του γάλακτος και των γαλακτοκομικών προϊόντων αποτελούν οι προσβεβλημένοι μαστικοί αδένες των αγελάδων και άλλων ζώων (Doyle M.P and Beuchat L.R 2007, Robinson R.K et al. 1999).

1.2.3.8.3 Σταφυλοκοκκικές τροφικές δηλητηριάσεις

Η σταφυλοκοκκική τροφική δηλητηρίαση (Staphylococcal Food Poisoning, SFP), η οποία προκαλείται από την κατανάλωση τροφίμων που περιέχουν σταφυλοκοκκικές εντεροτοξίνες αποτελεί την κυριότερη αιτία τροφογενών εξάρσεων παγκοσμίως. Κάθε χρόνο στις ΗΠΑ εκτιμάται ότι σημειώνονται περίπου 25 τροφογενείς εξάρσεις

σταφυλοκοκκικής δηλητηρίασης, ενώ στη Γαλλία ο *Staphylococcus aureus* αποτελεί τη δεύτερη αιτία τροφογενών εξάρσεων μετά τη *Salmonella* (Keronanton A. et al. 2007, Doyle M.P and Beuchat L.R 2007). Έχει βρεθεί ότι η SEA αποτελεί την κυρίαρχη αιτία σταφυλοκοκκικής τροφικής δηλητηρίασης ακολουθούμενη σε συχνότητα από τις SED και SEC. Το 1985 σημειώθηκε έξαρση στο Kentucky της Αμερικής, λόγω της κατανάλωσης σοκολατούχου γάλακτος το οποίο είχε αποθηκευτεί σε υψηλές θερμοκρασίες πριν από την παστερίωση, η οποία προκάλεσε τη θανάτωση του βακτηρίου, αλλά όχι και της τοξίνης. Ωστόσο, επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι το γάλα εμπλέκεται λιγότερο σε τροφογενείς εξάρσεις, λόγω της παστερίωσης, σε σχέση με τα τυριά και την σκόνη γάλακτος, ενώ τα γαλακτοκομικά προϊόντα που έχουν υποστεί ζύμωση θεωρούνται ασφαλή, διότι το ωμό γάλα υπόκειται θερμικές επεξεργασίες και τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος αναστέλλουν τη σταφυλοκοκκική ανάπτυξη. Στην Αγγλία το 53% των σταφυλοκοκκικών τροφικών δηλητηριάσεων που σημειώθηκαν την περίοδο 1969-1990 οφειλόταν στην κατανάλωση προϊόντων κρέατος, το 22% στην κατανάλωση πουλερικών και το 8% σε προϊόντα γάλακτος. Αντίθετα, στις ΗΠΑ την περίοδο 1975-1982 το 36 % οφειλόταν σε κατανάλωση κρέατος, το 12.3% σε σαλάτες, το 11.3% σε πουλερικά και μόλις το 1.4% σε προϊόντα γάλακτος και θαλασσινά (Le Loir Y. et al. 2003, Robinson R.K et al 1999). Αξίζει να αναφερθεί ότι η μεγαλύτερη έξαρση κρουσμάτων σημειώθηκε στην Ιαπωνία το 2000, λόγω της κατανάλωσης σκόνης γάλακτος, μολυσμένης με ένα εντεροτοξιγενικό στέλεχος *Staphylococcus aureus*, ενώ στην Κορέα την περίοδο 1981-1995 σημειώθηκαν 64 εξάρσεις σταφυλοκοκκικής τροφικής δηλητηρίασης (Jay J.M et al. 2005).

1.3 Μέθοδοι ανίχνευσης των παθογόνων βακτηρίων στα τρόφιμα

Οι παραδοσιακές μικροβιολογικές μέθοδοι για τον έλεγχο της ποιότητας των τροφίμων αν και εφαρμόζονται αρκετά ακόμη και σήμερα είναι χρονοβόρες και απαιτητικές στη διεκπεραίωσή τους, καθώς για την παραλαβή των αποτελεσμάτων απαιτούνται αρκετές μέρες και επαναλαμβανόμενα στάδια εμπλουτισμού των δειγμάτων. Ωστόσο, τα τελευταία 10-15 χρόνια τείνουν να αντικατασταθούν από τις λεγόμενες «γρήγορες» τεχνικές (rapid methods), οι οποίες δίνουν αποτέλεσμα μέσα σε λίγα λεπτά ή ώρες, ενώ χαρακτηρίζονται από μεγαλύτερη ευαισθησία, εξειδίκευση και ακρίβεια. Οι συγκεκριμένοι μέθοδοι μπορεί να καταταχθούν στις: α) ανοσολογικές, β) μοριακές και γ) στα βιοχημικά kits ταυτοποίησης των μικροοργανισμών και σε εξειδικευμένα υποστρώματα και μέσα (Wilson C.L and Proby S. 2001, Doyle M.P and Beuchat L.R 2007).

1.3.1 Μικροβιολογικές μέθοδοι

Γενικά, για την ανίχνευση των παθογόνων στα τρόφιμα ακολουθούνται τα εξής στάδια: α) **προεμπλουτισμός** των δειγμάτων σε ένα μη εκλεκτικό μέσο για την επιδιόρθωση των τραυματισμένων κυττάρων και τον πολλαπλασιασμό τους, β)

εμπλουτισμό σε ένα εκλεκτικό μέσο, προκειμένου να αυξηθούν τα επίπεδα του οργανισμού-στόχου και παράλληλα να ανασταλεί η ανάπτυξη άλλων μικροοργανισμών στα τρόφιμα. Στους εκλεκτικούς παράγοντες ανήκουν: αντιβιοτικά, χρωστικές, απορρυπαντικά, ανόργανα και οργανικά χημικά, **γ) επίστρωση σε στερεά διαφορικά μέσα**, τα οποία συνήθως περιέχουν και εκλεκτικούς παράγοντες και **δ) εφαρμογή βιοχημικών, ορολογικών ή μοριακών τεστ** για την ταυτοποίηση και τον περαιτέρω χαρακτηρισμό των στελεχών (Caballero B. et al. 2003, Belei Ge and Jianghong Meng 2009, Robinson R.K et al. 1999, Wilson C.L and Proby S. 2001).

Όσον αφορά την ανίχνευση των στελεχών της *Salmonella* εφαρμόζονται τα συγκεκριμένα στάδια, τα οποία συνιστώνται από τους οργανισμούς ISO, AOACI, USDA και FDA. Στα κυριότερα χρησιμοποιούμενα μέσα προεμπλουτισμού περιλαμβάνονται το Lactose Broth (LB), το Buffered Peptone Water (BPW), το Trypticase Soya Broth (TSB), και το Nutrient broth. Το LB ίσως είναι ακατάλληλο όταν εφαρμόζεται για δείγματα που περιέχουν μεγάλο αριθμό μικροοργανισμών που ζυμώνουν τη λακτόζη, διότι η παραγωγή του οξέος μπορεί να αναστείλει την ανάπτυξη της *Salmonella*. Επιπλέον, διάφορες επιφανειοδραστικές ουσίες μπορούν να προστεθούν στο μέσο προεμπλουτισμού για τη διευκόλυνση της ανάκτησης των στελεχών *Salmonella* από τρόφιμα με υψηλή συγκέντρωση λίπους, ενώ οι θερμοκρασίες επώασης είναι συνήθως 35-37 °C για 18-24 h. Όσον αφορά τα εκλεκτικά μέσα τα 3 πιο κοινά χρησιμοποιούμενα είναι: το Rappaport Vassiliadis (RV) που έχει υιοθετηθεί από το ISO και το NCFA, το Selenite cystine (SC) και το τετραθειονικό (TT). Το κάθε ένα μέσο περιέχει διάφορους εκλεκτικούς παράγοντες, π.χ το RV περιέχει $MgCl_2$ και πράσινο του μαλαχίτη, το SC περιέχει νιτρικό οξύ του σελενήτη και το TT πράσινη χρωστική και χολικά άλατα. Συνήθως, χρησιμοποιούνται 2 εκλεκτικά μέσα, ενώ για τρόφιμα, με υψηλό μικροβιακό φορτίο η εφαρμογή υψηλών θερμοκρασιών διευκολύνει την ανάκτηση της *Salmonella* από τα τρόφιμα. Η επίστρωση πραγματοποιείται σε τριβλία που περιέχουν εκλεκτικούς παράγοντες, πηγή άνθρακα, πρωτεϊνών, μία χρωστική-δείκτη, ένα δείκτη υδροθείου και ανόργανα άλατα. Τα συνηθέστερα χρησιμοποιούμενα μέσα είναι τα: xylose lysine desoxycholate (XLD), hektoen enteric agar (HE), xylose lysine tergitol (XLT-4), bismuth sulphate agar (BS), brilliant green agar (BG). Επίσης, για τον βιοχημικό χαρακτηρισμό των στελεχών *Salmonella* τα πιο κοινά μέσα άγαρ είναι: το TSI (Triple Sugar Iron) και το LI (Lysine Iron Agar). Το TSI αποτελεί δείκτη της παραγωγής υδροθείου και της ζύμωσης της γλυκόζης, λακτόζης και σουκρόζης, ενώ το LI χρησιμοποιείται για τον έλεγχο του ενζύμου αποκαρβοξυλάση της λυσίνης, το οποίο είναι χαρακτηριστικό της *Salmonella*. Τέλος, τα στελέχη χαρακτηρίζονται ορολογικά, καθορίζοντας την αντιγονική τους σύσταση μέσω ανοσοσυγκόλλησης με τους αντίστοιχους ορούς (Tietjen M. and Fung D.Y.C 1995, Robinson R.K et al 1999).

Όσον αφορά την ανίχνευση των στελεχών του *S. aureus* όταν απαντά σε χαμηλούς αριθμούς στα τρόφιμα, τότε απαιτείται εμπλουτισμός σε υγρά μέσα που περιέχουν NaCl. Τα 2 πιο κοινά εκλεκτικά μέσα αποτελούν το Giolitti και το Cantoni broth. Η επίστρωση πραγματοποιείται σε εκλεκτικά μέσα, όπως είναι το Baird-Parker Agar (BP), το οποίο περιέχει κρόκο αυγού και tellurite για διαγνωστικούς λόγους, πυρουβικό και γλυκίνη ως εκλεκτικούς αυξητικούς παράγοντες και tellurite μαζί με χλωριούχο λίθιο ως εκλεκτικούς αναστολείς. Οι αποικίες στο BP άγαρ είναι σκούρες, με ένα άσπρο άκρο,

ενώ εμφανίζουν μία θολή ζωνή και μία ζώνη καθαρότητας. Για την επιβεβαίωση των στελεχών *S. aureus* ελέγχεται η παραγωγή κονγκουλάσης και νουκλέασης. Τροποποιήσεις του BP άγαρ έχουν γίνει, ώστε να μην υπάρχει ανάγκη περαιτέρω ελέγχου. Στον **πίνακα 6** παρουσιάζονται τα τεστ που εκτελούνται για τη διάκριση των μελών του γένους *Staphylococcus* από άλλα γένη, ενώ στον **πίνακα 7** αυτά που εφαρμόζονται για την κατάταξη των στελεχών στο σωστό είδος *Staphylococcus* (Robinson R.K et al 1999).

Πίνακας 6: Τεστ για τη διάκριση των μελών του γένους *Staphylococcus* από άλλα γένη παρόμοιας μορφολογίας (Robinson R.K. et al. 1999)

	<i>Staphylococcus</i>	<i>Micrococcus</i>	<i>Streptococcus</i>
Morphology	Cocccoid	Cocccoid	Cocccoid
Gram reaction	+	+	+
Catalase reaction	+	+	-
Fermentation of glucose	+	-	*
Sensitivity to lysostaphin	S	R	*
Acid from glycerol in presence of erythromycin	+	-	*

* Test not applicable.

Πίνακας 7: Χαρακτηριστικά ορισμένων ειδών του γένους *Staphylococcus* (Robinson R.K. et al. 1999)

	<i>S. aureus</i>	<i>S. hylcus</i>	<i>S. intermedius</i>	<i>S. epidermis</i>
Coagulation of human plasma	+	-	+	-
Production of thermostable nuclease	+	+	+	-
Aetoin produced when grown on glucose medium	+	-	-	†
Pigment produced when grown on agar media	+	-	-	-

1.3.2 Βιοχημικές δοκιμασίες, ειδικά υποστρώματα και υλικά

Ωστόσο, σήμερα για τον γρήγορο βιοχημικό χαρακτηρισμό των στελεχών εφαρμόζονται διαγνωστικές δοκιμασίες που διατίθενται στο εμπόριο, παρουσιάζοντας υψηλά επίπεδα ακρίβειας (**Πίνακας 8**) ($\geq 90\%$). Ενδεικτικά για την ανίχνευση της *Salmonella* εφαρμόζονται το API20E, στο οποίο περιλαμβάνονται 20 κύριες βιοχημικές δοκιμασίες, το EnterotubeII που περιλαμβάνει 12 βιοχημικές δοκιμασίες και το MICRO-ID που περιλαμβάνει 15 βιοχημικές δοκιμασίες απαραίτητες για τη διαφοροποίηση των στελεχών της οικογένειας *Enterobacteriaceae* (Beilei Ge and Jianghong Meng 2009, Tietjen M. and Fung D.Y.C 1995).

Ακόμη, στο εμπόριο κυκλοφορούν και εκλεκτικά θρεπτικά υλικά που περιέχουν χρωμογόνα ή φθορίζοντα υποστρώματα, διευκολύνοντας την ανίχνευση και την καταμέτρηση των παθογόνων βακτηρίων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το

υλικό που περιέχει το φθορίζον υπόστρωμα MUG, το οποίο υδρολύεται από το ένζυμο β-γλυκουρονιδάση (GUD), απελευθερώνοντας ένα φθορίζον προϊόν το οποίο ανιχνεύεται με UV. Το συγκεκριμένο ένζυμο παράγεται από το 94-96% των στελεχών της *E. coli* (εκτός από το στέλεχος *E. coli* O157:H7) και χρησιμοποιείται ως μέσο για τη διαφοροποίηση του συγκεκριμένου παθογόνου από άλλους μικροοργανισμούς, ενώ έχει βρεθεί ότι και μερικά στελέχη *Salmonella* και *Shigella* όπως και μερικά κωλοβακτηρίδια δίνουν θετική την αντίδραση της GUD (Jay M.J et al. 2005, Enne de Boer and Beumer R.R 1999). Επίσης, αρκετά θρεπτικά υλικά εφαρμόζονται και για την ανίχνευση της *Salmonella* και περιέχουν χρωμογόνα υποστρώματα για τον έλεγχο της δράσης της εστεράσης, της παραγωγής της α-γαλακτοσιδάσης ή της ζύμωσης της X-Gal και της προπυλενικής γλυκόλης (Doyle M.P and Beuchat L.R 2007).

Επιπλέον, η καταμέτρηση των επιπέδων του ATP με τη βοήθεια του ενζύμου λουσιφεράση είναι ένας χρήσιμος δείκτης για τον έλεγχο της παρουσίας βακτηρίων στα τρόφιμα. Συγκεκριμένα, παρουσία του ATP η λουσιφερίνη οξειδώνεται σε οξυλουσιφερίνη και το ολικό φως που απελευθερώνεται είναι ευθέως ανάλογο με την ποσότητα του ATP. Στο εμπόριο διατίθενται αρκετά τέτοια kit για την μέτρηση των επιπέδων του ATP, ενώ δεν απαιτούν κάποιο στάδιο εμπλουτισμού και μπορούν να διεξαχθούν μέσα σε λίγα λεπτά. Ωστόσο, παρουσιάζουν ορισμένους περιορισμούς στους οποίους ανήκουν το pH, η θερμοκρασία και η παρουσία αναστολέων της λουσιφεράσης (Enne de Boer and Beumer R.R 1999, Caballero B. et al. 2003, Doyle M.P and Beuchat L.R 2007).

Τέλος, για την καταμέτρηση και την ταυτοποίηση της *Salmonella*, των κολοβακτηριδίων και της *E. coli* O157:H7 εφαρμόζεται η τεχνική HGMF (ISO-grid, Hydrophobic Grid Membrane Filter), κατά την οποία τα ομογενοποιημένα δείγματα τροφίμων φιλτράρονται για την απομάκρυνση των σωματιδίων που είναι μεγαλύτερα από 5μM. Κατόπιν, το δείγμα φιλτράρεται ξανά μέσω της ειδικής μεμβράνης, η οποία παγιδεύει τους μικροοργανισμούς στόχους και ακολουθεί τοποθέτησή τους στο κατάλληλο άγαρ για την ανάπτυξη των αποικιών (Enne de Boer and Beumer R.R 1999, Tietjen M. and Fung D.Y.C 1995).

Πίνακας 8: Ορισμένες βιοχημικές δοκιμασίες για την ταυτοποίηση των παθογόνων στα τρόφιμα (Doyle M.P. and Beuchat L.R. 2007).

Assay name	Format	Manufacturer	Target bacteria
API ^b	Biochemical	bioMérieux	<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Listeria</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Campylobacter</i> , nonfermenting bacteria, anaerobic bacteria
Micro-ID ^c	Biochemical	REMEL	<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Listeria</i>
Enterotube II	Biochemical	Becton Dickinson	<i>Enterobacteriaceae</i>
BBL Crystal	Biochemical	Becton Dickinson	<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Vibrionaceae</i> , nonfermenting bacteria, anaerobic bacteria

1.3.3 Μοριακές μέθοδοι

Η ανίχνευση των παθογόνων βακτηρίων στα τρόφιμα, η οποία βασίζεται στις μοριακές τεχνικές έχει γνωρίσει πραγματική επανάσταση κατά τις τελευταίες δεκαετίες, καθώς αξιοποιεί τις ανακαλύψεις που έχουν γίνει στο πεδίο της μοριακής βιολογίας. Δύο βασικές τεχνικές εφαρμόζονται για την ανίχνευση και την ταυτοποίηση των παθογόνων μικροοργανισμών στα τρόφιμα: **i) οι μέθοδοι υβριδισμού** και **ii) η PCR**, η οποία έθεσε και τα θεμέλια για το σχεδιασμό και την ανάπτυξη πολλών άλλων μεθόδων ενίσχυσης του DNA. Ως DNA-στόχοι επιλέγονται συνήθως γονίδια που σχετίζονται με την μολυσματικότητα, όπως αυτά που κωδικοποιούν για διάφορες τοξίνες-πχ η βεροτοξίνη στην *E.coli*, η εντεροτοξίνη B στον *S. aureus*, η λιστεριολυσίνη στην *L. monocytogenes*, η νευροτοξίνη τύπου A στο *Cl. botulinum* και η τοξίνη της χολέρας στο *V. cholerae* και αυτά που σχετίζονται με μολυσματικά πλασμίδια, όπως στην περίπτωση του *Y. enterocolitica*. Επίσης, γονίδια που κωδικοποιούν για ειδικά ένζυμα, όπως είναι η θερμονουκλεάση (*S. aureus*), η β-γαλακτοσιδάση, η β-γλυκουρονιδάση (*E.coli*, *Shigella*) και η συνθετάση της αβεκουόζης και της παρατόζης (*Salmonella*), αλλά και γονίδια που κωδικοποιούν για εξωτερικές μεμβρανικές αντιγονικές ή βλεφαριδικές πρωτεΐνες έχουν αποτελέσει συνήθεις στόχους των μοριακών μεθόδων. Τέλος, η χρήση αλληλουχιών με υψηλό αριθμό αντιγράφων, όπως οι αλληλουχίες rDNA και τα IS στοιχεία αυξάνουν την ευαισθησία της μεθόδου ανίχνευσης των παθογόνων βακτηρίων στα τρόφιμα (Scheu P.M. et al. 1998).

1.3.3.1 Μέθοδοι υβριδισμού

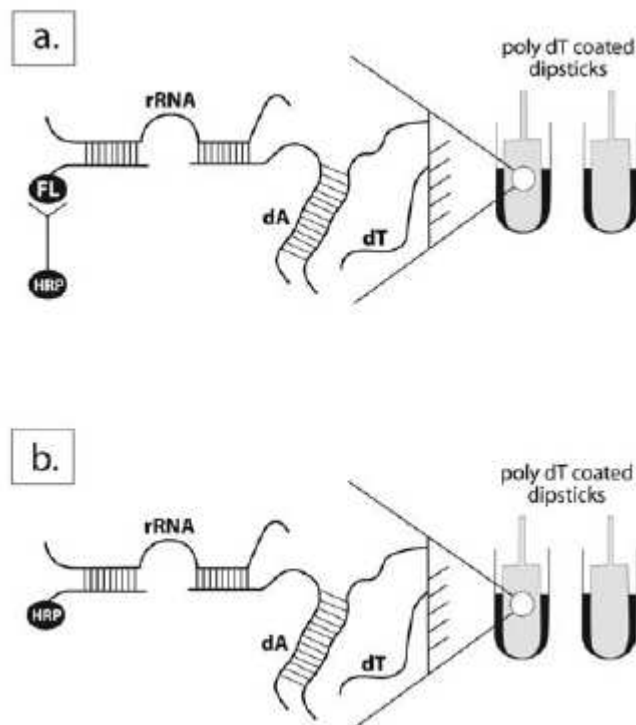
Οι βασικοί μέθοδοι υβριδισμού με ιχνηθέτες που εφαρμόζονται για την ανίχνευση των παθογόνων στα τρόφιμα περιλαμβάνουν: i) Υβριδοποίηση αποικιών (colony hybridization), ii) υβριδισμός με αντικατάσταση αλυσίδας και iii) sandwich υβριδισμός.

i) Υβριδοποίηση αποικιών (Colony hybridization): Αποικίες βακτηρίων που αναπτύσσονται σε τριβλία μεταφέρονται σε μεμβράνη nylon ή νιτροκυτταρίνης και ακολουθεί αλκαλική ή θερμική επεξεργασία ή εφαρμογή ακτινοβολίας για τη λύση των κυττάρων και την αποδιάταξη του DNA. Κατόπιν, το μονόκλωνο DNA δεσμεύεται στη μεμβράνη μέσω εφαρμογής UV ή θέρμανσης και τέλος προστίθεται ο σημασμένος με ραδιοϊσότοπα ή με διγοξυγενίνη ή βιοτίνη ιχνηθέτης, ακολουθεί υβριδισμός με την αλληλουχία DNA-στόχο, ξέπλυμα για την απομάκρυνση του μη δεσμευμένου ιχνηθέτη και ανίχνευση του σήματος.

ii) Υβριδισμός με αντικατάσταση αλυσίδας: Ένας ιχνηθέτης σύλληψης (capture probe) με αλληλουχία συμπληρωματική της αλληλουχίας-στόχου δεσμεύεται σε μία στερεή επιφάνεια και ένας σημασμένος μικρού μεγέθους ιχνηθέτης υβριδίζεται με αυτόν. Όταν προστεθεί η αλληλουχία-στόχος, τότε αυτή υβριδίζεται με την αλληλουχία του capture probe και απελευθερώνεται στην υγρή φάση ο σημασμένος ιχνηθέτης.

iii) Sandwich υβριδισμός: Πραγματοποιείται εμπλουτισμός των δειγμάτων τροφίμων, λύση των βακτηριακών κυττάρων, απελευθέρωση του rRNA και προσθήκη των ολιγονουκλεοτιδικών ιχνηθετών (capture probe και σημασμένος με φλουορεσκεΐνη ιχνηθέτης). Ταυτόχρονα εισάγεται και μία πλαστική στερεή φάση dipstick, η οποία φέρει polydT, ώστε να δεσμεύεται με την polyA ουρά του capture probe. Ο μη δεσμευμένος ιχνηθέτης απομακρύνεται με ξέπλυμα και η στερεή φάση τοποθετείται σε διάλυμα που περιέχει αντιφλουορεσκεΐνη-HRP. Ακολουθεί ξέπλυμα και προσθήκη του υποστρώματος για την χρωματομετρική ανίχνευση.

Το εμπορικά διαθέσιμο kit GENE-TRAK 2^{ης} γενιάς βασίζεται ακριβώς στην τεχνική sandwich υβριδισμού και στην ενζυμο-μεσολαβούμενη χρωματομετρική ανίχνευση που περιγράφηκε πιο πάνω. Στα επόμενης γενιάς GENE-TRAK kit ο ιχνηθέτης ανίχνευσης είναι σημασμένος απευθείας στο 5' άκρο του με το ένζυμο horseradish peroxidase (HRP), με αποτέλεσμα την ελαχιστοποίηση των επακόλουθων σταδίων ξεπλύματος (Εικόνα 2).



Εικόνα 2: Sandwich υβριδισμός: α) Έμμεσο σύστημα ανίχνευσης χρησιμοποιώντας το σύμπλοκο αντι-φλουορεσκεΐνη-HRP, β) Απευθείας ανίχνευση με τη χρήση ιχνηθέτη σημασμένου με HRP στο 5' άκρο του (Mozola M.A. 2006).

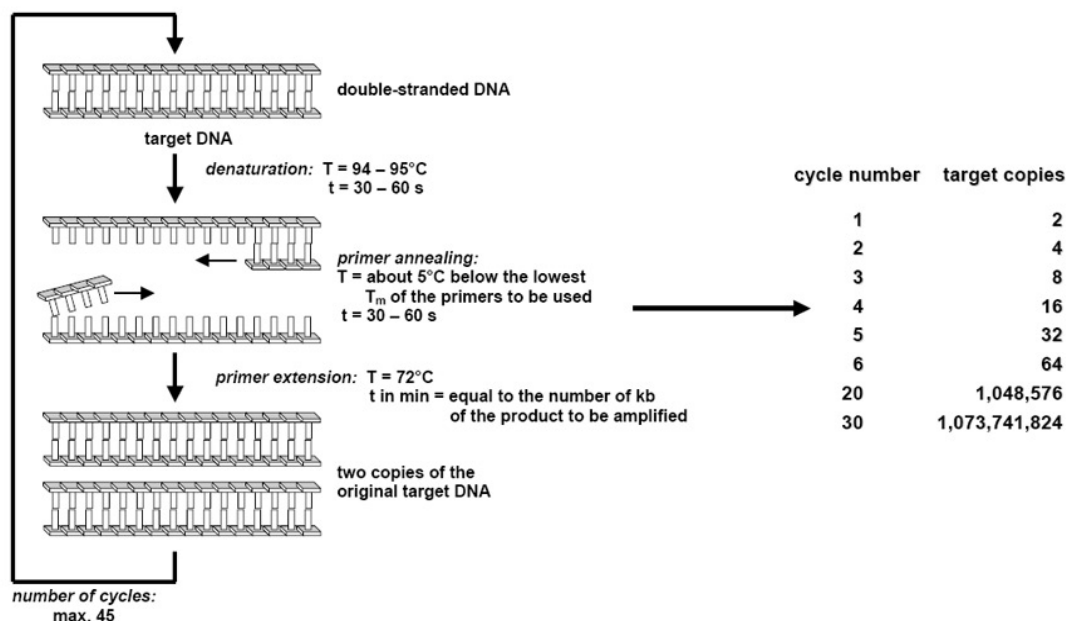
Όλες οι μέθοδοι υβριδισμού απαιτούν τον προεμπλουτισμό των δειγμάτων, δίνουν αποτέλεσμα μετά από ~42-48 h και μπορούν να ανιχνεύσουν $\sim 10^6$ - 10^7 CFU. Το GENE-TRAK στοχεύει σε αλληλουχίες του 16S ή του 23S βακτηριακού rRNA και έχει εφαρμοστεί για την ανίχνευση αρκετών παθογόνων βακτηρίων, όπως τα *Salmonella*, *L. monocytogenes*, *E. coli*, *S. aureus*, *Campylobacter* και *Y. enterocolitica*. Συγκεκριμένα, έχει εφαρμοστεί για την ανίχνευση της *Salmonella* σε 1100 δείγματα τροφίμων, επιτυγχάνοντας 97,7% ευαισθησία και 100% εξειδίκευση (Robinson R.K et al. 1999, Scheu P.M. et al. 1998, Mozola M.A 2006, Olsen J.E 2000).

1.3.3.2 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Γύρω στο 1990 δημοσιεύτηκαν οι πρώτες PCR μέθοδοι για την ανίχνευση των παθογόνων στα τρόφιμα. Από τότε η βελτίωση των τεχνικών προετοιμασίας των δειγμάτων και η εμφάνιση νέων μέσων προεμπλουτισμού έχουν καταστήσει την PCR ως μία σημαντική και ευαίσθητη *in vitro* τεχνική ικανή να πολλαπλασιάσει μία αλληλουχία από ένα μόνο μόριο DNA.

Γενικά, η PCR μπορεί να εφαρμοστεί είτε για την ταυτοποίηση των βακτηριακών στελεχών στο τελευταίο στάδιο των μικροβιολογικών μεθόδων, αντικαθιστώντας τον βιοχημικό ή ορολογικό έλεγχο, είτε για την ανίχνευση των βακτηρίων στα τρόφιμα απευθείας ή μετά από επώαση των δειγμάτων σε ένα κατάλληλο μέσο εμπλουτισμού (Rijpens N.P and Herman L.M.F 2002).

Ένα τυπικό πρωτόκολλο PCR περιλαμβάνει πολλούς κύκλους (συνήθως 25-35), ο καθένας εκ των οποίων περιλαμβάνει επώαση των δειγμάτων σε διαφορετικές θερμοκρασίες με βάση τα ακόλουθα βήματα (**Εικόνα 3**): **i) Αποδιάταξη (Denaturation)**: Το δείγμα θερμαίνεται αρχικά στους 95°C για ~5 min, ώστε τα δίκλινα μόρια DNA να αποδιαταχθούν και να παραχθούν οι μονόκλωνες αλυσίδες που θα χρησιμεύσουν ως εκμαγεία για τους εκκινητές και την DNA πολυμεράση. **ii) Υβριδοποίηση (Annealing)**: Η θερμοκρασία μειώνεται γύρω στους 50-65 °C, ώστε οι εκκινητές να υβριδοποιηθούν με τις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στα μόρια του μονόκλωνου DNA. Οι θερμοκρασίες και οι χρόνοι που εφαρμόζονται σε αυτό το στάδιο ποικίλλουν ανάλογα με τις αλληλουχίες που ενισχύονται. **iii) Επέκταση (Extension)**: Η θερμοκρασία αυξάνεται στους 72 °C, περιοχή βέλτιστης θερμοκρασίας για τη θερμοσταθερή Taq DNA πολυμεράση, ώστε να εκτελέσει τη σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας. Ο χρόνος επώασης στους 72 °C ποικίλλει ανάλογα με το μήκος του DNA-στόχου. Τέλος ο χρόνος προέκτασης του τελικού κύκλου διαρκεί συνήθως περισσότερο (~10min), έτσι ώστε να δοθεί χρόνος στην πολυμεράση για την ολοκλήρωση της προέκτασης όλων των προϊόντων. Το τελικό αποτέλεσμα μίας αντίδρασης PCR μετά από n κύκλους είναι η παραγωγή θεωρητικά 2^n δίκλωνων μορίων DNA που είναι πιστά αντίγραφα της αλληλουχίας DNA που περικλείεται μεταξύ των εκκινητών (Prasad P. and Vidyarthi A.S 2009, Mauer J. 2006).



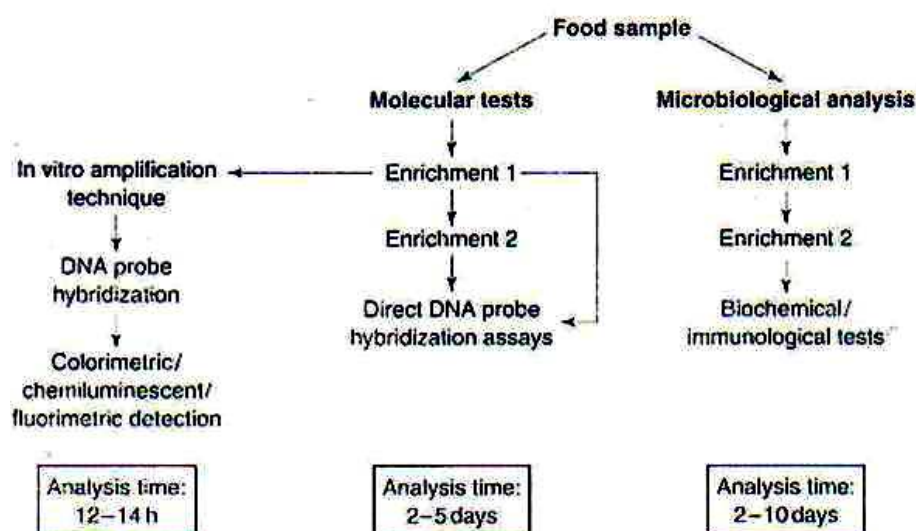
Εικόνα 3: Polymerase Chain Reaction (PCR)

Ο πιο απλός τρόπος προσδιορισμού των προϊόντων της PCR είναι η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων σε πηκτή αгарόζης, η συγκέντρωση της οποίας εξαρτάται από το μέγεθος του τμήματος DNA-στόχου. Οι μέθοδοι υβριδισμού με τη χρήση σημασμένων ιχνηθετών επιτρέπουν την ανίχνευση των PCR-προϊόντων με αρκετά υψηλή ευαισθησία. Η σήμανση των ανιχνευτών μπορεί να είναι είτε άμεση με τη χρήση ραδιοϊσοτόπων ή φθορίζουσών χρωστικών είτε έμμεση με τη χρήση των συμπλόκων, όπως βιοτίνη-στρεπταβιδίνη (SA), διγοξυγενίνη (DIG)-αντιδιγοξυγενίνη, φλουορεσκεΐνη-αντιφλουορεσκεΐνη. Εναλλακτικά, στην αντίστροφη τεχνική υβριδισμού πραγματοποιείται η PCR με βιοτινυλιωμένους εκκινητές και στη συνέχεια το προϊόν PCR υβριδίζεται με ένα capture probe, ο οποίος είναι δεσμευμένος με μία μεμβράνη. Η προσθήκη SA-αλκαλική φωσφατάση (ALP) και κάποιου χρωμογενικού υποστρώματος οδηγεί στην ανίχνευση του συμπλόκου. Ακόμη, μπορεί να επιτευχθεί $\sim 10^2$ - 10^5 φορές μεγαλύτερη ευαισθησία, πραγματοποιώντας PCR με ένα σημασμένο με διγοξυγενίνη εκκινητή και με ένα βιοτινυλιωμένο ανιχνευτή. Το συγκεκριμένο σύμπλοκο μπορεί να ποσοτικοποιηθεί με ELISA μέσω δέσμευσής του με μία μικροπλάκα καλυμμένη με SA, ακολουθούμενη από την προσθήκη ενός συμπλόκου αντιDIG-HRP-Ab. Τέλος, άλλες μέθοδοι ανίχνευσης περιλαμβάνουν αλληλούχιση και nested PCR (Wilson C.L and Droby S. 2001, Robinson R.K et al. 1999).

1.3.3.2.1 Πλεονεκτήματα και περιορισμοί της εφαρμογής της PCR στα τρόφιμα

Η PCR συγκρινόμενη με τις μικροβιολογικές μεθόδους χαρακτηρίζεται από υψηλή ευαισθησία, η οποία εξαρτάται από τις συνθήκες αντίδρασης, τη σύσταση των τροφίμων

και τη μέθοδο ανίχνευσης των PCR-προϊόντων και από υψηλή εξειδίκευση, η οποία καθορίζεται από την αλληλουχία των εκκινητικών μορίων και τη θερμοκρασία υβριδισμού (**Πίνακας 9**). Εξαιτίας της υψηλής ευαισθησίας της, επιτρέπει την ανίχνευση των παθογόνων βακτηρίων είτε εφαρμοζόμενη απευθείας στα τρόφιμα, είτε μετά από κάποιο στάδιο εμπλουτισμού, δίνοντας αποτέλεσμα μέσα σε διάστημα λίγων ωρών (~12-14h) συγκρινόμενη με τις μεθόδους υβριδισμού (**Εικόνα 4**). Επίσης, μπορεί να εφαρμοστεί για την ανίχνευση ιών, παρασίτων και παθογόνων βακτηρίων για τα οποία δεν υπάρχουν κατάλληλα μέσα και μικροβιολογικές μέθοδοι (Wilson C.L and Droby S. 2001, Robinson R.K et al. 1999).



Εικόνα 4: Σύγκριση των μικροβιολογικών μεθόδων και των μοριακών μεθόδων για την ανίχνευση των παθογόνων βακτηρίων στα τρόφιμα (Robinson R.K. et al. 1999).

Πίνακας 9: Σύγκριση των μικροβιολογικών μεθόδων και της PCR για την ανίχνευση των παθογόνων βακτηρίων στα τρόφιμα (Robinson R.K. et al. 1999).

Step of analysis	Microbiology	PCR
Enrichment	Non-selective pre-enrichment in liquid media (16–20 h) followed by selective enrichment in liquid media (24–48 h) or rapid enrichment (16 h, some methods only)	Rapid enrichment (16 h)
Isolation/identification	Isolation of bacterial colonies on selective solid media (24 h) followed by identification by biochemical tests (24–48 h)	Sample purification, target amplification and detection (8 h)
Result	After 3–6 days	After 24 h

Ωστόσο, η PCR παρουσιάζει και ορισμένους περιορισμούς/μειονεκτήματα όταν εφαρμόζεται για την ανίχνευση των παθογόνων βακτηρίων στα τρόφιμα.

Η PCR μπορεί να οδηγήσει σε ψευδώς θετικά αποτελέσματα καθώς επιτρέπει την ανίχνευση όχι μόνο των βιώσιμων βακτηριακών κυττάρων αλλά και των νεκρών κυττάρων. Η χρήση μέσων εμπλουτισμού μπορεί να δώσει λύση στο συγκεκριμένο πρόβλημα και να αυξήσει την ευαισθησία της PCR, όταν ο αριθμός του μικροοργανισμού-στόχου είναι χαμηλός στα δείγματα των τροφίμων. Εναλλακτικά, η ανίχνευση μόνο των βιώσιμων βακτηρίων μπορεί να επιτευχθεί με την εφαρμογή της PCR που στοχεύει στο βακτηριακό mRNA/rRNA αν και οι συγκεκριμένες μέθοδοι χαρακτηρίζονται από χαμηλότερη ευαισθησία σε σχέση με αυτές που στοχεύουν στο DNA.

Ακόμη, άλλη δυσκολία στην εκτέλεση της PCR είναι η παρουσία αναστολέων στα τρόφιμα. Ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα μπορεί να οφείλονται σε αποικοδόμηση του DNA-στόχου ή των εκκινητών από τις νουκλεάσες, στην παρουσία συστατικών που χηλώνουν το Mg^{+2} και σε αναστολή της DNA πολυμεράσης. Μελέτες έχουν δείξει ότι υψηλά επίπεδα λαδιού, άλατος, υδατανθράκων και αμινοξέων δεν έχουν ανασταλτική δράση, ενώ αντίθετα η καζεΐνη, τα Ca^{+2} , τα πολυφαινολικά συστατικά, το γλυκογόνο, οι πρωτεΐνες, οι σύνθετοι πολυσακχαρίτες, το λίπος και ορισμένα συστατικά των μέσων εμπλουτισμού μπορούν να αναστείλουν την PCR.

Αρκετές μέθοδοι προετοιμασίας των δειγμάτων έχουν περιγραφεί για την απομάκρυνση των ανασταλτικών συστατικών των τροφίμων (Πίνακας 10).

Πίνακας 10: Μέθοδοι προετοιμασίας των δειγμάτων για την PCR ανίχνευση των παθογόνων βακτηρίων (Lantz P.-G. et al. 1994).

Sample pretreatment	Procedure	Sample	Organism	Detection level
Physical methods				
Dilution	DNA extraction, dilution	Soil sediment	<i>E. coli</i>	2.0×10^5 cells per g sediment
Centrifugation	Centrifugation, washing	Milk	<i>L. monocytogenes</i>	1 cell per ml milk
Filtration	Cell lysis, filtration, solubilization, DNA extraction	Milk	<i>L. monocytogenes</i>	0.003 cfu per ml milk
Enrichment	Homogenization, incubation, low-speed centrifugation, high-speed centrifugation, washing, microwave lysis	Soft cheese, chicken	<i>L. monocytogenes</i>	10–100 cfu per g
DNA extraction methods				
Lysis	Heat treatment	Serum	Hepatitis B virus	10^1 – 10^3 genome copies per ml serum
DNA affinity	Low-speed centrifugation, high-speed centrifugation, DNA extraction, purification with silica particles, dilution	Stool	<i>E. coli</i>	2.0×10^6 bacteria per g
Adsorption methods				
Immunological	Homogenization, enrichment I, enrichment II, immunologic capture, washing, centrifugation	Cheeses (Port Salut, curd cheese, Brie)	<i>L. monocytogenes</i>	1 cfu per g cheese
Lectin	Homogenization, lectin capture, elution	Chicken	<i>Brochothrix</i> spp.	10^3 – 10^6 cfu per g

Στις φυσικές μεθόδους ανήκουν: α) η αραίωση των δειγμάτων. Στη συγκεκριμένη περίπτωση η ευαισθησία της PCR μειώνεται ανάλογα με τον παράγοντα αραίωσης. Χαρακτηριστικά αναφέρεται ότι σε συγκεντρώσεις γάλακτος <0.05% και σε c=1-10% σχηματιζόταν προϊόν της PCR, αλλά όχι όμως και σε c>10% , λόγω της περίσσειας μίας πρωτεΐνης που αποικοδομεί την DNA πολυμεράση, β) η χρήση μέσων εμπλουτισμού, γ) η φυγοκέντρωση και δ) η διήθηση. Επίσης, μπορεί να πραγματοποιηθεί λύση των βακτηριακών κυττάρων με την εφαρμογή υψηλής θερμοκρασίας και την επεξεργασία με πρωτεάσες (πρωτεΐνάση K), απορρυπαντικά, όπως το SDS και το Triton-X-100, ακολουθούμενη από τον καθαρισμό του DNA με τη χρήση οργανικών διαλυτών (φαινόλη/χλωροφόρμιο) και την καθίζησή του με αιθανόλη. Εναλλακτικά, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ανιονικές στήλες συγγένειας που δεσμεύουν το DNA ή η Chelex 100 ρητίνη, η οποία χηλώνει πολυσθενή μεταλλικά ιόντα, προστατεύοντας έτσι το DNA από την αποικοδόμησή του. Άλλη μέθοδος για τον διαχωρισμό των βακτηρίων από τα τρόφιμα αποτελεί ο ανοσομαγνητικός διαχωρισμός (IMS), όπου μονοκλωνικά αντισώματα ειδικά για τον μικροοργανισμό ακινητοποιούνται πάνω σε μαγνητικά σφαιρίδια και προστίθενται στα δείγματα. Βασικό πρόβλημα της συγκεκριμένης τεχνικής είναι η παρεμβολή των σωματιδίων των τροφίμων στο σύμπλοκο αντισώματος-μικροοργανισμού. Τέλος, η προσθήκη αλβουμίνης (BSA) εφαρμόζεται κυρίως για δείγματα που περιέχουν πρωτεάσες ή φαινολικά συστατικά (Lantz P.-G. et al. 1994, Mauer J. 2006, Scheu P.M et al. 1998, Rodriguez L.D and Hernandez M. 2006).

1.3.3.2.2 Εφαρμογές της PCR για την ανίχνευση της *Salmonella* στα τρόφιμα

Οι Rahn et al. (1992) σχεδίασαν εκκινητές για την ανίχνευση όλων των οροτύπων της *Salmonella* που στόχευαν στο γονίδιο *invA*. Η ανίχνευση του αναμενόμενου προϊόντος των 284bp πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση σε 2% gel αгарόζης, ενώ για την επαλήθευση των αποτελεσμάτων, ακολούθησε υβριδισμός ενός ³²P-σημασμένου τμήματος του γονιδίου *invA* με το προϊόν της PCR. Η ανίχνευση του 99.4% των στελεχών *Salmonella* έδειξε ότι το *invA* γονίδιο αποτελεί κατάλληλο στόχο για την PCR-ανίχνευση της (Rahn K. et al. 1992, Harris L.J. and Griffiths M.W. 1992).

Οι Ferreti et al. (2001) πραγματοποίησαν PCR για την ανίχνευση της *Salmonella* σε τεχνητά και φυσικά μολυσμένο σαλάμι ιταλικής προέλευσης με εκκινητές που στόχευαν σε μία συντηρημένη αλληλουχία 389 bp μέσα στο γονίδιο *invA*, μετά από εμπλουτισμό των δειγμάτων για 6 h σε Buffered Peptone Water (BPW). Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μεθόδου είχαν απόλυτη συσχέτιση με εκείνα που λήφθηκαν με τις μικροβιολογικές μεθόδους (Ferreti R. et al. 2001). Σε μία άλλη έρευνα ανίχνευσης της *Salmonella* σε δείγματα κοτόπουλου μελέτησαν την επίδραση των διαφορετικών μέσων εμπλουτισμού στην ευαισθησία και στην εξειδίκευση της PCR, την ελάχιστη χρονική περίοδο εμπλουτισμού και το ελάχιστο βακτηριακό φορτίο που μπορεί να ανιχνευτεί με την PCR. Διαπιστώθηκε ότι η μεγαλύτερη ευαισθησία επιτυγχάνεται μετά από προεμπλουτισμό σε BPW, ακολουθούμενο από εκλεκτικό εμπλουτισμό σε TT-H, ενώ ο ελάχιστος χρόνος προεμπλουτισμού και το ελάχιστο βακτηριακό φορτίο βρέθηκε ότι

ήταν 8h και 128 CFU/ml αντίστοιχα (Myint M.S et al. 2006). Οι Saroj et al. (2008) πραγματοποίησαν μία πρώτη PCR με εκκινητές τους TS11 και TS4 και ακολούθως το προϊόν αυτής της PCR χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα για την nested PCR με εκκινητές τους TS11 και TS5 για την ανίχνευση της *Salmonella* σε τεχνητά μολυσμένα τρόφιμα (καρότο, κοτόπουλο, αγγούρι), μετά από εμπλουτισμό σε Lactose broth για 6 h. Για φυσικά μολυσμένα τρόφιμα (κοτόπουλο, ψάρι, βλαστοί) βρέθηκε ότι ο πιο αποτελεσματικός ήταν ο εμπλουτισμός στο μέσο Rappaport Vassiliadis (Saroj S.D. et al. 2008). Σε μία άλλη μελέτη πραγματοποίησαν PCR για την ανίχνευση της *Salmonella* σε τρόφιμα μετά από προεμπλουτισμό των δειγμάτων ακολουθούμενο από διήθηση, συγκέντρωση των βακτηρίων και απομάκρυνση των ανασταλτικών συστατικών των τροφίμων με ανοσομαγνητικό διαχωρισμό (Jenikova G. et al. 2000).

Σε άλλες μελέτες πραγματοποίησαν multiplex PCR για την ταυτόχρονη ανίχνευση της *Salmonella* και άλλων παθογόνων σε διάφορα είδη τροφίμων (Yong Li and Mustapha A. 2004, Fratamico P.M and Strobaugh T.P 1998, Kim J. et al. 2006). Επίσης, η απευθείας ανίχνευση της *Salmonella* με την PCR χωρίς επώαση σε κάποιο μέσο εμπλουτισμού έχει εφαρμοστεί σε ελάχιστες περιπτώσεις. Συγκεκριμένα, η ευαισθησία της PCR σε 96 φυσικά μολυσμένα δείγματα κρέατος βρέθηκε ότι ήταν 0.92, συγκρινόμενη με εκείνη των μικροβιολογικών μεθόδων η οποία ήταν χαμηλότερη και ίση με 0.50 (Olsen J.E 2000).

Σήμερα, διατίθενται στο εμπόριο αρκετά kit τα οποία βασίζονται στην PCR για την ανίχνευση της *Salmonella* στα τρόφιμα. Το πρώτο και πιο γνωστό kit που κυκλοφόρησε ήταν το BAX system της Qualicon το οποίο περιλαμβάνει μη εκλεκτικό εμπλουτισμό των δειγμάτων για 18-24 h ακολουθούμενο από επώαση σε ένα εκλεκτικό μέσο (BHI) για ~3h. Κατόπιν, τα βακτηριακά κύτταρα λύνονται με επώαση σε υψηλή θερμοκρασία και επεξεργασία με πρωτεάση και τα προϊόντα της PCR ανιχνεύονται με ηλεκτροφόρηση σε gel αгарόζης (Robinson R.K et al. 1999, Mozola M.A 2006). Σε μία μελέτη εφάρμοσαν το BAX σύστημα για την ανίχνευση της *Salmonella* σε τεχνητά και φυσικά μολυσμένα τρόφιμα και βρέθηκε 98.6% και 95.8% συμφωνία με τις μικροβιολογικές μεθόδους αντίστοιχα (Bennett A.R et al. 1998).

Άλλο διαθέσιμο kit είναι το Probelia σύστημα της Sanofi Diagnostics Pasteur, το οποίο βασίζεται στην PCR ενίσχυση του γονιδίου *iagA* της *Salmonella* ακολουθούμενη από ανίχνευση των προϊόντων μέσω υβριδισμού με σημασμένους με υπεροξιδάση ιχνηθέτες σε μικροπλάκες. Οι Wan J. et al. (2000) εφάρμοσαν το Probelia σύστημα για την ανίχνευση της *Salmonella* σε τεχνητά μολυσμένα δείγματα σκόνης γάλακτος και τυριών (ricotta cheese) και τα αποτελέσματα που λήφθηκαν σχετίζονταν απόλυτα με αυτά από τις μικροβιολογικές μεθόδους (Australian Standard Method) (Wan J. et al. 2000).

1.3.3.2.3 Εφαρμογές της PCR για την ανίχνευση του *Staphylococcus aureus* στα τρόφιμα

Οι Alarcon B. et al. (2006) εφάρμοσαν PCR με εκκινητές που στόχευαν στο γονίδιο *nuc* για την ανίχνευση του *Staphylococcus aureus* σε τεχνητά μολυσμένα δείγματα

κρέατος και στη συνέχεια πραγματοποίησαν RTQ-PCR SYBR Green I και TaqMan αντίστοιχα, ώστε να αυξηθεί η ευαισθησία της PCR. Ακόμη, εξέτασαν και 164 φυσικά μολυσμένα τρόφιμα με PCR και μικροβιολογικές μεθόδους και βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ των 2 μεθόδων ~ 93.3% (Alarcon B. et al. 2006). Σε μία άλλη μελέτη πραγματοποίησαν PCR για την ανίχνευση των εντεροτοξιγόνων στελεχών *Staphylococcus aureus* σε τεχνητά μολυσμένο σκόνη γάλακτος, με εκκινητές που στόχευαν στα γονίδια των σταφυλοκοκκικών εντεροτοξινών B και C (*entB* και *entC1*) και στο γονίδιο *nuc*. Μετά από ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR σε 2% gel αгарόζης, ανιχνεύτηκαν 100pg καθαρού DNA, ενώ η ευαισθησία αυξήθηκε σε 1fg όταν εφαρμόστηκε αμέσως μετά nested PCR (Wilson et al. 1991). Παρομοίως, σε άλλη έρευνα εφαρμόστηκε η PCR για την ανίχνευση των εντεροτοξιγόνων στελεχών *Staphylococcus aureus* τύπου A, D και E σε τεχνητά μολυσμένα κρέατα και ψάρια, στοχεύοντας σε γονίδια των εντεροτοξινών *entA*, *entD* και *entE* (Tsen H.-Y. and Chen T.-R. 1992). Οι Elizaquivel P. and Aznar R. (2008) εξέτασαν την ευαισθησία 4 kit απομόνωσης του DNA του *Staphylococcus aureus* και άλλων 3 παθογόνων σε τεχνητά μολυσμένα φρέσκα και ελάχιστα επεξεργασμένα λαχανικά, εκτιμώντας κάθε φορά τα προϊόντα της PCR που λαμβάνονταν (Elizaquivel P. and Aznar R. 2008).

Οι ίδιοι συγγραφείς σε μία άλλη δημοσίευσή τους πραγματοποίησαν multiplex real time PCR (SYBR Green και TaqMan) για την ταυτόχρονη ανίχνευση σε φρέσκα και ελάχιστα επεξεργασμένα λαχανικά του *Staphylococcus aureus* και άλλων 2 παθογόνων (Elizaquivel P. and Aznar R. 2008). Οι Wang R.-F. (1997) πραγματοποίησαν PCR για την ανίχνευση 13 παθογόνων (μεταξύ των οποίων και του *Staphylococcus aureus*) σε δείγματα θαλασσινών τροφών και μαλακών τυριών, εφαρμόζοντας τις ίδιες PCR συνθήκες για όλα τα παθογόνα βακτήρια. Για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε υβριδισμός των PCR προϊόντων με ³²P ιχνηθέτες καθώς και nested PCR (Wang R.-F. 1997).

Αρκετά λίγες δημοσιεύσεις υπάρχουν για την απευθείας ανίχνευση του *Staphylococcus aureus* χωρίς τη μεσολάβηση του σταδίου εμπλουτισμού. Οι Yang Y. et al. (2007) πραγματοποίησαν PCR με εκκινητές που στόχευαν στο γονίδιο της θερμοσταθερής νουκλεάσης (*nuc*) για την απευθείας ανίχνευση του *Staphylococcus aureus* σε τεχνητά μολυσμένα γαλακτομικά προϊόντα (γάλα και τυριά) (Yang Y. et al. 2007). Επίσης, σε μία άλλη μελέτη ανίχνευσαν απευθείας με PCR στελέχη *Staphylococcus aureus* σε τεχνητά μολυσμένα τρόφιμα, στοχεύοντας σε γονίδια των εντεροτοξινών, μετά από επώαση σε πρωτεϊνάση K και απομόνωση του DNA με φαινόλη/χλωροφόρμιο (Cardian U. 1995).

Στο εμπόριο διατίθενται και kit που βασίζονται στην PCR για την ανίχνευση του *Staphylococcus aureus* στα τρόφιμα με πιο γνωστό αυτό της Bioteccon Diagnostics. Το πρωτόκολλο που ακολουθείται περιλαμβάνει εμπλουτισμό των δειγμάτων, καθαρισμό, ενίσχυση με PCR και ανίχνευση με ELISA (Robinson R.K. et al. 1999).

1.3.4 Άλλες μέθοδοι ενίσχυσης και ανοσοενζυμικές τεχνικές για την ανίχνευση των παθογόνων βακτηρίων στα τρόφιμα

Σημαντική εξέλιξη στην PCR αποτελεί σήμερα η χρήση ποσοτικοποιητικών μεθόδων PCR πραγματικού χρόνου (real time PCR) που επιτρέπουν τη μέτρηση της ποσότητας των προϊόντων και κατ' επέκταση την παρακολούθηση του ρυθμού πολλαπλασιασμού ενός μορίου-στόχου σε όλη τη διάρκεια της PCR. Υπάρχουν 2 διαφορετικές προσεγγίσεις για τον προσδιορισμό της ποσότητας του προϊόντος της PCR: α) αυτές που είναι ανεξάρτητες από την αλληλουχία-στόχο και περιλαμβάνουν χρωστικές φθορισμού (πχ SYBR Green I), οι οποίες εισχωρούν στις αύλακες του dsDNA και β) αυτές που κάνουν χρήση ολιγονουκλεοτιδικών ιχνηθετών, οι οποίοι υβριδοποιούνται με μία εσωτερική αλληλουχία του μορίου-στόχου.

Στην τελευταία κατηγορία ανήκει ένα ειδικό ολιγονουκλεοτίδιο-ιχνηθέτης που σημαίνεται στο 5' άκρο του με ένα φθορίζον μόριο αναφοράς (reporter dye) και στο 3' άκρο του με ένα μόριο-αποσβέστη (quencher dye). Κατά την PCR οι εκκινητές συνδέονται με την αλληλουχία-στόχο και ο ιχνηθέτης καταστρέφεται από την Taq DNA πολυμεράση, η οποία έχει δράση 5' εξωνουκλεάσης με αποτέλεσμα την απομάκρυνση του φθορίζοντος μορίου από το μόριο αποσβέστη και την επακόλουθη παραγωγή σήματος φθορισμού (TaqMan assay). Οι Chen et al. εφάρμοσαν το TaqMan assay για την ανίχνευση της *Salmonella* σε φυσικά μολυσμένα τρόφιμα, στοχεύοντας στο γονίδιο *invA*. Η συσχέτιση που πέτυχαν με τις μικροβιολογικές μεθόδους ήταν 98%, ενώ στα ίδια αποτελέσματα κατέληξαν και οι Kimura et al. (Mozola M.A 2006).

Πρόσφατα, στην τελευταία κατηγορία ανήκει και ένα ολιγονουκλεοτίδιο-ιχνηθέτης, γνωστός και ως μοριακός φάρος (molecular beacon), ο οποίος συνίσταται από μία δομή στελέχους-βρόγχου που φέρει στο ένα άκρο του τη φθορίζουσα ομάδα και στο άλλο άκρο του το μόριο-αποσβέστη. Όταν, ο ιχνηθέτης θερμανθεί και υβριδοποιηθεί με την αλληλουχία-στόχο, η διαμόρφωσή του αλλάζει και η φθορίζουσα ομάδα απομακρύνεται από το μόριο αποσβέστη με αποτέλεσμα την εκπομπή φωτός. Πρόσφατα, έχει κυκλοφορήσει στο εμπόριο 1 kit το iQ-check (BioRad) το οποίο βασίζεται στο μοριακό φάρο και βρέθηκε ότι η ευαισθησία του είναι ~87%. Οι Liming and Bragwat εφάρμοσαν το iQ-check για την ανίχνευση της *Salmonella* σε φρούτα και λαχανικά και βρέθηκε απόλυτη συσχέτιση με τις μικροβιολογικές μεθόδους. Άλλο εμπορικά διαθέσιμο kit για το οποίο δεν υπάρχουν ακόμα δημοσιεύσεις είναι το Genevision (Warnex) (Mozola M.A 2006, Watson J.D. et al. 2007).

Μία μέθοδος ενίσχυσης που δεν βασίζεται στην PCR είναι η NASBA (nucleic acid sequence-based amplification), η οποία χρησιμοποιείται για την ανίχνευση του RNA και περιλαμβάνει 3 ένζυμα: την T7-RNA-πολυμεράση, την RNase H και την αντίστροφη μεταγραφάση. Στη συγκεκριμένη μέθοδο η αντίστροφη μεταγραφάση και η RNase H παράγουν ένα δίκλωνο μόριο cDNA από μία RNA-αλληλουχία στόχο, το οποίο στη συνέχεια μεταγράφεται από την T7-RNA-πολυμεράση για την παραγωγή πολλαπλών μεταγράφων RNA. Η αντίδραση πραγματοποιείται στους 41°C για 1-2 h και το τελικό προϊόν ανιχνεύεται συνήθως με υβριδισμό με ιχνηθέτες. Ο Cook χρησιμοποίησε τη συγκεκριμένη τεχνική για την ανίχνευση παθογόνων στα τρόφιμα. Τα όρια ανίχνευσης και τα μέσα εμπλουτισμού που εφαρμόστηκαν για τη *Salmonella* ήταν παρόμοια με

εκείνα που χρησιμοποιήθηκαν για την PCR ανίχνευσή της (Mozola M.A. 2006, Rodriguez L.D. and Hernandez M. 2006).

Από την άλλη οι ανοσοενζυμικές μέθοδοι συνεχίζουν και σήμερα να αποτελούν τη μεγαλύτερη ομάδα μεθόδων που εφαρμόζονται για την ανίχνευση των παθογόνων στα τρόφιμα και περιλαμβάνουν δοκιμασίες συγκόλλησης, ανοσοδιάχυση και ανοσοπροσροφητικές ενζυμικές δοκιμασίες (ELISA) (Doyle M.P. and Beuchat L.R. 2007). Συγκεκριμένα, στις δοκιμασίες συγκόλλησης, χρησιμοποιούνται έγχρωμα σφαιρίδια latex επικαλυμμένα με αντισώματα, τα οποία καθιζάνουν παρουσία του βακτηριακού αντιγόνου. Αρκετά kit κυκλοφορούν στο εμπόριο και επιτρέπουν την ανίχνευση της *Salmonella*, του *S. aureus*, του *Campylobacter* και άλλων παθογόνων βακτηρίων. Το *Salmonella* 1-2 τεστ είναι δοκιμασία ανοσοδιάχυσης, η οποία εφαρμόζεται κυρίως για την ανίχνευση της *Salmonella*. Περιλαμβάνει μία πλαστική συσκευή, η οποία αποτελείται από ένα κάθετο τμήμα που περιέχει ένα ημιστερεό άγαρ στο οποίο τοποθετείται αντίσωμα ειδικό για το βλεφαριδικό αντιγόνο της *Salmonella* και από ένα οριζόντιο τμήμα που περιέχει ένα εκλεκτικό μέσο στο οποίο εφαρμόζεται μικρή ποσότητα προεμπλουτισμένου δείγματος τροφίμων. Σε περίπτωση μόλυνσης του τροφίμου από το παθογόνο, το βακτήριο αναπτύσσεται στο εκλεκτικό μέσο και το αντιγόνο του διαχέεται μέχρι να συναντήσει το αντίστοιχο αντίσωμα, σχηματίζοντας μία γραμμή ανοσοκαθίζησης. Τέλος, η ELISA αποτελεί την πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδο ανίχνευσης παθογόνων στα τρόφιμα. Υπάρχουν αρκετές παραλλαγές της ELISA, αλλά η sandwich είναι αυτή που εφαρμόζεται πιο συχνά. Σε αυτή την περίπτωση ένα αντίσωμα προσροφάται στη μικροπλάκα, ακολουθεί επώαση με το εμπλουτισμένο δείγμα τροφίμων, εφαρμογή ενός δεύτερου αντισώματος το οποίο είναι συνδεδεμένο με ένα ειδικό ένζυμο (ALP ή HRP) και τέλος προσθήκη του υποστρώματος για την παραγωγή έγχρωμου προϊόντος (Doyle M.P. and Beuchat L.R. 2007).

1.4 Σκοπός

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η ανίχνευση των εντεροπαθογόνων βακτηρίων *Salmonella* και *Staphylococcus aureus* σε επεξεργασμένα τρόφιμα φυτικής προέλευσης με εφαρμογή της μοριακής μεθόδου PCR. Αναλυτικά οι επιμέρους στόχοι είναι οι εξής:

- Η προτύπωση των συνθηκών της αντίδρασης PCR
- Ο έλεγχος της αξιοπιστίας της μεθόδου
- Η σύγκριση των αποτελεσμάτων της PCR με εκείνα από τον μακροσκοπικό έλεγχο των καλλιεργητικών θρεπτικών υλικών
- Η εκτίμηση των επιπέδων ευαισθησίας της PCR, ακολουθώντας τη μέθοδο της τεχνητής επιμόλυνσης.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Δείγματα

2.1.1 Δείγματα επεξεργασμένων τροφίμων φυτικής προέλευσης

Η συλλογή των δειγμάτων έγινε τους μήνες Σεπτέμβριο και Δεκέμβριο του 2009 από την περιοχή της Λάρισας σε αποστειρωμένα πλαστικά δοχεία. Συνολικά, συλλέχτηκαν 12 είδη τροφίμων, εκ των οποίων τα 4 προέρχονταν από την ετήσια τοπική εμπορική πανήγυρη, 2 ήταν προϊόντα που κυκλοφορούσαν στα supermarkets, 4 ήταν από ζαχαροπλαστεία και 2 προέρχονταν από fastfood (Πίνακας 11).

Πίνακας 11: Δείγματα επεξεργασμένων τροφίμων φυτικής προέλευσης.

Δείγματα τροφίμων ^a	Προέλευση
1. Χαλβάς φαρσάλων με άμυλο αραβοσίτου [XI]	ζαχαροπλαστείο
2. Χαλβάς φαρσάλων με άμυλο ρυζιού [XII]	ζαχαροπλαστείο
3. Χαλβάς φαρσάλων με άμυλο πατάτας [XIII]	ζαχαροπλαστείο
4. Κάστανο (γλυκό του κουταλιού) [Κσ]	ζαχαροπλαστείο
5. Ρύζι [Ρ]	fastfood
6. Φασόλια [Φα]	fastfood
7. Καρύδια [Κρ]	εμπορική πανήγυρη
8. Cashews [C]	εμπορική πανήγυρη
9. Φουντούκια [Φο]	εμπορική πανήγυρη
10. Ινδική καρύδα [Ι]	εμπορική πανήγυρη
11. Τοματοπολτός [Τ]	supermarket
12. Ελιές [Ε]	supermarket

^aΤα γράμματα μέσα σε κάθε αγκύλη συμβολίζουν τα αντίστοιχα είδη τροφίμων.

2.1.2 Στελέχη βακτηρίων

Τα βακτηριακά στελέχη *Salmonella* Enteritidis και *Staphylococcus aureus* που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη ως θετικοί μάρτυρες απομονώθηκαν από κλινικά δείγματα σε θρεπτικά υποστρώματα αιματούχου άγαρ (Biomérieux, France) και SS άγαρ (Biomérieux, France) αντίστοιχα και ταυτοποιήθηκαν από το Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας-Μικροβιολογικό Εργαστήριο (κ. Ε.Πετεινάκη).

2.2 Μέθοδοι

2.2.1 Προετοιμασία των δειγμάτων τροφίμων

- Τα δείγματα τροφίμων κόβονται ασηπτικά σε μικρά κομμάτια και 1gr τοποθετείται σε 3 ml εμπλουτιστικού θρεπτικού ζωμού TSB (Tryptic Soya Broth, Biomérieux, Γαλλία).
- Ακολουθεί επώαση των δειγμάτων για 5 h στους 37° C.
- Μετά την διέλευση των 5 h τα δείγματα φυγοκεντρούνται στις 3500 rpm για 1 min για καθίζηση των υπολειμμάτων τροφής.
- Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο falcon και προστίθενται 2,5 ml θρεπτικού ζωμού TSB.
- Ακολουθεί επώαση των δειγμάτων για 24h στους 37 ° C.

2.2.2 Καλλιέργεια σε στερεά θρεπτικά υλικά

Μετά τον εμπλουτισμό στο θρεπτικό μέσο TSB στους 37°C για 24 h, για κάθε ένα από τα υπό εξέταση δείγματα τροφίμων, πραγματοποιείται επίστρωση 10 μl στα καλλιεργητικά θρεπτικά υλικά (Biomérieux, France) που παρουσιάζονται στον **πίνακα 12**. Ακολουθεί επώαση των τριβλίων στους 37° C για 24 h. Όσον αφορά το *Staphylococcus aureus*, οι ύποπτες αποικίες ελέγχονται για την παραγωγή καταλάσης και κογκουλάσης με την εφαρμογή δοκιμασίας καταλάσης και κογκουλάσης (Slidex Staph, Biomérieux, France) .

Πίνακας 12: Καλλιεργητικά θρεπτικά υλικά

Καλλιεργητικά Θρεπτικά Υλικά ^a
[1] SS άγαρ
[2] Mac Conkey
[3] Σοκολατόχρωμο άγαρ
[4] Αιματούχο άγαρ

^a Ο αριθμός της κάθε αγκύλης συμβολίζει τα αντίστοιχα καλλιεργητικά θρεπτικά υλικά.

2.2.2.1 Στερεά θρεπτικά υλικά ανάπτυξης των μικροοργανισμών

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, τα στερεά θρεπτικά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη ήταν: το αιματούχο άγαρ, το σοκολατόχρωμο άγαρ, το Mac Conkey και το SS άγαρ.

Το **αιματούχο άγαρ** είναι ένα εμπλουτισμένο θρεπτικό υλικό που παρασκευάζεται με προσθήκη (σε υγροποιημένο θρεπτικό άγαρ που έχει ψυχθεί στους 45 ° C) αίματος (συνήθως αίμα ίππου ή προβάτου) σε συγκέντρωση 5-10%. Χρησιμοποιείται για την απομόνωση απαιτητικών μικροοργανισμών (Gram⁺ και Gram⁻ βακτήρια) και για τον έλεγχο της αιμολυτικής ικανότητας των βακτηρίων (α-αιμόλυση, β-αιμόλυση). Συγκεκριμένα, στο αιματούχο άγαρ τα στελέχη *S. aureus* σχηματίζουν αποικίες κίτρινου χρώματος οι οποίες περιβάλλονται από διαυγή ζώνη (β-αιμόλυση), η οποία οφείλεται στην πλήρη αιμόλυση των ερυθρών αιμοσφαιρίων, λόγω παραγωγής αιμολυσίνης. Στο αιματούχο άγαρ τα στελέχη *Salmonella* σχηματίζουν αντίστοιχα υγρές αποικίες διαμέτρου 2-3 mm.

Το **σοκολατόχρωμο άγαρ** είναι ένα θρεπτικό υλικό που παρασκευάζεται με την προσθήκη αίματος στους 70 ° C, με αποτέλεσμα την αυτόματη λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Χρησιμοποιείται κυρίως για την απομόνωση απαιτητικών μικροοργανισμών που ανήκουν στα γένη *Neisseria*, *Haemophilus* και *Streptococcus pneumoniae*, αλλά γενικά είναι ένα υλικό που επιτρέπει την ανάπτυξη όλων των Gram⁺ και Gram⁻ βακτηρίων.

Το **Mac Conkey άγαρ** (χωρίς crystal violet) είναι ένα διαχωριστικό και εκλεκτικό υλικό κατάλληλο για την απομόνωση των εντεροβακτηριακών. Αναστέλλει την ανάπτυξη των Gram⁺ βακτηρίων, λόγω της περιεκτικότητάς του σε κρυσταλλικό ιώδες (crystal violet). Επιπλέον επιτρέπει τον διαχωρισμό των εντεροβακτηριακών σε εκείνα που ζυμώνουν τη λακτόζη και σε εκείνα που δεν την ζυμώνουν, βάσει της λακτόζης την οποία περιέχει. Οι οργανισμοί που ζυμώνουν τη λακτόζη παράγουν οξύ, το οποίο παρουσία του ουδέτερου ερυθρού δείκτη (neutral red), οδηγεί στο σχηματισμό ερυθρών/ροζ αποικιών, ενώ οι οργανισμοί που δεν ζυμώνουν τη λακτόζη (όπως η *Salmonella*) χρησιμοποιούν την πεπτόνη, προκαλώντας αλκαλοποίηση του υλικού, οδηγώντας έτσι στο σχηματισμό άχρωμων αποικιών.

Το **SS άγαρ** είναι ένα εκλεκτικό και διαφορικό μέσο για την απομόνωση παθογόνων εντερικών βακίλων, ιδιαίτερα αυτών που ανήκουν στο γένος *Salmonella*. Αναστέλλει την ανάπτυξη των Gram⁺ και των άλλων εντεροβακτηριδίων, λόγω της περιεκτικότητάς του σε χολικά άλατα, Brilliant green και κιτρικά. Η διαφοροποίηση των εντερικών οργανισμών επιτυγχάνεται με την ενσωμάτωση της λακτόζης στο μέσο. Οι οργανισμοί που ζυμώνουν τη λακτόζη παράγουν οξύ, το οποίο παρουσία του ουδέτερου ερυθρού δείκτη (neutral red), οδηγεί στο σχηματισμό ερυθρών αποικιών. Αντίθετα, οι οργανισμοί που δεν ζυμώνουν τη λακτόζη, όπως είναι τα *Salmonella* και *Shigella* σχηματίζουν άχρωμες αποικίες. Ωστόσο, ορισμένα στελέχη *Salmonella* σχηματίζουν άχρωμες αποικίες με μαύρα κέντρα. Το θειοθειικό νάτριο και το κιτρικό σίδηρο επιτρέπουν την ανίχνευση παραγωγής υδροθείου, που αποδεικνύεται από αποικίες με μαύρα κέντρα.

2.2.3 Απομόνωση βακτηριακού DNA

Η απομόνωση του βακτηριακού DNA πραγματοποιήθηκε με μέθοδο απομόνωσης DNA μικρής κλίμακας (μέθοδος miniprep), η οποία βασίζεται στη γρήγορη αλκαλική αποδιάταξη του πλασμιδιακού και του χρωμοσωμικού DNA ακολουθούμενη από επιλεκτική επαναδιάταξη του πλασμιδιακού DNA και επαναρύθμιση του pH του διαλύματος σε τιμή ουδέτερη παρουσία υψηλής συγκέντρωσης άλατος.

Για την απομόνωση του βακτηριακού DNA χρησιμοποιήθηκαν τα διαλύματα P1, P2 και P3, τα οποία παρασκευάστηκαν όπως φαίνεται παρακάτω.

Διάλυμα P1 (miniprep lysis buffer)

- 50mM glucose
- 25mM Tris-HCl (pH 8.0)
- 10mM EDTA
- Αποστείρωση και αποθήκευση στους 4 °C.

Διάλυμα P2

- 0.2N NaOH
- 1% SDS

Διάλυμα P3 (οξικό άλας του καλίου pH 4.8)

- 60mL οξικό άλας του καλίου 5M (Τελική συγκέντρωση 3M)
- 11.5mL οξικό οξύ (Τελική συγκέντρωση 5M)
- 28.5mL dH₂O
- Αποθήκευση στους 4 °C.

Αναλυτικά, τα στάδια της συγκεκριμένης μεθόδου είναι τα εξής:

- Επιλέγεται μία βακτηριακή αποικία και εμβολιάζεται αντίστοιχα σε 10ml Tryptic Soy broth.
- Τα κύτταρα αναπτύσσονται για 24 h στους 37°C.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση της υγρής βακτηριακής καλλιέργειας στις 10000 x g για 1 min για καθίζηση των βακτηριακών κυττάρων.
- Στα erppendorfs που περιέχουν τα ιζήματα των κυττάρων προστίθενται 100 μl παγωμένου διαλύματος miniprep lysis buffer P1. Το EDTA που περιέχεται στο συγκεκριμένο διάλυμα αποσταθεροποιεί τις κυτταρικές μεμβράνες και δεσμεύει τα κατιόντα Mg⁺² και Ca⁺², αναστέλλοντας τη δράση των DNAσών, ενώ η γλυκόζη συμβάλλει στη διατήρηση της οσμωτικής ισορροπίας.
- Ακολουθεί ανάδευση και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min.
- Κατόπιν, προστίθενται 200 μl φρέσκου διαλύματος P2 (NaOH/SDS) και πραγματοποιείται ήπια ανακίνηση και επώαση για 5 min στον πάγο. Το SDS προκαλεί διαλυτοποίηση των συστατικών της κυτταρικής μεμβράνης, οδηγώντας σε κυτταρική λύση, ενώ η εφαρμογή των αλκαλικών συνθηκών προκαλεί την

αποδιάταξη του πλασμιδιακού και χρωμοσωμικού DNA καθώς και των πρωτεϊνών.

- Στη συνέχεια, προστίθενται 150 μ l παγωμένου ρυθμιστικού διαλύματος P3. Σε αυτό το στάδιο, πραγματοποιείται επαναρύθμιση του pH του διαλύματος σε τιμή ουδέτερη και καθίζηση των αποδιατεταγμένων πρωτεϊνών, του χρωμοσωμικού DNA, του RNA, των κυτταρικών συστατικών και του SDS παρουσία υψηλής συγκέντρωσης άλατος, ενώ το μικρότερου μεγέθους πλασμιδιακό DNA επαναδιατάσσεται και παραμένει στο υπερκείμενο.
- Ακολουθεί ήπια ανακίνηση για 10 sec, επώαση στον πάγο για 5 min και φυγοκέντρηση στις 12000 \times g για 5 min.
- Κατόπιν, το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο eppendorf και προστίθεται 1:1 όγκος ισοπροπανόλης 100% για καθίζηση των νουκλεϊκών οξέων.
- Πραγματοποιείται ανάδευση και φυγοκέντρηση στις 12000 \times g για 5 min.
- Το υπερκείμενο απομακρύνεται και ακολουθεί έκπλυση του ίζηματος με 1 ml 70% αιθανόλης για την απομάκρυνση των υπολειμμάτων ισοπροπανόλης.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 12000 \times g για 5 min και απομάκρυνση του υπερκείμενου.
- Τέλος, το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει για ~1h σε θερμοκρασία δωματίου και ακολουθεί η επαναδιάλυσή του σε 30 μ l ddH₂O.

2.2.4 Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός απομονωμένου DNA

Για την εκτίμηση της ποσότητας και της καθαρότητας του απομονωμένου DNA μετρήθηκαν οι απορροφήσεις στα 260nm και στα 280nm σε φασματοφωτόμετρο UV-Vis (Perkin Elmer, UV-Vis Lambda 20 spectrometer). Η ποσότητα του DNA υπολογίζεται βάσει της τιμής της οπτικής πυκνότητας στα 260nm, ενώ ο λόγος της τιμής της οπτικής πυκνότητας στα 260nm προς την τιμή της οπτικής πυκνότητας στα 280nm αποτελεί δείκτη καθαρότητάς του, που αναμένεται να έχει τιμές μεταξύ 1.80-2.00.

2.2.5 Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR)

Η αντίδραση της PCR χρησιμοποιείται για την ενίσχυση μίας συγκεκριμένης περιοχής του γενόματος με τη χρήση ειδικών εκκινητικών μορίων. Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη για την ανίχνευση των βακτηρίων *Salmonella* και *Staphylococcus aureus*, τα γονίδια που στοχεύουν και τα αναμενόμενα προϊόντα που παράγονται, παρουσιάζονται στον **πίνακα 13**.

Πίνακας 13: Αλληλουχίες εκκινητών και γονίδια-στόχοι για την ανίχνευση των βακτηρίων *Salmonella* και *Staphylococcus aureus*.

Βακτήρια	Γονίδια στόχοι-Μέγεθος των PCR προϊόντων	Αλληλουχίες εκκινητών (5'-3')	Αναφορές
<i>Salmonella</i>	<i>Its</i> (312 bp)	F-TATAGCCCCATCGTGTAGTCAGAAC R-TGCGGCTGGATCACCTCCTT	<i>Chiu et al. 2005, Yeon Sun Park et al. 2006</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>nuc</i> (270 bp)	1-GCGATTGATGGTGATACGGTT 2-AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC	<i>Alarcon B. et al. 2006, Brakstad et al. 1992</i>

Η αντίδραση της PCR για την ανίχνευση της *Salmonella* και του *Staphylococcus aureus* αντίστοιχα πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 30 µl. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν, οι ποσότητές τους και οι συγκεντρώσεις τους παρουσιάζονται στον **πίνακα 15** (σελ. 65). Σε κάθε αντίδραση PCR περιλαμβανόταν ένας αρνητικός μάρτυρας, ο οποίος περιείχε 2 µl H₂O στη θέση του DNA για έλεγχο πιθανής επιμόλυνσης της αντίδρασης κατά την προετοιμασία και ένας θετικός μάρτυρας, ο οποίος αποτελούνταν από DNA απομονωμένο από τους αντίστοιχους θετικούς μάρτυρες *Salmonella* και *Staphylococcus aureus*. Τα μικροσωληνάρια τοποθετήθηκαν στον θερμικό κυκλοποιητή (BioRad DNA engine Peltier Thermal cycler, USA) και οι συνθήκες που εφαρμόστηκαν για την ανίχνευση των παθογόνων βακτηρίων *Salmonella* και *Staphylococcus aureus* παρουσιάζονται στους **πίνακες 16** και **17** αντίστοιχα (σελ.66).

2.2.6 Δοκιμασία για τον προσδιορισμό της ευαισθησίας της μεθόδου PCR για την ανίχνευση του βακτηριακού DNA των παθογόνων βακτηρίων *Salmonella* και *Staphylococcus aureus*

Για τον προσδιορισμό της ευαισθησίας ανίχνευσης του βακτηριακού DNA των παθογόνων *Salmonella* και *Staphylococcus aureus* με τη μέθοδο της PCR, χρησιμοποιήθηκε DNA απομονωμένο από τους αντίστοιχους θετικούς μάρτυρες. Η απομόνωση του βακτηριακού DNA πραγματοποιήθηκε με την miniprep μέθοδο και ακολούθησε εκτέλεση διαδοχικών αραίωσεων με ddH₂O σε συγκεντρώσεις αρχικού DNA μεταξύ 400ng έως 50 pg. Μετά από κάθε αραίωση εξετάστηκαν τα επίπεδα ανίχνευσης με το πρωτόκολλο της PCR που περιγράφηκε στην ενότητα 2.2.5.

2.2.7 Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR

Η επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων της PCR έγινε με ηλεκτροφόρηση των προϊόντων σε πήκτωμα αγαρόζης (Invitrogen, UK) συγκέντρωσης 2% σε ρυθμιστικό διάλυμα TBE 1× (Tris, Boric Acid, EDTA, Invitrogen, UK) που περιέχει βρωμιούχο αιθίδιο (Applichem, Γερμανία) σε τελική συγκέντρωση 1%. Στα προϊόντα της PCR προστίθεται loading buffer (30% γλυκερόλη, 0.025% μπλε της βρωμοφαινόλης, 0.025% κυανού της ξυλόζης) και σε κάθε ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιούνται 12μl από το κάθε προϊόν, εφαρμόζοντας τάση 90V. Για τον προσδιορισμό του μεγέθους των PCR προϊόντων χρησιμοποιήθηκε μάρτυρας μοριακού βάρους 100bp (100bp DNA ladder, Invitrogen, UK). Η φωτογράφιση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε σε συσκευή εκπομπής υπεριώδους ακτινοβολίας (Bioimaging Systems, MiniBIS Pro).

2.2.8 Τεχνητή επιμόλυνση χαλβά Φαρσάλων με τα παθογόνα βακτήρια a) *Salmonella* και b) *Staphylococcus aureus*

2.2.8.1 Πρότυπο θολερότητας McFarland

Η οπτική σύγκριση των εναιωρημάτων των μικροοργανισμών με πρότυπα θολερότητας είναι μία αποδεκτή μέθοδος εκτίμησης των πυκνοτήτων των μικροοργανισμών. Το πλέον ευρέως αποδεκτό πρότυπο είναι το πρότυπο McFarland, σύμφωνα με το οποίο η μικροβιακή ανάπτυξη μπορεί να εκτιμηθεί συγκρίνοντας τη θολερότητα του υγρού καλλιέργειας με τα πρότυπα McFarland που αντιστοιχούν σε γνωστές συγκεντρώσεις βακτηρίων. Η κλίμακα McFarland λαμβάνει τιμές από 0.5-10 και έχει σχεδιαστεί για την εκτίμηση των συγκεντρώσεων CFU/ml (Colony Forming Units/ml) βακτηρίων, όπως είναι η *E. coli*. Ωστόσο, απαιτείται μία αξιόπιστη μέθοδος βαθμονόμησης για τη λήψη μίας ορθής μέτρησης πυκνότητας μικροοργανισμών, όπως είναι οι μύκητες και οι ζύμες, που διαφέρουν σε μέγεθος και μάζα από τα βακτήρια. Συγκεκριμένα, τα πρότυπα McFarland λαμβάνουν τιμές θολερότητας από 0.5-10 και παρασκευάζονται με την προσθήκη χλωριούχου βαρίου 1% σε υδατικό θειϊκό οξύ 1%. Η πυκνότητα του ιζήματος θειϊκού βαρίου που προκύπτει είναι δυνατό να χρησιμοποιηθεί για την προσέγγιση του αριθμού των αποικιών ενός παρασκευασμένου εναιωρήματος (Πίνακας 14). Το πιο γνωστό πρότυπο είναι το πρότυπο McFarland 0.5, το οποίο παρασκευάζεται με την προσθήκη 0.05 ml χλωριούχου βαρίου 1% σε 9.95 ml υδατικού θειϊκού οξέος 1% και είναι το ισοδύναμο περίπου 1.5×10^8 μονάδων σχηματισμού αποικιών (CFU/ml) του παθογόνου *E. coli*. Για τις μετρήσεις πυκνότητας έχουν χρησιμοποιηθεί και άλλα πρότυπα, όπως το διοξείδιο του τιτανίου και τα εναιωρήματα σωματιδίων latex.

Η μέτρηση της θολερότητας, εκτός από την οπτική σύγκριση με τα πρότυπα McFarland μπορεί να πραγματοποιηθεί και μέσω ειδικών οργάνων, των θολωσίμετρων, των οποίων η λειτουργία βασίζεται στην ικανότητα των σωματιδίων να σκεδάζουν το φως, ενώ βρίσκονται σε εναιώρημα. Η μέτρηση αυτού του σκεδαζόμενου φωτός αναφέρεται ως νεφελομετρία. Συγκεκριμένα, το θολωσίμετρο της Biomerieux

(Densimat, Biomerieux) είναι ένα ηλεκτρικό όργανο που χρησιμοποιεί μία δίοδο φωτός ως φωτεινή πηγή και μία φωτοδίοδο ανίχνευσης φωτός και έχει σχεδιαστεί για τη μέτρηση της θολερότητας μικροβιακών εναιωρημάτων που είναι ισοδύναμη με πρότυπα McFarland από 0.5-1. Για τον προσδιορισμό του ισοδύναμου ενός μικροβιακού εναιωρήματος κατά McFarland, τοποθετείται ένα σωληνάριο στο θάλαμο ανάγνωσης και τα αποτελέσματα κατόπιν εμφανίζονται στην οθόνη σε μονάδες McFarland (McFarland J. 1907, Goldman E. and Green L.H. 2009).

Πίνακας 14: Συγκεντρώσεις CFU/ml του *E. coli* στην κλίμακα McFarland

McFarland Scale	CFU ($\times 10^6$ /mL)	1% BaCl ₂ / 1% H ₂ SO ₄ (mL)
0.5	<300	0.05/9.95
1	300	0.1/9.9
2	600	0.2/9.8
3	900	0.3/9.7
4	1200	0.4/9.6
5	1500	0.5/9.5
6	1800	0.6/9.4
7	2100	0.7/9.3
8	2400	0.8/9.2
9	2700	0.9/9.1
10	3000	1.0/9.0

2.2.8.2 Τεχνητή επιμόλυνση του χαλβά Φαρσάλων με *Salmonella*

Στην περίπτωση της *Salmonella* ο εμπλουτισμός του χαλβά Φαρσάλων πραγματοποιήθηκε στο κοινό θρεπτικό μέσο Buffered Peptone Water (BPW).

Το Buffered Peptone Water (BPW) είναι ένα γενικό θρεπτικό μέσο εμπλουτισμού που περιέχει πεπτόνη ως πηγή άνθρακα, αζώτου, βιταμινών και ιχνοστοιχείων, NaCl για τη διατήρηση της οσμωτικής ισορροπίας και φωσφορικά για τη ρύθμιση του pH του μέσου. Είναι κατάλληλο για την αναβίωση των βακτηριακών κυττάρων που έχουν υποστεί τραυματισμό εξαιτίας των συνθηκών συντήρησης των τροφίμων, όπως είναι η θερμότητα, η αφυδάτωση, η υψηλή οσμωτική πίεση, οι αλλαγές του pH και η παρουσία συντηρητικών. Το BPW προετοιμάστηκε όπως φαίνεται παρακάτω.

Buffered Peptone Water (BPW)

Αντιδραστήρια	Gms/Litre
Peptone	10.0 g
Sodium Chloride	5.0 g
Disodium hydrogen phosphate	3.5 g
Potassium dihydrogen phosphate	1.5 g
ddH ₂ O	1.0 L
Τελικό pH (στους 25 °C)	7.0±0.2

Διάλυση των συστατικών με μαγνητικό αναδευτήρα. Αποστείρωση και αποθήκευση στους 25°C.

2.2.8.2.a Προετοιμασία του βακτηριακού εναιωρήματος

Χρησιμοποιήθηκε για την επιμόλυνση το βακτηριακό στέλεχος *Salmonella* Enteritidis που ταυτοποιήθηκε από το Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας-Μικροβιολογικό Εργαστήριο (κ. Ε.Πετεινάκη). Αρχικά, πραγματοποιείται ανακαλλιέργεια σε τριβλία SS άγαρ και επώαση στους 37°C για 24 h. Κατόπιν, ακολουθεί εμβολιασμός μικρού αριθμού αποικιών σε API suspension medium (Biomérieux, France) μέχρι η θολρότητα του μικροβιακού εναιωρήματος να είναι ισοδύναμη με το πρότυπο McFarland 0.5 (Densimat, Biomérieux) που αντιστοιχεί σε συγκέντρωση $\sim 1.5 \times 10^8$ CFU/ml. Στη συνέχεια, πραγματοποιούνται υποδεκαπλάσιες διαδοχικές αραιώσεις (από 10^{-1} - 10^{-8}) με ddH₂O, ώστε να επιτευχθεί ένα εύρος τιμών από 10^0 - 10^6 CFU/ml.

2.2.8.2.b Μέθοδος επιμόλυνσης του χαλβά

1. 10 gr χαλβά τοποθετούνται σε αποστειρωμένες φλάσκες και επιμολύνονται με 1ml της αντίστοιχης βακτηριακής αραιώσης.
2. Ακολουθεί ανάδευση για 30 sec και επώαση των δειγμάτων στους 37 ° C για 24 h, ώστε να στεγνώσει το περιεχόμενο της κάθε φλάσκας.
3. Κατόπιν, προστίθενται σε κάθε φλάσκα 90ml θρεπτικού μέσου εμπλουτισμού και ακολουθεί ανάδευση για 10 min στις 200 rpm και επώαση στους 37 ° C για 24 h.
4. Τέλος, πραγματοποιείται ξανά ανάδευση των δειγμάτων για 10 min στις 200 rpm και το περιεχόμενο της κάθε φλάσκας (3 ml) φυγοκεντρείται στις 10000 rpm για 1 sec για καθίζηση των βακτηριακών κυττάρων

Ακολουθεί η απομόνωση του βακτηριακού DNA και η εκτέλεση της PCR, όπως περιγράφονται στις ενότητες 2.2.3 και 2.2.5 αντίστοιχα.

2.2.8.3 Τεχνητή επιμόλυνση του χαλβά Φαρσάλων με *Staphylococcus aureus*

Η τεχνητή επιμόλυνση του χαλβά Φαρσάλων με το βακτήριο *Staphylococcus aureus*, πραγματοποιήθηκε σε δύο ξεχωριστά πειράματα, χρησιμοποιώντας αντίστοιχα δύο διαφορετικά θρεπτικά μέσα εμπλουτισμού, το κοινό μέσο Buffered Peptone Water (BPW) και το εκλεκτικό μέσο Giolitti Cantoni (Merck, Germany).

Το Giolitti Cantoni είναι ένα εκλεκτικό μέσο εμπλουτισμού που επιτρέπει την ανάπτυξη των στελεχών του *S. aureus*, ακόμα και όταν απαντούν σε χαμηλούς αριθμούς στα τρόφιμα. Περιέχει τρυπτόνη και εκχυλίσματα κρέατος και ζύμης ως πηγή αζώτου, βιταμινών, αμινοξέων και ιχνοστοιχείων καθώς και D-μανιτόλη ως πηγή άνθρακα. Το πυρουβικό (sodium pyruvate) διευκολύνει την ανάπτυξη των στελεχών του *S. aureus*, ενώ παράλληλα αναστέλλεται η ανάπτυξη των Gram⁻ βακτηρίων, λόγω της περιεκτικότητάς του σε χλωριούχο λίθιο και των Gram⁺, λόγω της περιεκτικότητάς του σε γλυκίνη. Το Giolitti Cantoni προετοιμάστηκε όπως φαίνεται παρακάτω.

Giolitti Cantoni

<u>Αντιδραστήρια</u>	<u>Gms/Litre</u>
Giolitti Cantoni	55 g
ddH ₂ O	1.0L

Διάλυση των συστατικών με μαγνητικό αναδευτήρα. Αποστείρωση και αποθήκευση στους 25°C.

2.2.8.3.a Προετοιμασία του βακτηριακού εναιωρήματος

Χρησιμοποιήθηκε για την επιμόλυνση το βακτηριακό στέλεχος *S. aureus* που ταυτοποιήθηκε από το Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας-Μικροβιολογικό Εργαστήριο (κ. Ε.Πετεινάκη). Αρχικά, πραγματοποιείται ανακαλλιέργεια σε τριβλία αιματούχου άγαρ και επώαση στους 37°C για 24 h. Κατόπιν, ακολουθεί εμβολιασμός μικρού αριθμού αποικιών σε API suspension medium (Biomerieux, France) μέχρι η θολρότητα του μικροβιακού εναιωρήματος να είναι ισοδύναμη με το πρότυπο McFarland 0.5 (Densimat, Biomerieux) που αντιστοιχεί σε συγκέντρωση $\sim 1.5 \times 10^8$ CFU/ml και ακολούθως πραγματοποιούνται υποδεκαπλάσιες διαδοχικές αραιώσεις (από 10^{-1} - 10^{-8}) με water for injection (dH₂O), ώστε να επιτευχθεί ένα εύρος τιμών από 10^0 - 10^8 CFU/ml.

2.2.8.3.b Μέθοδος επιμόλυνσης του χαλβά

10 gr χαλβά τοποθετούνται σε αποστειρωμένες φλάσκες και επιμολύνονται με 1ml της αντίστοιχης βακτηριακής αραιώσης.

Κατόπιν, η διαδικασία που ακολουθείται είναι η ίδια με αυτή που περιγράφεται στην ενότητα 2

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

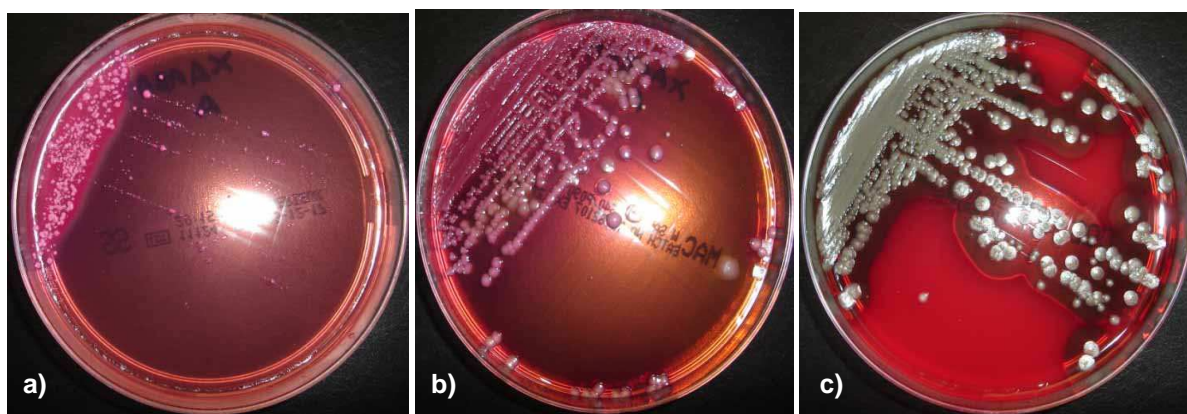
3.1 Ανίχνευση των παθογόνων βακτηρίων *Salmonella* και *Staphylococcus aureus* σε δείγματα επεξεργασμένων τροφίμων φυτικής προέλευσης με μακροσκοπικό έλεγχο των καλλιεργητικών θρεπτικών υλικών

Για κάθε ένα από τα 12 δείγματα επεξεργασμένων τροφίμων μετά το στάδιο εμπλουτισμού στο θρεπτικό μέσο TSB για 24h , όπως περιγράφεται στην ενότητα 2.2.1, πραγματοποιείται επίστρωση σε 4 καλλιεργητικά θρεπτικά υλικά (SS, Mac Conkey, αιματούχο, σοκολατόχρωμο). Ο έλεγχος πιθανής μόλυνσης των δειγμάτων από τα παθογόνα βακτήρια *Salmonella* και *Staphylococcus aureus* πραγματοποιείται με μακροσκοπική εξέταση των αντίστοιχων στερεών θρεπτικών μέσων. Στα αποτελέσματά μας δεν παρατηρήθηκε καμία αποικία που να παρουσιάζει τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά των συγκεκριμένων βακτηρίων. Ενδεικτικά, παρατίθεται η εικόνα 5 στην οποία παρουσιάζονται τα καλλιεργητικά θρεπτικά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για τα δείγματα χαλβά Φαρσάλων με άμυλο αραβοσίτου, άμυλο ρυζιού και άμυλο πατάτας αντίστοιχα και στην οποία επιβεβαιώνεται η παραπάνω παρατηρήσή μας.

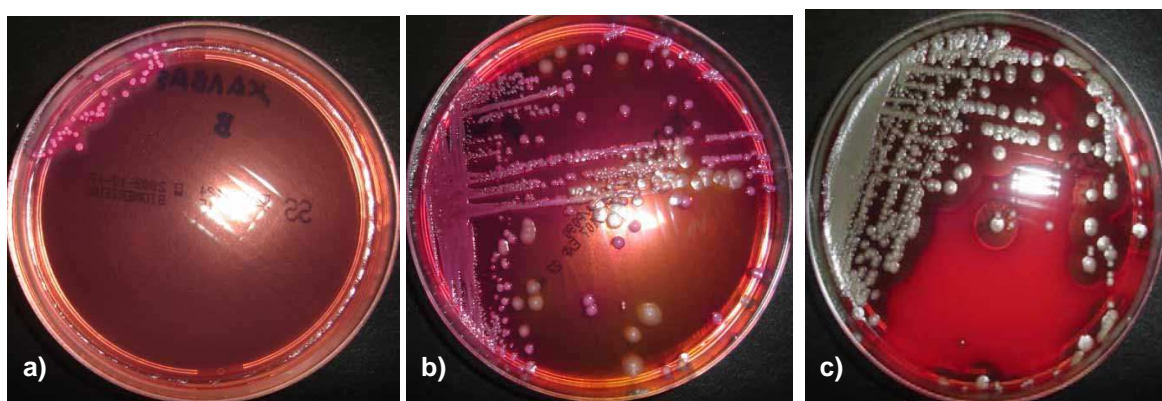
Επιπλέον, οι ύποπτες αποικίες για *Staphylococcus aureus* εκτός από τον μακροσκοπικό έλεγχο, ελέγχθηκαν και για την παραγωγή καταλάσης και κογκουλάσης με την εφαρμογή κατάλληλης δοκιμασίας (Slidex Staph, Biomerieux, France). Στα αποτελέσματά μας, τα ύποπτα στελέχη που εξετάστηκαν για την παραγωγή καταλάσης και κογκουλάσης βρέθηκαν αρνητικά ως προς *S. aureus*.

Στην εικόνα 6 παρουσιάζονται τα παθογόνα βακτήρια *Salmonella enteritidis* και *S. aureus* που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη ως θετικοί μάρτυρες και τα οποία απομονώθηκαν από κλινικά δείγματα σε θρεπτικά υποστρώματα αιματούχου άγαρ και SS άγαρ αντίστοιχα.

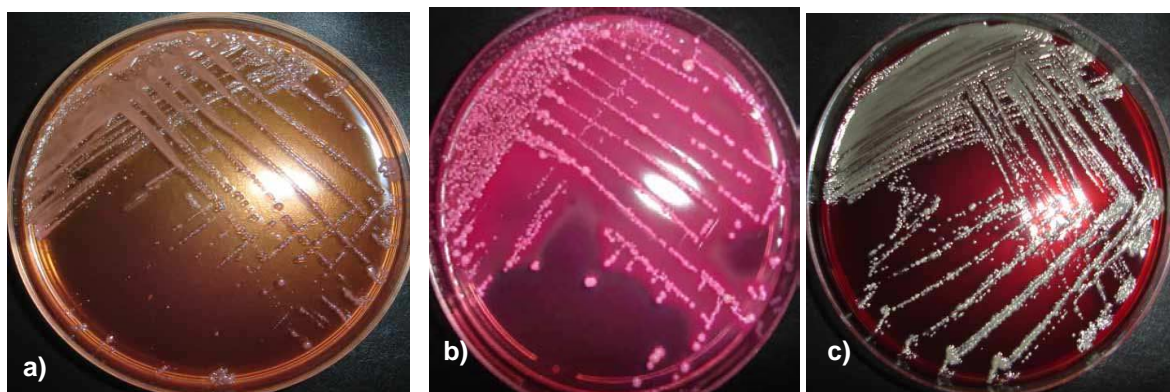
Δείγμα χαλβά Φαρσάλων με άμυλο αραβοσίτου



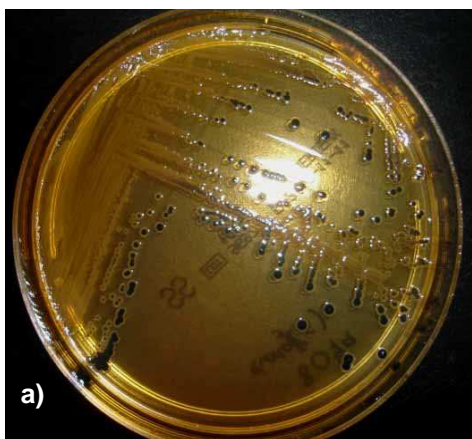
Δείγμα χαλβά Φαρσάλων με άμυλο ρυζιού



Δείγμα χαλβά Φαρσάλων με άμυλο πατάτας



Εικόνα 5: Ανίχνευση των παθογόνων βακτηρίων *Salmonella* και *Staphylococcus aureus* με μακροσκοπικό έλεγχο των τριβλίων σε δείγματα χαλβά Φαρσάλων με άμυλο αραβοσίτου, άμυλο ρυζιού και άμυλο πατάτας αντίστοιχα. a) SS άγαρ, b) Mac Conkey άγαρ, c) αιματούχο άγαρ.



Εικόνα 6: Βακτηριακά στελέχη *Salmonella* και *Staphylococcus aureus* απομονωμένα από κλινικά δείγματα. Τα συγκεκριμένα βακτήρια χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί μάρτυρες. **a)** *Salmonella* σε SS άγαρ, **b)** *Staphylococcus aureus* σε αιματούχο άγαρ.

3.2 Προτύπωση των συνθηκών της PCR

Για τη προτύπωση των συνθηκών της PCR για τα παθογόνα βακτήρια *Salmonella* και *Staphylococcus aureus* αντίστοιχα, χρησιμοποιήθηκε DNA απομονωμένο με την μέθοδο miniprep από τους αντίστοιχους θετικούς μάρτυρες.

Η PCR πραγματοποιήθηκε, επιλέγοντας ζεύγη εκκινητών που στοχεύουν ειδικά στις αλληλουχίες *Its* και *nuc* των βακτηρίων *Salmonella* και *Staphylococcus aureus* αντίστοιχα. Οι αλληλουχίες *Its* (internal transcribed region) είναι ενδιάμεσες περιοχές μεταξύ του 16S και του 23S rDNA, οι οποίες ποικίλλουν ως προς το μέγεθος, την αλληλουχία και τον αριθμό των αντιγράφων τους ανάμεσα στα διαφορετικά είδη βακτηρίων, ενώ το γονίδιο *nuc* κωδικοποιεί για την θερμοσταθερή νουκλεάση (TNase), μία ενδονουκλεάση που αποικοδομεί το DNA και το RNA. Σε προηγούμενες μελέτες, τα συγκεκριμένα ζεύγη εκκινητών βρέθηκε να παρουσιάζουν υψηλή εξειδίκευση, επιτυγχάνοντας την ενίσχυση των αλληλουχιών-στόχων μόνο στα στελέχη που ανήκαν στο γένος *Salmonella* και στα στελέχη που ανήκαν στο είδος του *Staphylococcus aureus* αντίστοιχα (Chiu et al. 2005, Brakstad et al. 1999).

Ακολούθως, πραγματοποιήθηκαν ξεχωριστές αντιδράσεις, δοκιμάζοντας διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασιών υβριδισμού, Mg^{+2} , DNA, εκκινητών και DMSO. Οι τελικές βέλτιστες συνθήκες στις οποίες επιτυγχάνεται ενίσχυση των ανμενόμενων προϊόντων στα 312 bp για τη *Salmonella* και στα 270 bp για τον *S. aureus*, χωρίς την παρουσία παραπροϊόντων, παρουσιάζονται στους πίνακες 15, 16 και 17.

Πίνακας 15: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση της PCR για την ανίχνευση των βακτηρίων *Salmonella* και *Staphylococcus aureus*.

Αντιδραστήρια	Όγκος	Τελική Συγκέντρωση
10x PCR buffer(200mM Tris-HCl pH 8.4, 500mM KCl)	3 μ l	1x
MgCl ₂ (50 mM)	1.5 μ l	2.5 mM
Taq DNA πολυμεράση (5U/ μ l)	0.4 μ l	2U
dNTP's (10 mM)	0.6 μ l	200 μ M
DMSO	2 μ l	
Forward Primer (10 pmol/ μ l)	1.5 μ l	0.5pmol/ μ l
Reverse Primer (10 pmol/ μ l)	1.5 μ l	0.5pmol/ μ l
DNA	2 μ l	400ng
ddH ₂ O	17.5 μ l	
Συνολικός όγκος	30 μ l	

Πίνακας 16: Συνθήκες πραγματοποίησης της PCR για την ανίχνευση του βακτηρίου *Salmonella*.

ΣΤΑΔΙΟ	ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ	ΧΡΟΝΟΣ	ΚΥΚΛΟΙ
Αρχική αποδιάταξη	94°C	3 min	35 κύκλοι
Αποδιάταξη	94°C	1 min	
Υβριδοποίηση	65°C	1 min	
Επιμήκυνση	72°C	1 min	
Τελική επέκταση	72°C	10 min	

Πίνακας 17: Συνθήκες πραγματοποίησης της PCR για την ανίχνευση του βακτηρίου *Staphylococcus aureus*.

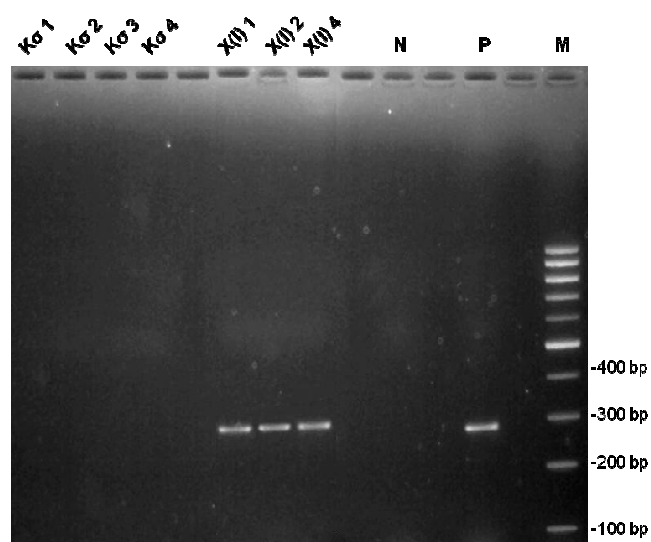
ΣΤΑΔΙΟ	ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ	ΧΡΟΝΟΣ	ΚΥΚΛΟΙ
Αρχική αποδιάταξη	94°C	3 min	30 κύκλοι
Αποδιάταξη	94°C	1 min	
Υβριδοποίηση	60°C	1 min	
Επιμήκυνση	72°C	1 min	
Τελική επέκταση	72°C	10 min	

3.3 Ανίχνευση των παθογόνων βακτηρίων *Salmonella* και *Staphylococcus aureus* σε δείγματα επεξεργασμένων τροφίμων φυτικής προέλευσης με τη μέθοδο της PCR

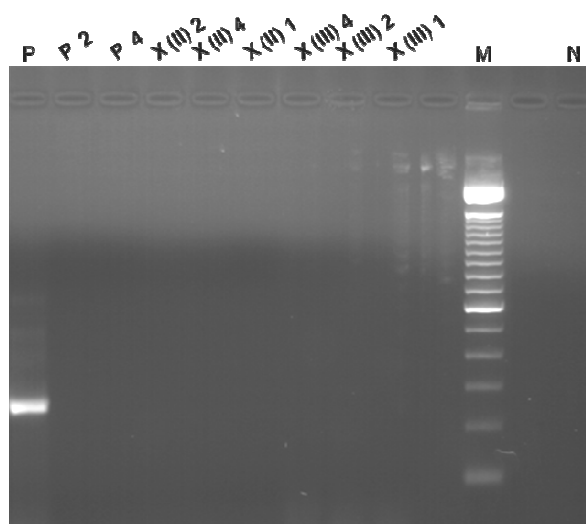
Επιλέχθηκαν να εξεταστούν δείγματα επεξεργασμένων τροφίμων φυτικής προέλευσης από χαλβά Φαρσάλων που ο καθένας περιείχε διαφορετικών ειδών άμυλο (χαλβάς με άμυλο ρυζιού, χαλβάς με άμυλο πατάτας και χαλβάς με άμυλο αραβοσίτου), από ελιές χύμα, από γλυκό του κουταλιού κάστανο, από συμπυκνωμένο χυμό ντομάτας, από ξηρούς καρπούς (cashews, φουντούκια, καρύδια και ινδική καρύδα) και από μαγειρεμένα ρύζι και ξηρά φασόλια. Σε κάθε αντίδραση PCR περιλαμβάνονταν ένας αρνητικός μάρτυρας με σκοπό τον έλεγχο πιθανής επιμόλυνσης της αντίδρασης κατά την προετοιμασία, ο οποίος περιείχε 2μl H₂O στη θέση του DNA και ένας θετικός μάρτυρας, ο οποίος αποτελούνταν από 2 μl DNA απομονωμένο από τους αντίστοιχους θετικούς μάρτυρες.

3.3.1 Ανίχνευση του παθογόνου βακτηρίου *Salmonella*

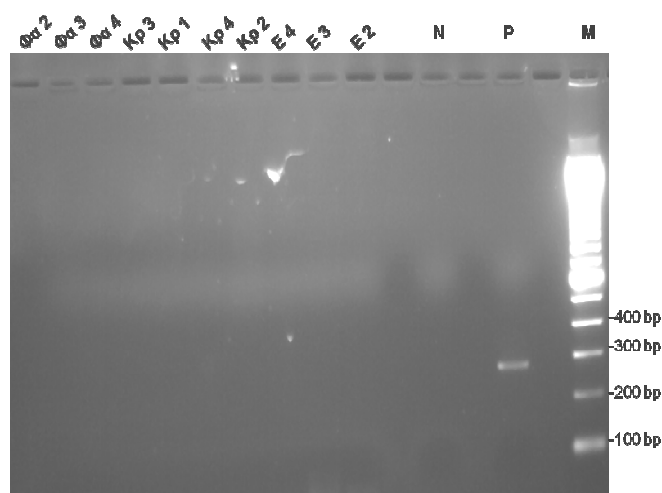
Η ανίχνευση των προϊόντων της PCR πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης συγκέντρωσης 2% και τα αποτελέσματα που λήφθηκαν παρουσιάζονται στις εικόνες 7 & 8. Σε κάθε εικόνα στη στήλη P παρατηρούμε την παρουσία του αναμενόμενου προϊόντος PCR στα 312 bp για τον θετικό μάρτυρα, ενώ στη στήλη N η οποία αντιπροσωπεύει τον αρνητικό μάρτυρα δεν παρατηρούμε κάποιο προϊόν. Συνολικά, από τα δείγματα επεξεργασμένων τροφίμων φυτικής προέλευσης που εξετάστηκαν με τη μέθοδο της PCR για το παθογόνο βακτήριο *Salmonella* παρατηρούμε ότι μόνο ο χαλβάς Φαρσάλων με άμυλο αραβοσίτου έδωσε θετικό αποτέλεσμα (εικόνα 7). Συγκεκριμένα, στις στήλες X(I)1, X(I)2 και X(I)4 της εικόνας 7, στις οποίες παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τις αποικίες που προέρχονται από τα καλλιεργητικά θρεπτικά υλικά SS, Mac Conkey και αιματούχου αντίστοιχα μετά από επίστρωση με δείγμα χαλβά Φαρσάλων με άμυλο αραβοσίτου παρατηρήθηκε η παρουσία του αναμενόμενου προϊόντος PCR στα 312 bp. Σε κανένα από τα υπόλοιπα δείγματα δεν παρατηρήθηκε ανίχνευση του βακτηρίου *Salmonella*, όπως φαίνεται και από τις αντίστοιχες στήλες των εικόνων 7 & 8 που αντιπροσωπεύουν τα αποτελέσματα από τις αποικίες που προέρχονται από τα καλλιεργητικά θρεπτικά υλικά μετά από επίστρωσή τους με τα αντίστοιχα δείγματα τροφίμων και στις οποίες δεν παρατηρείται κάποιο προϊόν στο αναμενόμενο μοριακό βάρος.



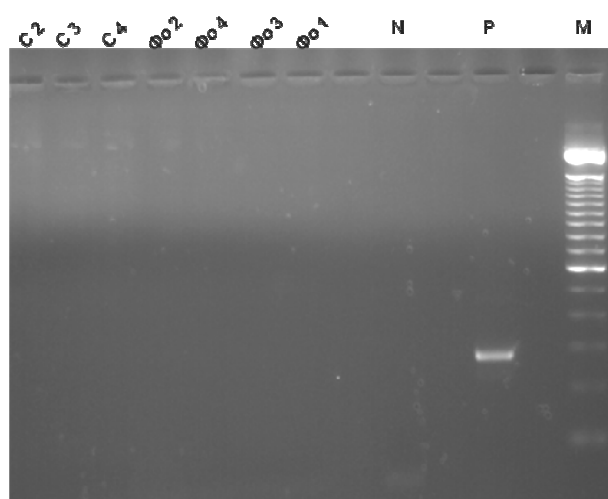
Εικόνα 7: Ανίχνευση του παθογόνου βακτηρίου *Salmonella* με τη μέθοδο της PCR σε επεξεργασμένα τρόφιμα φυτικής προέλευσης. **M:** 100bp DNA ladder, **N:** αρνητικός μάρτυρας, **P:** θετικός μάρτυρας *Salmonella*. **Kσ1:** Κάστανο σε SS, **Kσ2:** Κάστανο σε Mac Conkey, **Kσ3:** Κάστανο σε σοκολατόχρωμο, **Kσ4:** Κάστανο σε αιματούχο, **X(I)1:** χαλβάς με άμυλο αραβοσίτου σε SS, **X(I)2:** χαλβάς με άμυλο αραβοσίτου σε Mac Conkey, **X(I)4:** χαλβάς με άμυλο αραβοσίτου σε αιματούχο.



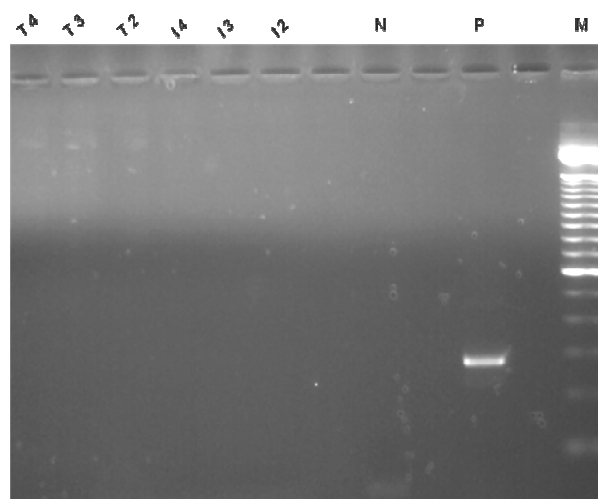
(A)



(B)



(Γ)



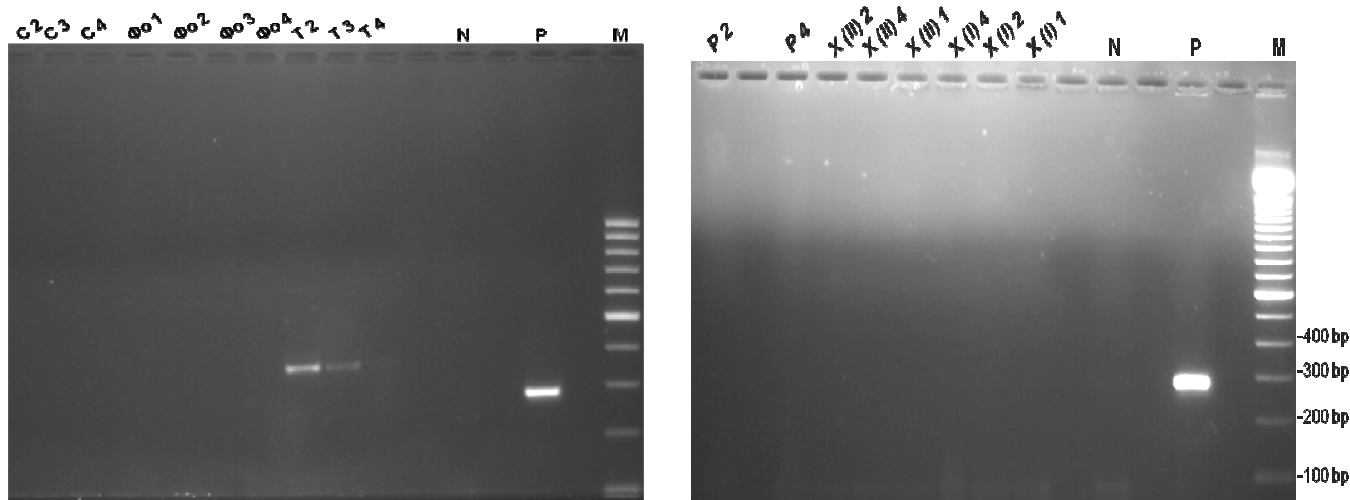
(Δ)

Εικόνα 8: Ανίχνευση του παθογόνου βακτηρίου *Salmonella* με τη μέθοδο της PCR σε επεξεργασμένα τρόφιμα φυτικής προέλευσης. M: 100bp DNA ladder, N: αρνητικός μάρτυρας, P: θετικός μάρτυρας *Salmonella*. (A) P2: Ρύζι σε Mac Conkey, P4: Ρύζι σε αιματούχο, X(III)2: χαλβός Φαρσάλων με άμυλο ρυζιού σε Mac Conkey, X(III)4: χαλβός Φαρσάλων με άμυλο ρυζιού σε αιματούχο, X(III)1: χαλβός Φαρσάλων με άμυλο ρυζιού σε SS, X(III)4: χαλβός Φαρσάλων με άμυλο πατάτας σε αιματούχο, X(III)2: χαλβός Φαρσάλων με άμυλο πατάτας σε Mac Conkey, X(III)1: χαλβός Φαρσάλων με άμυλο πατάτας σε SS, (B) Φa2: Φασόλια σε Mac Conkey, Φa3: Φασόλια σε σοκολατόχρωμο, Φa4: Φασόλια σε αιματούχο, Kp3: Καρύδια σε σοκολατόχρωμο, Kp1: Καρύδια σε SS, Kp4: Καρύδια σε αιματούχο, Kp2: Καρύδια σε Mac Conkey, E4: Ελιές σε αιματούχο, E3: Ελιές σε σοκολατόχρωμο, E2: Ελιές σε Mac Conkey, (Γ) C2: Cashews σε Mac Conkey, C3: Cashews σε σοκολατόχρωμο, C4: Cashews σε αιματούχο, Φo2: Φουντούκια σε Mac Conkey, Φo4: Φουντούκια σε αιματούχο, Φo3: Φουντούκια σε σοκολατόχρωμο, Φo1: Φουντούκια σε SS, (Δ) T4: Τοματοπολτός σε αιματούχο, T3: Τοματοπολτός σε σοκολατόχρωμο, T2: Τοματοπολτός σε Mac Conkey, I4: Ινδική καρύδα σε αιματούχο, I3: Ινδική καρύδα σε σοκολατόχρωμο, I2: Ινδική καρύδα σε Mac Conkey.

3.3.2 Ανίχνευση του παθογόνου βακτηρίου *Staphylococcus aureus*

Η ανίχνευση των προϊόντων της PCR πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης συγκέντρωσης 2% και τα αποτελέσματα που λήφθηκαν παρουσιάζονται στις εικόνες 9 & 10. Σε κάθε εικόνα στη στήλη P παρατηρούμε την παρουσία του αναμενόμενου προϊόντος PCR στα 270 bp για τον θετικό μάρτυρα, ενώ στη στήλη N η οποία αντιπροσωπεύει τον αρνητικό μάρτυρα δεν παρατηρούμε κάποιο προϊόν. Σε κανένα από τα υπό εξέταση δείγματα τροφίμων δεν ανιχνεύτηκε *Staphylococcus aureus* με τη μέθοδο της PCR, παρόλο που βρέθηκαν οι βέλτιστες συνθήκες με τον θετικό μάρτυρα. Συγκεκριμένα, στις αντίστοιχες στήλες των εικόνων 9 & 10 που αντιπροσωπεύουν τα αποτελέσματα από τις αποικίες που προέρχονται από τα καλλιεργητικά θρεπτικά υλικά μετά από επίστρωσή τους με τα αντίστοιχα δείγματα τροφίμων δεν παρατηρείται κάποιο προϊόν στο αναμενόμενο μοριακό βάρος.

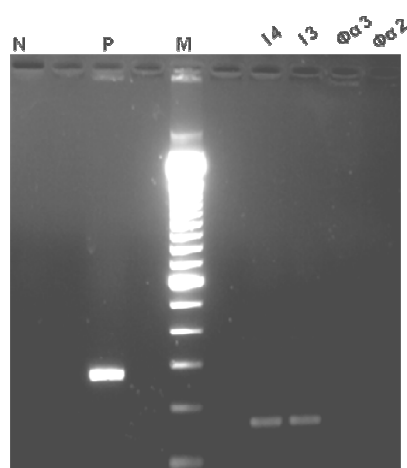
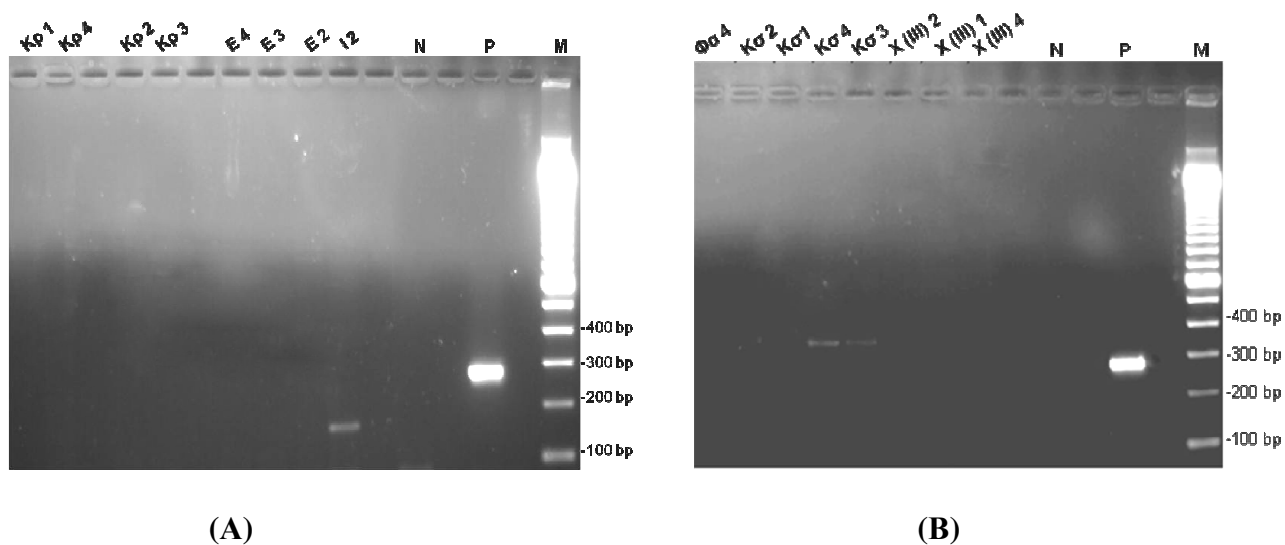
Στα αποτελέσματά μας όμως, στα δείγματα που προέρχονται από ινδική καρύδα χύμα, από τοματοπολτό και από γλυκό του κουταλιού κάστανο παρατηρήθηκαν με τη μέθοδο της PCR ζώνες που δεν αντιστοιχούσαν στο μέγεθος του προϊόντος που αναμενόταν. Συγκεκριμένα, στις στήλες T2 και T3 της εικόνας 9, στις οποίες παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τις αποικίες που προέρχονται από τα καλλιεργητικά θρεπτικά υλικά Mac Conkey και σοκολατόχρωμου μετά από επίστρωση με δείγμα τοματοπολτού, και στις στήλες Kσ4 και Kσ3 της εικόνας 10, στις οποίες παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τις αποικίες που προέρχονται από τα καλλιεργητικά θρεπτικά υλικά αιματούχου και σοκολατόχρωμου μετά από επίστρωση με δείγμα γλυκό του κουταλιού κάστανο παρατηρήθηκαν προϊόντα μεγαλύτερου μεγέθους (~370 bp) από το αναμενόμενο (270 bp). Παρομοίως, στις στήλες I2, 14 και I3 της εικόνας 10, στις οποίες παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τις αποικίες που προέρχονται από τα καλλιεργητικά θρεπτικά υλικά Mac Conkey, αιματούχου και σοκολατόχρωμου μετά από επίστρωση με δείγμα ινδικής καρύδας παρατηρήθηκαν προϊόντα με μικρότερο μοριακό βάρος (~170 bp) από το αναμενόμενο (270 bp).



(A)

(B)

Εικόνα 9: Ανίχνευση του παθογόνου βακτηρίου *Staphylococcus aureus* με τη μέθοδο της PCR σε επεξεργασμένα τρόφιμα φυτικής προέλευσης. M: 100bp DNA ladder, N: αρνητικός μάρτυρας, P: θετικός μάρτυρας *Staphylococcus aureus*. (A) C2: Cashews σε Mac Conkey, C3: Cashews σε σοκολατόχρωμο, C4: Cashews σε αιματούχο, Φ01: Φουντούκια σε SS, Φ02: Φουντούκια σε Mac Conkey, Φ03: Φουντούκια σε σοκολατόχρωμο, Φ04: Φουντούκια σε αιματούχο, T2: Τοματοπολτός σε Mac Conkey, T3: Τοματοπολτός σε σοκολατόχρωμο, T4: Τοματοπολτός σε αιματούχο, (B) P2: Ρύζι σε Mac Conkey, P4: Ρύζι σε αιματούχο, X(II)2: χαλβάς Φαρσάλων με άμυλο ρυζιού σε Mac Conkey, X(II)4: χαλβάς Φαρσάλων με άμυλο ρυζιού σε αιματούχο, X(I)1: χαλβάς Φαρσάλων με άμυλο ρυζιού σε SS, X(I)4: χαλβάς Φαρσάλων με άμυλο αραβοσίτου σε αιματούχο, X(I)2: χαλβάς Φαρσάλων με άμυλο αραβοσίτου σε Mac Conkey, X(I)1: χαλβάς Φαρσάλων με άμυλο αραβοσίτου σε SS



Εικόνα 10: Ανίχνευση του παθογόνου βακτηρίου *Staphylococcus aureus* με τη μέθοδο της PCR σε επεξεργασμένα τρόφιμα φυτικής προέλευσης. **M:** 100bp DNA ladder, **N:** αρνητικός μάρτυρας, **P:** θετικός μάρτυρας *Staphylococcus aureus*. **(A)** **Kp1:** Καρύδια σε SS, **Kp4:** Καρύδια σε αιματούχο, **Kp2:** Καρύδια σε Mac Conkey, **Kp3:** Καρύδια σε σοκολατόχρωμο, **E4:** Ελιές σε αιματούχο, **E3:** Ελιές σε σοκολατόχρωμο, **E2:** Ελιές σε Mac Conkey, **I2:** Ινδική καρύδα σε Mac Conkey, **(B)** **Φα4:** Φασόλια σε αιματούχο, **Κσ2:** Κάστανο σε Mac Conkey, **Κσ1:** Κάστανο σε SS, **Κσ4:** Κάστανο σε αιματούχο, **Κσ3:** Κάστανο σε σοκολατόχρωμο, **X(III)2:** χαλβάς Φαρσάλων με άμυλο πατάτας σε Mac Conkey, **X(III)1:** χαλβάς Φαρσάλων με άμυλο πατάτας σε SS, **X(III)4:** χαλβάς Φαρσάλων με άμυλο πατάτας σε αιματούχο, **(Γ)** **I4:** Ινδική καρύδα σε αιματούχο, **I3:** Ινδική καρύδα σε σοκολατόχρωμο, **Φα3:** Φασόλια σε σοκολατόχρωμο, **Φα2:** Φασόλια σε Mac Conkey.

Πίνακας 18: Ανακεφαλαιωτικός πίνακας ανίχνευσης των παθογόνων βακτηρίων *Salmonella* και *S. aureus* σε επεξεργασμένα τρόφιμα φυτικής προέλευσης με τη μέθοδο της PCR.

Δείγματα Τροφίμων	Αποτελέσματα PCR ³							
	<i>Salmonella</i>				<i>Staphylococcus aureus</i>			
	¹ SS agar	Mac Conkey	Choc agar	Blood agar	SS agar	Mac Conkey	Choc agar	Blood agar
Χαλβάς Φαρσάλων με άμυλο αραβοσίτου	+	+	+	+	-	-	nc	-
Χαλβάς Φαρσάλων με άμυλο ρυζιού	-	-	nc ²	-	-	-	nc	-
Χαλβάς Φαρσάλων με άμυλο πατάτας	-	-	nc	-	-	-	nc	-
Ρύζι	nc	-	nc	-	nc	-	nc	-
Φουντούκια	-	-	-	-	-	-	-	-
Cashews	nc	-	-	-	nc	-	-	-
Ελιές	nc	-	-	-	nc	-	-	-
Φασόλια	nc	-	-	-	nc	-	-	-
Καρύδια	-	-	-	-	-	-	-	-
Κάστανο	-	-	-	-	-	-	*	*
Ινδική καρύδα	nc	-	-	-	nc	*	*	*
Τοματοπολτός	nc	-	-	-	nc	*	*	-

¹ Για το κάθε ένα δείγμα χρησιμοποιήθηκαν 4 τριβλία: SS, Mac Conkey, αιματούχο (blood), σοκολατόχρωμο (choc).

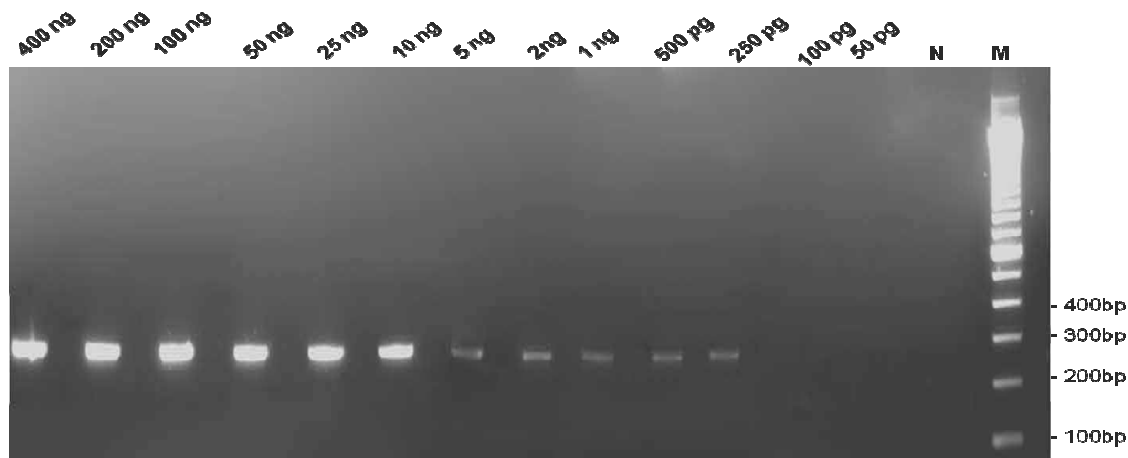
² nc: not colony. Τα τριβλία που έδωσαν στείρα καλλιέργεια δεν λήφθηκαν υπόψη και δεν αναλύθηκαν περαιτέρω με τη μέθοδο της PCR.

³ Ως + σημειώνονται τα δείγματα που έδωσαν θετικό αποτέλεσμα στην PCR, ενώ ως - αυτά που έδωσαν αρνητικό αποτέλεσμα.

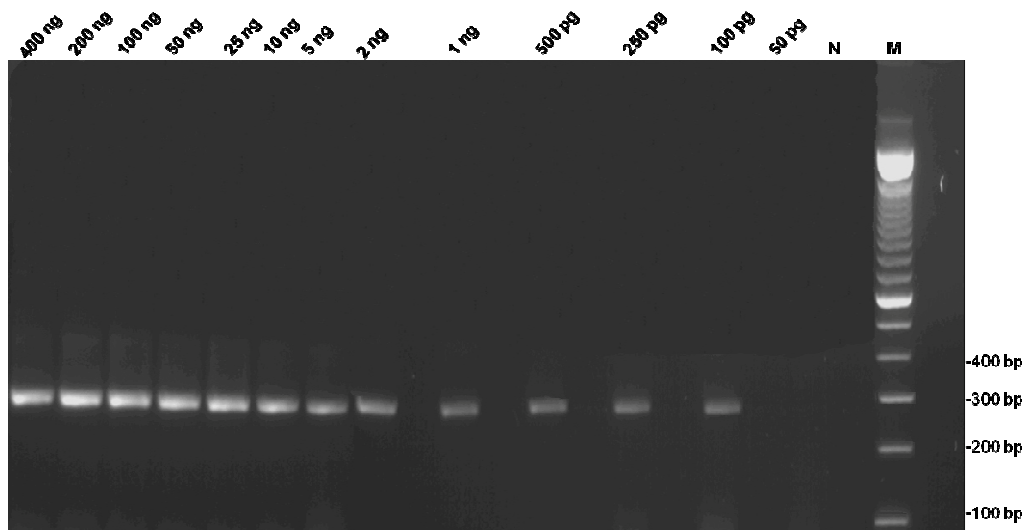
* Τα συγκεκριμένα δείγματα έδωσαν ζώνες που δεν αντιστοιχούσαν στο μέγεθος του προϊόντος που αναμενόταν (~270 bp).

3.4 Έλεγχος των επιπέδων ευαισθησίας της μεθόδου PCR για την ανίχνευση του βακτηριακού DNA των παθογόνων βακτηρίων *Salmonella* και *Staphylococcus aureus*

Για τον έλεγχο των επιπέδων ευαισθησίας ανίχνευσης του βακτηριακού DNA των παθογόνων *Salmonella* και *Staphylococcus aureus* με τη μέθοδο της PCR, χρησιμοποιήθηκε DNA απομονωμένο από τους αντίστοιχους θετικούς μάρτυρες. Η απομόνωση του βακτηριακού DNA πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο miniprep και ακολούθησε ποσοτικοποίησή του με φωτομέτρηση στα 260 nm. Κατόπιν, πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις με ddH₂O σε συγκεντρώσεις αρχικού DNA από 400 ng έως 50 pg. Μετά από κάθε αραιώση εξετάστηκαν τα επίπεδα ανίχνευσης με το πρωτόκολλο της PCR που περιγράφηκε στην ενότητα 2.2.5. Παρατηρήθηκε ότι στην ανίχνευση της *Salmonella* το ελάχιστο όριο βρέθηκε ίσο με 100 pg DNA (εικόνα 12), ενώ στην ανίχνευση του *Staphylococcus aureus* βρέθηκε ίσο με 250pg DNA (εικόνα 11).



Εικόνα 11: Ευαισθησία της μεθόδου PCR για την ανίχνευση του βακτηριακού DNA του παθογόνου βακτηρίου *Staphylococcus aureus*. M: 100bp DNA ladder, N: αρνητικός μάρτυρας. Η συγκέντρωση του βακτηριακού DNA σημειώνεται στο επάνω μέρος του gel.



Εικόνα 12: Ευαισθησία της μεθόδου PCR για την ανίχνευση του βακτηριακού DNA του παθογόνου βακτηρίου *Salmonella*. M: 100bp DNA ladder, N: αρνητικός μάρτυρας. Η συγκέντρωση του βακτηριακού DNA σημειώνεται στο επάνω μέρος του gel.

3.5 Έλεγχος των επιπέδων ευαισθησίας της μεθόδου PCR για την ανίχνευση των βακτηρίων *Salmonella* και *Staphylococcus aureus* σε χαλβά Φαρσάλων μετά από τεχνητή επιμόλυνση

Από τα προηγούμενα αποτελέσματά μας, βρέθηκε ότι μόνο ο χαλβάς Φαρσάλων με άμυλο αραβοσίτου έδωσε θετικό αποτέλεσμα για *Salmonella*. Δεδομένου αυτού επιχειρήθηκε τεχνητή επιμόλυνση του χαλβά με το συγκεκριμένο παθογόνο βακτήριο για τον προσδιορισμό των επιπέδων ανίχνευσης με τη μέθοδο της PCR.

Η μελέτη των επεξεργασμένων τροφίμων φυτικής προέλευσης για την ανίχνευση του *Staphylococcus aureus* τόσο με τη μέθοδο της PCR όσο και με τον μακροσκοπικό έλεγχο των τριβλίων δεν έδωσε κάποιο θετικό αποτέλεσμα. Ωστόσο, προκειμένου να διαπιστωθεί εάν ο χαλβάς Φαρσάλων μπορεί να αποτελέσει υπόστρωμα για την ανίχνευση του *Staphylococcus aureus* επιχειρήθηκε τεχνητή επιμόλυνση με το συγκεκριμένο βακτήριο.

3.5.1 Τεχνητή επιμόλυνση του χαλβά Φαρσάλων με το παθογόνο βακτήριο *Salmonella*

Αναλυτικά, δείγμα χαλβά Φαρσάλων επιμολύνθηκε τεχνητά με υποδεκαπλάσιες διαδοχικές αραιώσεις του βακτηρίου *Salmonella* σε συγκεντρώσεις από 10^6 έως 10^0 CFU/ml, όπως περιγράφεται στην ενότητα 2.2.8.2. Ακολούθησε εμπλουτισμός του δείγματος στο θρεπτικό μέσο Buffered Peptone Water (BPW) για 24 h στους 37°C .

Η απομόνωση του βακτηριακού DNA πραγματοποιήθηκε με την miniprep μέθοδο. Μετά την εφαρμογή της PCR και την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων σε πήκτωμα αгарόζης συγκέντρωσης 2% λήφθηκαν τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στην εικόνα 13 και στον πίνακα 19. Το ελάχιστο όριο (αριθμός κυττάρων) πάνω από το οποίο μπορεί να γίνει επιτυχώς ανίχνευση του βακτηρίου *Salmonella* ή η ευαισθησία της PCR βρέθηκε ίση με 10^5 CFU/10g χαλβά.

3.5.2 Τεχνητή επιμόλυνση του χαλβά Φαρσάλων με το παθογόνο βακτήριο *Staphylococcus aureus*

Στην περίπτωση του *Staphylococcus aureus*, πραγματοποιήθηκαν δύο ξεχωριστά πειράματα επιμόλυνσης, χρησιμοποιώντας αντίστοιχα δύο διαφορετικά θρεπτικά μέσα εμπλουτισμού, το κοινό θρεπτικό μέσο Buffered Peptone Water (BPW), το οποίο είχε χρησιμοποιηθεί και για την περίπτωση της τεχνητής επιμόλυνσης του χαλβά με *Salmonella* και το εκλεκτικό μέσο Giolitti Cantoni.

Συγκεκριμένα, δείγμα χαλβά Φαρσάλων επιμολύνθηκε τεχνητά με υποδεκαπλάσιες διαδοχικές αραιώσεις του βακτηρίου *S. aureus* σε συγκεντρώσεις από 10^8 έως 10^0 CFU/ml, όπως περιγράφεται στην ενότητα 2.2.8.3 και ακολούθησε ο εμπλουτισμός για 24 h στους 37°C . Μετά την απομόνωση του βακτηριακού DNA με την miniprep μέθοδο, την εφαρμογή της PCR και την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων σε πήκτωμα αгарόζης συγκέντρωσης 2% λήφθηκαν τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στην εικόνα 14 και στον πίνακα 19. Η ευαισθησία της μεθόδου PCR για την ανίχνευση του *S. aureus* βρέθηκε ίση με 10^6 CFU/10g χαλβά όταν χρησιμοποιήθηκε ως μέσο

εμπλουτισμού το Buffered Peptone Water (BPW), ενώ με τη χρήση του εκλεκτικού θρεπτικού μέσου Giolitti Cantoni, παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της ευαισθησίας της PCR, με όριο ανίχνευσης ίσο με 10^3 CFU/10g χαλβά.

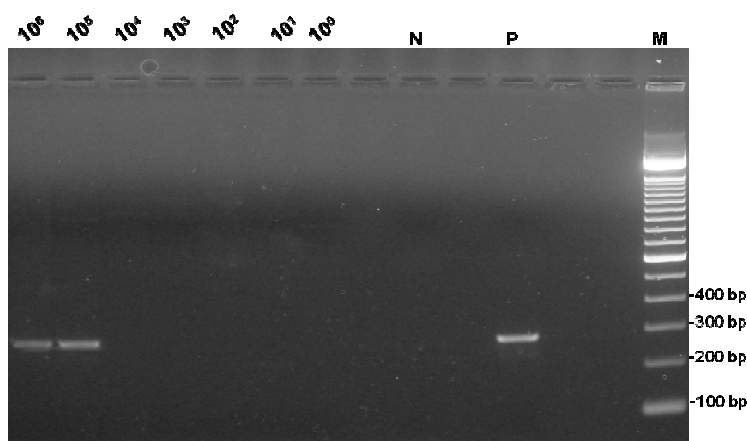
Πίνακας 19: Ευαισθησία της μεθόδου PCR για την ανίχνευση των παθογόνων βακτηρίων *Salmonella* και *Staphylococcus aureus* σε τεχνητά επιμολυσμένο χαλβά Φαρσάλων.

Βακτηριακά Στελέχη	Εμπλουτισμός ¹	Συγκέντρωση (CFU/10g χαλβά)								
		10 ⁸	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ¹	10 ⁰
<i>Staphylococcus aureus</i>	BPW	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	Giolitti Cantoni	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>Salmonella</i>	BPW			+	+	-	-	-	-	-

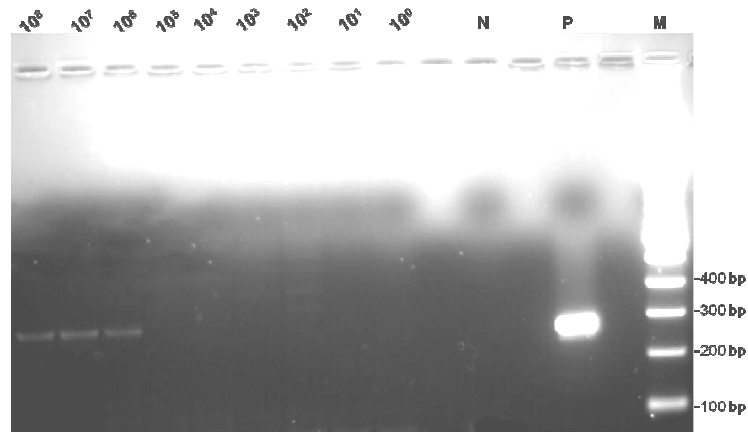
+ το αποτέλεσμα της PCR ήταν θετικό, - το αποτέλεσμα της PCR ήταν αρνητικό.

BPW: Buffered Peptone Water

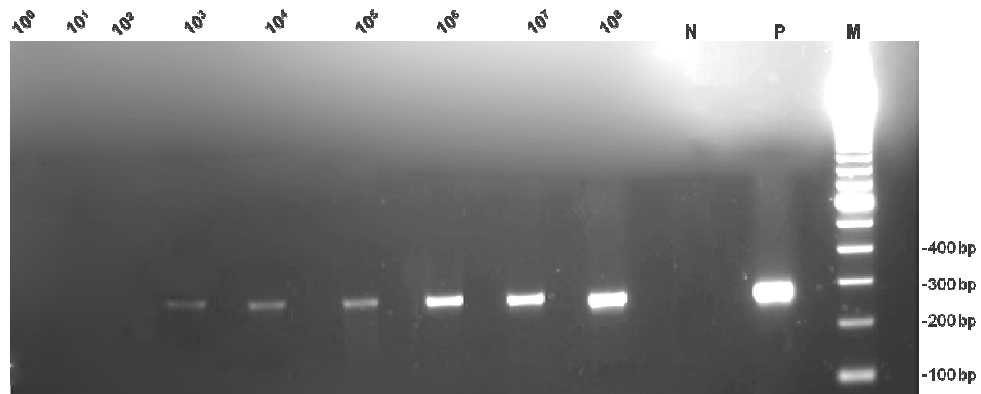
¹Για το *S.aureus*, ο εμπλουτισμός των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σε 2 διαφορετικά θρεπτικά μέσα (BPW & Giolitti Cantoni). Για τη *Salmonella* ο εμπλουτισμός πραγματοποιήθηκε στο BPW.



Εικόνα 13: Ευαισθησία της μεθόδου PCR για την ανίχνευση του παθογόνου βακτηρίου *Salmonella* σε τεχνητά επιμολυσμένο χαλβά Φαρσάλων. M: 100bp DNA ladder, N: αρνητικός μάρτυρας, P: θετικός μάρτυρας *Salmonella*. Τα CFU/10g χαλβά σημειώνονται στο επάνω μέρος του gel.



(A)



(B)

Εικόνα 14: Ευαισθησία της μεθόδου PCR για την ανίχνευση του παθογόνου βακτηρίου *Staphylococcus aureus* σε τεχνητά επιμολυσμένο χαλβά Φαρσάλων. **M:** 100bp DNA ladder, **N:** αρνητικός μάρτυρας, **P:** θετικός μάρτυρας *Staphylococcus aureus*. **(A)** Εμπλουτισμός στο θρεπτικό μέσο Buffered Peptone Water (BPW) **(B)** Εμπλουτισμός στο θρεπτικό μέσο Giolitti Cantoni. Τα CFU/10g χαλβά σημειώνονται στο επάνω μέρος του gel.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Περισσότερες από 200 γνωστές ασθένειες μεταδίδονται μέσω της κατανάλωσης των τροφίμων με κυριότερους αιτιολογικούς παράγοντες, τους ιούς, τα βακτήρια, τα παράσιτα, τις τοξίνες και τα πρίον, ενώ τα συμπτώματα κυμαίνονται από ήπια γαστρεντερίτιδα έως πιο σοβαρά και χρόνια νευρολογικά, ηπατικά και νεφρικά προβλήματα (Mead P.S. et al. 1999).

Από τα παθογόνα βακτήρια, ιδιαίτερης σημασίας είναι τα στελέχη του *Staphylococcus aureus* και τα είδη του γένους *Salmonella*. Συγκεκριμένα, τα είδη του γένους *Salmonella* αποτελούν την κυριότερη αιτία τροφογενών ασθενειών παγκοσμίως, ενώ σύμφωνα με εκτιμήσεις, στις ΗΠΑ καταγράφονται περίπου 1.5 εκ. κρούσματα, 15000 νοσηλείες και 500 θάνατοι ετησίως. Συνηθέστερος τύπος σαλμονέλλωσης είναι η εντεροκολίτιδα (μη τυφοειδής σαλμονέλλωση), μία αυτοπεριοριζόμενη βακτηριακή λοίμωξη του γαστρεντερικού επιθηλίου, ενώ πιο σοβαρή είναι η νόσος του τυφοειδούς πυρετού, που χαρακτηρίζεται από διασυστηματική λοίμωξη και υψηλό πυρετό (Saroj. S.D et al. 2008, Guo X. et al. 2000).

Από την άλλη, τα στελέχη του *Staphylococcus aureus* αποτελούν τον κυριότερο αιτιολογικό παράγοντα σταφυλοκοκκικών τροφικών δηλητηριάσεων, μία από τις πιο σημαντικές οικονομικά τροφογενείς ασθένειες παγκοσμίως (Alarcon B. et al. 2006). Κάθε χρόνο στις ΗΠΑ εκτιμάται ότι σημειώνονται περίπου 25 εξάρσεις σταφυλοκοκκικής δηλητηρίασης, ενώ στη Γαλλία ο *Staphylococcus aureus* αποτελεί τη δεύτερη αιτία τροφογενών εξάρσεων μετά τη *Salmonella* (Keronanton A. et al. 2007, Doyle M.P. and Beuchat L.R. 2007). Οι τροφικές δηλητηριάσεις από *Staphylococcus aureus* οφείλονται στην κατανάλωση τροφίμων που περιέχουν μία ή περισσότερες προσχηματισμένες εντεροτοξίνες και χαρακτηρίζονται από γαστρεντερίτιδα συνοδευόμενη από ναυτία, έμετο και διάρροια (Alarcon B. et al. 2006).

Συνήθως, τροφικές λοιμώξεις από *Salmonella* αλλά και δηλητηριάσεις σταφυλοκοκκικής προέλευσης αποδίδονται σε μολυσμένα τρόφιμα ζωϊκής προέλευσης, όπως είναι το κρέας και τα παράγωγά του, τα προϊόντα πουλερικών, το γάλα και τα γαλακτομικά προϊόντα (Yong Li and Mustapha A. 2004). Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια, παρατηρείται μία αύξηση της έξαρσης τροφογενών κρουσμάτων σαλμονέλλωσης και σταφυλοκοκκικής δηλητηρίασης που σχετίζονται με την κατανάλωση τροφίμων φυτικής προέλευσης, λόγω αλλαγών στις αγρονομικές πρακτικές και στις διαιτητικές συνήθειες.

Οι παραδοσιακές μικροβιολογικές μέθοδοι που εφαρμόζονται για την ανίχνευση των συγκεκριμένων παθογόνων βακτηρίων στα τρόφιμα είναι χρονοβόρες στη διεκπεραίωσή τους, καθώς για την παραλαβή των αποτελεσμάτων απαιτούνται αρκετές μέρες και επαναλαμβανόμενα στάδια εμπλουτισμού των δειγμάτων. Τα τελευταία χρόνια γίνονται προσπάθειες για μεγαλύτερη ευαισθησία ανίχνευσης και για πιο γρήγορη διεκπεραίωση, με τις λεγόμενες «γρήγορες τεχνικές», στις οποίες περιλαμβάνονται ανοσολογικές μέθοδοι, μέθοδοι υβριδισμού και ενίσχυσης του DNA. Μεταξύ αυτών η PCR συνιστά την κυριότερη και απλούστερη μέθοδο ανίχνευσης των παθογόνων βακτηρίων στα τρόφιμα, καθώς χαρακτηρίζεται από υψηλή ευαισθησία και εξειδίκευση, ενώ δίνει αποτέλεσμα μέσα σε σύντομο χρονικό διάστημα (Saroj S.D et al. 2008).

Αντικείμενο λοιπόν, της παρούσας μελέτης είναι η ανίχνευση των εντεροπαθογόνων βακτηρίων *Salmonella* και *S. aureus* σε επεξεργασμένα τρόφιμα φυτικής προέλευσης με τη μέθοδο της PCR. Αναλυτικότερα, α) πραγματοποιήθηκε προτύπωση των συνθηκών της αντίδρασης PCR για τα συγκεκριμένα στελέχη, β) ελέγχθηκε η αξιοπιστία της μεθόδου, γ) συγκρίθηκαν τα αποτελέσματα που λήφθηκαν με την τεχνική της PCR με εκείνα από τον μακροσκοπικό έλεγχο των καλλιεργητικών

θρεπτικών υλικών και δ) έγιναν οι πρώτες προσπάθειες εκτίμησης των επιπέδων ευαισθησίας της PCR.

Συγκεκριμένα, τα δείγματα τροφίμων που επιλέχτηκαν να εξεταστούν προέρχονταν από χαλβά Φαρσάλων που ο καθένας περιείχε διαφορετικών ειδών άμυλο (χαλβάς με άμυλο ρυζιού, χαλβάς με άμυλο πατάτας και χαλβάς με άμυλο αραβοσίτου), από ελιές χύμα, από γλυκό του κουταλιού κάστανο, από συμπυκνωμένο χυμό ντομάτας, από ξηρούς καρπούς (cashews, φουντούκια, καρύδια και ινδική καρύδα) και από μαγειρεμένα ρύζι και ξηρά φασόλια.

Αρχικά, για κάθε ένα από τα δείγματα τροφίμων μετά το στάδιο εμπλουτισμού στο θρεπτικό μέσο Tryptic Soy broth (TSB) για 24h, πραγματοποιήθηκε επίστρωση σε 4 καλλιεργητικά θρεπτικά υλικά (SS, Mac Conkey, αιματούχο, σοκολατόχρωμο) για τον μακροσκοπικό έλεγχο πιθανής μόλυνσης των δειγμάτων από τα παθογόνα βακτήρια *Salmonella* και *Staphylococcus aureus*. Τα συγκεκριμένα στερεά θρεπτικά υλικά αφενός ευνοούν την ανάπτυξη των δύο παθογόνων και αφετέρου επιτρέπουν ένα στοιχειώδη διαχωρισμό από τα άλλα είδη βακτηρίων, βάσει διαφορών στη μορφολογία των βακτηριακών αποικιών που αναπτύσσονται σε αυτά. Επιπλέον, οι ύποπτες αποικίες για *Staphylococcus aureus* ελέγχθηκαν για την παραγωγή καταλάσης και κονγκουλάσης, τα οποία αποτελούν βασικά διαγνωστικά χαρακτηριστικά για την ταυτοποίησή του. Στα αποτελέσματά μας δεν παρατηρήθηκε καμία αποικία που να παρουσιάζει τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά των συγκεκριμένων βακτηρίων. Επιπλέον, τα ύποπτα στελέχη που εξετάστηκαν για την παραγωγή καταλάσης και κονγκουλάσης βρέθηκαν αρνητικά ως προς *S. aureus*.

Κατόπιν, συλλέχτηκαν οι αποικίες από τα αντίστοιχα καλλιεργητικά υλικά και ακολούθησε η απομόνωση του βακτηριακού DNA, η ποσοτικοποίησή του και η εφαρμογή της μεθόδου PCR, χρησιμοποιώντας εκκινητές που στοχεύουν ειδικά στις αλληλουχίες *Its* και *nuc* των βακτηρίων *Salmonella* και *Staphylococcus aureus* αντίστοιχα.

Οι συνθήκες της αντίδρασης PCR που χρησιμοποιήθηκαν για τα δείγματα τροφίμων προτυπώθηκαν, χρησιμοποιώντας DNA απομονωμένο από τους θετικούς μάρτυρες *Salmonella* και *Staphylococcus aureus* αντίστοιχα. Οι τελικές βέλτιστες συνθήκες παρουσιάζονται στην ενότητα 3.2.

Από τα δείγματα επεξεργασμένων τροφίμων φυτικής προέλευσης που εξετάστηκαν με τη μέθοδο της PCR για το παθογόνο βακτήριο *Salmonella*, παρατηρήσαμε ότι μόνο ο χαλβάς Φαρσάλων με άμυλο αραβοσίτου έδωσε θετικό αποτέλεσμα. Συγκεκριμένα, αναπτύχθηκαν αποικίες στα καλλιεργητικά θρεπτικά υλικά SS, Mac Conkey, αιματούχο και σοκολατόχρωμο οι οποίες δεν παρουσίασαν μακροσκοπικά τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά της *Salmonella* και ακολούθησε η επιλογή αυτών των αποικιών και η μελέτη τους με την PCR, η οποία έδωσε προϊόν στο αναμενόμενο μοριακό βάρος (312 bp).

Τα αποτελέσματά μας με την τεχνική της PCR δείχνουν ότι ανιχνεύσαμε *Salmonella*, χρησιμοποιώντας εκκινητές που στοχεύουν στην αλληλουχία *Its*. Σε μία προηγούμενη μελέτη, το ζεύγος των εκκινητών ITSF/ITSR, το οποίο χρησιμοποιήθηκε και στην παρούσα εργασία βρέθηκε να παρουσιάζει υψηλή εξειδίκευση, επιτυγχάνοντας την ενίσχυση της αλληλουχίας-στόχου μόνο στα στελέχη που ανήκαν στο γένος *Salmonella* (Chiu T.H. et al. 2005). Η ίδια μελέτη αναφέρει ότι η αλληλουχία *Its* τοποθετείται μεταξύ των 16S και 23S rRNA γονιδίων στα βακτηριακά οπερόνια rRNA, τα οποία εκφράζονται σε υψηλό αριθμό αντιγράφων προσδίδοντας έτσι υψηλή ευαισθησία στην PCR.

Η αδυναμία ανίχνευσης του συγκεκριμένου παθογόνου στο χαλβά Φαρσάλων με τον μακροσκοπικό έλεγχο των αντίστοιχων στερεών υλικών, πιθανόν να οφείλεται στο γεγονός ότι ορισμένοι ορότυποι *Salmonella* σχηματίζουν αποικίες στα στερεά θρεπτικά άγαρ, οι οποίες δεν εμφανίζουν τα τυπικά χαρακτηριστικά της *Salmonella* (atypical colonies), οδηγώντας έτσι στη λήψη ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων με την μακροσκοπική μέθοδο (Bennett A.R. et al. 1998). Ορισμένοι ορότυποι *Salmonella* που απομονώθηκαν από κλινικά δείγματα παρατηρήθηκε ότι μπορούν να μεταβολίσουν τη λακτόζη και δεν μπορούν να παράγουν υδρόθειο (Farmer et al. 1985, Devenish et al. 1986). Ο μη μεταβολισμός της λακτόζης και η παραγωγή του υδροθείου αποτελούν βασικά διαγνωστικά χαρακτηριστικά ταυτοποίησης της *Salmonella* (Bennett A.R. et al. 1998), που στο SS άγαρ που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία θα μπορούσαν εύκολα να γίνουν αντιληπτά με την ανάπτυξη άχρωμων αποικιών με μαύρα κέντρα, οι οποίες δεν διαφαίνεται να υπάρχουν (εικόνα 5). Παρόλα αυτά, μετά το αποτέλεσμα της θετικής PCR η καλλιέργεια δεν ελέγχθηκε προσεκτικά για τυχόν άτυπες αποικίες θετικές στη λακτόζη που θα μπορούσαν να αντιστοιχούν σε *Salmonella*. Για τον σχετικό έλεγχο του τελευταίου πιθανόν να επανέλθουμε μελλοντικά.

Η αναζήτηση του *Staphylococcus aureus* στα δείγματα των επεξεργασμένων τροφίμων φυτικής προέλευσης με τη μέθοδο της PCR έδωσε αρνητικό αποτέλεσμα. Τα αποτελέσματα της PCR συμφωνούν με εκείνα της δοκιμασίας καταλάσης και κονγκουλάσης και με εκείνα από την μακροσκοπική εξέταση των αντίστοιχων καλλιεργητικών υλικών.

Ωστόσο, παρατηρήσαμε σε 4 δείγματα τροφίμων που προέρχονταν από ινδική καρύδα χύμα, από συμπυκνωμένο χυμό τομάτας και από γλυκό του κουταλιού κάστανο με τη μέθοδο της PCR ζώνες που δεν αντιστοιχούσαν στο μέγεθος του προϊόντος που αναμενόταν (270bp). Συγκεκριμένα, στις αποικίες που προέρχονταν από τα καλλιεργητικά θρεπτικά υλικά Mac Conkey και σοκολατόχρωμου μετά από επίστρωση με δείγμα τοματοπολτού, και σε εκείνες που προέρχονταν από τα καλλιεργητικά θρεπτικά υλικά αιματούχου και σοκολατόχρωμου μετά από επίστρωση με δείγμα γλυκό του κουταλιού κάστανο παρατηρήθηκαν προϊόντα μεγαλύτερου μεγέθους (~370 bp) από το αναμενόμενο (270 bp). Παρομοίως, στις αποικίες που προέρχονταν από τα καλλιεργητικά θρεπτικά υλικά Mac Conkey, αιματούχου και σοκολατόχρωμου μετά από επίστρωση με δείγμα ινδικής καρύδας παρατηρήθηκαν προϊόντα με μικρότερο μοριακό βάρος (~170 bp) από το αναμενόμενο (270 bp). Σε μία προηγούμενη μελέτη στην οποία εφαρμόστηκε το ίδιο ζεύγος εκκινητών, δύο βακτηριακά στελέχη που δεν ανήκαν στο είδος του *Staphylococcus aureus* (*E. coli* και *Klebsiella pneumoniae*) παρήγαγαν προϊόντα PCR που αντιστοιχούσαν σε τμήματα DNA μεγαλύτερου μεγέθους (~500bp) σε σχέση με αυτό που αναμενόταν (270bp) (Brakstad O.G. et al. 1992). Ωστόσο, οι συγγραφείς δεν δίνουν κάποια εξήγηση.

Στη συνέχεια, με σκοπό την εκτίμηση της ευαισθησίας ανίχνευσης του βακτηριακού DNA των παθογόνων *Salmonella* και *Staphylococcus aureus* με τη μέθοδο της PCR, χρησιμοποιήθηκε DNA απομονωμένο από τους αντίστοιχους θετικούς μάρτυρες. Πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις του σε συγκέντρωση αρχικού DNA μεταξύ 400 ng έως 50 pg και παρατηρήσαμε ότι στην ανίχνευση της *Salmonella* το ελάχιστο όριο βρέθηκε ίσο με 100 pg DNA και στην ανίχνευση του *Staphylococcus aureus* το ελάχιστο όριο βρέθηκε ίσο με 250 pg DNA. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με

αυτά που έχουν αναφερθεί σε προηγούμενες μελέτες (Wilson I.G. et al.1991, Pathamanathan S.G. et al.2003).

Κατόπιν, έγιναν οι πρώτες προσπάθειες εκτίμησης των επιπέδων ανίχνευσης των παθογόνων βακτηρίων *Salmonella* και *Staphylococcus aureus* με τη μέθοδο της PCR, σε χαλβά Φαρσάλων με άμυλο αραβοσίτου, μετά από τεχνητή επιμόλυνσή του. Συγκεκριμένα, δείγμα χαλβά Φαρσάλων επιμολύνθηκε τεχνητά με υποδεκαπλάσιες διαδοχικές αραιώσεις του βακτηρίου *Salmonella* σε συγκεντρώσεις από 10^6 - 10^0 CFU/ml και ακολούθησε προεμπλουτισμός των δειγμάτων στο θρεπτικό μέσο Buffered Peptone Water (BPW) για 24 h στους 37°C. Η αποτελεσματικότητα του συγκεκριμένου θρεπτικού μέσου για την αναβίωση των στελεχών *Salmonella* σε διάφορα τρόφιμα αναφέρθηκε σε προηγούμενη μελέτη (Chiu T.H. et al. 2005). Μετά την εφαρμογή της PCR το ελάχιστο όριο πάνω από το οποίο μπορεί να γίνει επιτυχώς ανίχνευση του βακτηρίου *Salmonella* βρέθηκε ίσο με 10^4 CFU/g χαλβά (10^5 CFU/10g χαλβά). Παρόμοια μελέτη για την ανίχνευση της *Salmonella* σε τεχνητά επιμολυσμένο χαλβά Φαρσάλων δεν υπάρχει. Σε μία προηγούμενη μελέτη, χρησιμοποιώντας το ίδιο ζεύγος εκκινητών ITSf/ITSr η ευαισθησία της PCR βρέθηκε υψηλότερη και ίση με 1-9 CFU/g μετά από εμπλουτισμό των τεχνητά μολυσμένων δειγμάτων γάλακτος σε 1% BPW για 24 h στους 37°C (Chiu T.H. et al. 2005). Με ανάλογο τρόπο, και σε άλλες μελέτες που διεξήχθησαν σε τεχνητά μολυσμένα φρέσκα και ελάχιστα επεξεργασμένα λαχανικά, η ευαισθησία της PCR βρέθηκε υψηλή με όρια ανίχνευσης που κυμαίνονταν από 10^2 - 10^1 CFU/g (Guo X. et al. 2000, Elizaquivel P. and Aznar R. 2008). Επίσης, επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι η δόση που απαιτείται για να προκληθεί λοίμωξη από *Salmonella* (infectious dose) κυμαίνεται από 10-100 κύτταρα (Bhagwat A.A et al. 2003).

Από τα παραπάνω παρατηρούμε ότι η ευαισθησία της PCR για την ανίχνευση της *Salmonella* στο χαλβά Φαρσάλων με τεχνητή επιμόλυνση είναι πιο χαμηλή συγκρινόμενη με τα αντίστοιχα αποτελέσματα που αναφέρονται στη βιβλιογραφία σε άλλα είδη τροφίμων. Αυτή η διαφοροποίηση στα αποτελέσματα πιθανόν να οφείλεται στη διαφορετική σύσταση των υπό εξέταση τροφίμων, καθώς έχει αναφερθεί ότι η ευαισθησία ανίχνευσης της PCR ποικίλλει ανάλογα με τον τύπο των τροφίμων (Tsen H.-Y. et al. 1992).

Η τεχνητή επιμόλυνση του χαλβά Φαρσάλων με το βακτήριο *Staphylococcus aureus*, πραγματοποιήθηκε σε δύο ξεχωριστά πειράματα, χρησιμοποιώντας αντίστοιχα δύο διαφορετικά θρεπτικά μέσα εμπλουτισμού, το κοινό μέσο Buffered Peptone Water (BPW) και το εκλεκτικό μέσο Giolitti Cantoni. Η ευαισθησία ανίχνευσης του *Staphylococcus aureus* στον τεχνητά μολυσμένο χαλβά με την τεχνική της PCR βρέθηκε ίση με 10^5 CFU/g (10^6 CFU/10g χαλβά), μετά από εμπλουτισμό του δείγματος στο BPW. Τα ίδια επίπεδα ευαισθησίας βρέθηκαν μετά από εμπλουτισμό των δειγμάτων πράσινης πιπεριάς στο ίδιο θρεπτικό μέσο και χρησιμοποιώντας εκκινητές που στοχεύουν στο ίδιο γονίδιο (*nuc*) (Elizaquivel P. and Aznar R. 2008). Ωστόσο, όταν χρησιμοποιήθηκε για τον εμπλουτισμό του χαλβά Φαρσάλων το εκλεκτικό θρεπτικό μέσο Giolitti Cantoni, παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της ευαισθησίας της PCR, με όριο ανίχνευσης ίσο με 10^2 CFU/g (10^3 CFU/10g χαλβά). Προφανώς η μεγαλύτερη εκλεκτικότητα του Giolitti Cantoni και η ικανότητά του να επιτρέπει την ανάπτυξη των στελεχών του *S. aureus* ακόμα και όταν απαντούν σε χαμηλούς αριθμούς στα τρόφιμα, ευθύνονται για την

αύξηση της ευαισθησίας της PCR σε επίπεδα υψηλότερα σε σχέση με αυτά που επιτεύχθηκαν μετά από τον εμπλουτισμό στο BPW. Παρόμοια ήταν και τα επίπεδα ευαισθησίας που λήφθηκαν σε προηγούμενη μελέτη μετά από εμπλουτισμό των τεχνητά μολυσμένων δειγμάτων κρέατος στο θρεπτικό μέσο Giolitti Cantoni και χρησιμοποιώντας το ίδιο ζεύγος εκκινητών (Alarcon B. et al. 2006).

Πάντως πρέπει να σημειωθεί ότι τα υψηλά επίπεδα ευαισθησίας της PCR που επιτεύχθηκαν στην παρούσα εργασία, μετά από εμπλουτισμό του χαλβά Φαρσάλων στο Giolitti Cantoni είναι ιδιαίτερης σημασίας, δεδομένου ότι τα επιτρεπτά όρια για τον *S. aureus* σε ορισμένα τρόφιμα κυμαίνονται από 10^2 - 10^3 CFU/g (Alarcon B. et al. 2006).

Συμπερασματικά, στην παρούσα εργασία προτυπώθηκαν οι συνθήκες αντίδρασης της PCR για την ανίχνευση των παθογόνων βακτηρίων *Salmonella* και *Staphylococcus aureus* σε επεξεργασμένα τρόφιμα φυτικής προέλευσης, επιλέγοντας ζεύγη εκκινητών που στοχεύουν ειδικά στις αλληλουχίες *Its* και *nuc* αντίστοιχα και τα οποία βρέθηκε να παρουσιάζουν υψηλή εξειδίκευση, επιτυγχάνοντας την ενίσχυση των αλληλουχιών-στόχων μόνο στα στελέχη που ανήκουν στο γένος *Salmonella* και στα στελέχη που ανήκουν στο είδος του *Staphylococcus aureus* αντίστοιχα.

Το παθογόνο βακτήριο *Salmonella* δεν ανιχνεύτηκε με τον μακροσκοπικό έλεγχο των αντίστοιχων καλλιεργητικών θρεπτικών υλικών σε κανένα από τα υπό εξέταση δείγματα τροφίμων. Ωστόσο, τα αποτελέσματά μας από την αναζήτηση *Salmonella* με τη μέθοδο της PCR δείχνουν ότι το συγκεκριμένο βακτήριο ανιχνεύτηκε στο χαλβά Φαρσάλων με άμυλο αραβοσίτου. Για πρώτη φορά γίνεται η ανίχνευση *Salmonella* στο συγκεκριμένο είδος τροφίμου, γεγονός που δείχνει ότι ο χαλβάς Φαρσάλων μπορεί να αποτελέσει ένα ιδανικό υπόστρωμα για την ανάπτυξη του συγκεκριμένου βακτηρίου.

Από την άλλη, το παθογόνο βακτήριο *Staphylococcus aureus* δεν ανιχνεύτηκε σε κανένα από τα υπό εξέταση δείγματα τροφίμων, τόσο με την εφαρμογή της μεθόδου PCR όσο και με την μακροσκοπική εξέταση των αντίστοιχων καλλιεργητικών θρεπτικών υλικών. Ωστόσο, μελλοντικά θα εξετάσουμε με τη μέθοδο της PCR και σε άλλα τρόφιμα την ανίχνευση του γονιδίου *ent* της εντεροτοξίνης, στην οποία αποδίδονται οι τροφικές δηλητηριάσεις και η οποία θα έχει ιδιαίτερη κλινική σημασία.

Τα επίπεδα ευαισθησίας της PCR ελέγχτηκαν, πραγματοποιώντας τεχνητή επιμόλυνση δείγματος από χαλβά Φαρσάλων με άμυλο αραβοσίτου ξεχωριστά με τα συγκεκριμένα δύο παθογόνα βακτήρια και οι πρώτες προσπάθειες εκτίμησης των επιπέδων ευαισθησίας έδειξαν ότι μπορούν να επιτευχθούν χαμηλά όρια ανίχνευσης. Παρόμοια μελέτη που να αφορά στην ανίχνευση της *Salmonella* και του *Staphylococcus aureus* σε τεχνητά μολυσμένο χαλβά Φαρσάλων δεν είναι γνωστή.

Συνοψίζοντας, τα αποτελέσματα αυτά θέτουν τις βάσεις για την ανάπτυξη μελλοντικά μίας γενικής μεθοδολογίας βασισμένης στην τεχνική της PCR με σκοπό την ανίχνευση των παθογόνων βακτηρίων *Salmonella* και *Staphylococcus aureus* σε επεξεργασμένα τρόφιμα φυτικής προέλευσης.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Aguilera M.O., Stagnitta P.V., Micalizzi B., Stefanini de Guzman A.M. (2005), Prevalence and characterization of *Clostridium perfringens* from spices in Argentina, *Anaerobe*, **11**:327-334.
- Alarcon B., Vicedo B., Aznar R. (2006), PCR-based procedures for detection and quantification of *Staphylococcus aureus* and their application in food, *Journal of Applied microbiology*, **100**:352-364.
- Altekruse S.F., Cohen M.L., Swerdlow D.L. (1997), Emerging Foodborne diseases, *Emerging Infectious Diseases*, **3**:285-293.
- Ankolekar C., Rahmati T., Labbe R.G. (2009), Detection of toxigenic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* spores in U.S. rice, *International journal of food microbiology*, **128**:460-466.
- Bean N.H. and Griffin P.M. (1990), Foodborne disease outbreaks in the United States, 1973-1987:Pathogens, vehicles and trends, *J. Food Protect.*, **53**:804-817.
- Beilei Ge and Jianghong Meng (2009), Advanced technologies for pathogen and toxin detection in foods:current applications and future directions, *JALA*, **14**:235-241.
- Bennett A.R., Greenwood D., Tennant C., Banks J.G., Betts R.P. (1998), Rapid and definitive detection of *Salmonella* in foods by PCR, *Letters in Applied microbiology*, **26**:437-441.
- Berrada H., Soriano J.M., Manes J.(2006), Quantification of *Listeria monocytogenes* in salads by real-time quantitative PCR, *International Journal of food microbiology*, **107**:202-206.
- Besser R.E., Lett S.M., Weber J.T., Doyle M.P., Barrett D.J., Wells J.G., Griffin P.M. (1993), An outbreak of diarrhea and hemolytic uremic syndrome from *E. coli* O157:H7 in fresh processed apple cider, *JAMA*, **269**:2217-2220.
- Beuchat L.R. (1996), *Listeria monocytogenes*:Incidence on vegetables, *Food Control*, **7**:223-228.
- Beverly J., Sellers M.C., Beattie S.E., (2004), Food Safety:Emerging trends in foodborne illness surveillance and prevention, *Journal of the American dietetic association*, **104**:1708-1717.
- Bhagwat A.A. (2003), Simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* strains by real time PCR, *International Journal of food Microbiology*, **84**: 217-224.

- Bibek Ray (2004), Fundamental food microbiology, third edition, USA:CRC Press.
- Blake P.A., Weaver R.E., Hollis D.G. (1980), Diseases of humans (other than cholera) caused by *vibrios*, *Ann. Rev. Microbiol.*, **34**:341-367.
- Boskou G., Salta F.N., Chrysistomou S., Mylona A., Chiou A., Andrikopoulos N.K.(2006), Antioxidant capacity and phenolic profile of table olives from the Greek market, *Food Chemistry*, **94**:558-564.
- Brakstad O.G., Aasbakk K., Maeland J.A. (1992), Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the *nuc* gene, *Journal of Clinical microbiology*, **30**(7):1654-1660.
- Breslow L. (ed.), (2002), Encyclopedia of Public Health, USA:Macmillan Reference.
- Buck P.A. and Werker D.H. (1998), Salmonellosis:no longer just a chicken and egg story, *CMAJ*, **159**(1).
- Byun M.-W., Kwon L.-J., Yook H.-S., Kim K.-S. (1998), Gamma irradiation and ozone treatment for inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in culture media, *J. Food Prot.*, **61**:728-730.
- Caballero B., Trugo L., Finglas P., (eds) (2003), Encyclopedia of food sciences and nutrition, Ten Volume set, Second edition, Academic Press.
- Cardian U. (1995), Polymerase chain reaction in food microbiology, *Journal of microbiological methods*, **23**:89-103.
- Centers for Disease Control and Prevention (1996), *Vibrio vulnificus* infections associated with eating raw oysters-Los Angeles 1996, *Morbidity and Mortality Weekly Report*, **45**:621-624.
- Chiu T.-H., Chen T.-R., Hwang W.-Z., Tsen H.-Y. (2005), Sequencing of an internal transcribed spacer region of 16S-23S rRNA gene and designing of PCR primers for the detection of *Salmonella* spp. in foods, *International Journal of food microbiology*, **97**:259-265.
- Cotter P.D., O'Reily K., Hill C. (2002), Role of the glutamate decarboxylase acid resistance system in the survival of *Listeria monocytogenes* LO28 in low pH foods, *J. Food Prot.*, **64**:1362-1368.
- Devenish J.A., Giebin B.W., Bradsky M.H. (1986), Novobiocin-Brilliant Green-Glucose agar: new medium for isolation of salmonellae, *Applied and Environmental Microbiology*, **52**:539-545.

- Doyle M.E., Mazotta A.S., Wang T. et al. (2002), Heat resistance of *Listeria monocytogenes*, *J. Food Prot.*, **64**:410-429.
- Doyle M.P. and Beuchat L.R.(eds.) (2007), Food microbiology:Fundamentals and Frontiers, third edition, Washington, D.C.:ASM Press.
- Elizaquivel P. and Aznar R. (2008), A multiplex RTi-PCR reaction for simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp. and *Staphylococcus aureus* on fresh minimally processed vegetables, *Food Microbiology*, **25**:705-713.
- Elizaquivel P. and Aznar R. (2008), Comparison of four commercial DNA extraction kits for PCR detection of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* in fresh minimally processed vegetables, *Journal of food Protection*, **71**:2110-2114.
- Enne de Boer and Beumer R.R. (1999), Methodology for detection and typing of foodborne microorganisms, *International Journal of food microbiology*, **50**:119-130.
- Farmer J.J. III, Davis B.R., Hickman-Bremer F.W. et al. (1985), Biochemical identification of new species and biogroups of *Enterobacteriaceae* isolated from clinical specimens, *Journal of Clinical Microbiology*, **21**:46-47.
- Ferreira M.A and Lund B.M. (1987), The influence of pH and temperature on initiation of growth of *Salmonella* spp., *Lett. Appl. Microbiol.*, **5**:67-70.
- Ferretti R., Mannazzu J., Cocolin L., Comi G., Clementi F. (2001), Twelve hour PCR based method for detection of *Salmonella* spp. in food, *Applied and Environmental Microbiology*, **67**:977-978.
- Francis G.A., Thomas C., O'Beirne D. (1999), The microbiological safety of minimally processed vegetables, *International Journal of Food Science and Technology*, **34**:1-22.
- Fratamico P.M. and Strobaugh T.P.(1998), Simultaneous detection of *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* O157:H7 by multiplex PCR, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **21**:92-98.
- Goldman E. and Green L.H. (eds.) (2009), Practical handbook of microbiology, second edition, USA:CRC Press.
- Guerra M., McLauchlin J.,Bernardo F.A. (2001), *Listeria* in ready to eat and unprocessed foods produced in Portugal, *Food Microbiology*, **18**:423-429.
- Guo X., Chen J., Beuchat L.R., Brackett R.E. (2000), PCR detection of *Salmonella enterica* Serotype Montevideo in and on raw tomatoes using primers derived from hliA, *Applied and Environmental microbiology*, **66**:5248-5252.

- Harris L.J. and Griffiths M.W. (1992), The detection of foodborne pathogens by the polymerase chain reaction (PCR), *Food Research International*, **25**:457-469.
- Jay M.J., Loessner M.J., Golden D.A.(2005), Modern food microbiology, seventh edition, New York:Springer Science+ Business Media.
- Jean-Yves D'Aoust (1991), Pathogenicity of foodborne *Salmonella*, *International Journal of food microbiology*, **12**:17-40.
- Jenikova G., Pazlarova J., Demnerova K. (2000), Detection of *Salmonella* in food samples by the combination of immunomagnetic separation and PCR assay, *Internatl. Microbial.*, **3**:225-229.
- Jos H.J. and Huis in't Veld (1996), Microbial and biochemical spoilage of foods:an overview, *International journal of food microbiology*, **33**:1-18.
- Kaferstein F.K., Motarjemi Y., Bettcher D.W. (1997), Foodborne disease control:A transnational challenge, *Emerging Infectious Diseases*, **3**:503-510.
- Kerouanton A., Hennekinne J.A., Letertre C., Petit L., Chesneau O., Brisabois A., De Buyser M.L. (2007), Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning outbreaks in France, *International Journal of food microbiology*, **115**:369-375.
- Lantz P.-J., Hagedal B.H., Radstrom P. (1994), Sample preparation methods in PCR based detection of food pathogens, *Trends in food science and technology*, **5**:384-389.
- Le Loir Y., Baron F., Gautier M. (2003), Staphylococcus aureus and food poisoning, *Genetics and Molecular Research*, **2**:63-76.
- Lee H.-J., Chai L.-C., Tang S.-Y., Jinap S., Ghazali F.M., Nakaguchi Y., Nishibuchi M., Son R. (2009), Application of MPN-PCR in biosafety of *Bacillus cereus* s.l. for ready-to eat cereals, *Food Control*, **20**(11):1068-1071.
- Lin C.-M., Fernando S.Y., Wei C.(1996), Occurrence of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.*, *Escherichia coli* and *E. coli O157:H7* in vegetable salads, *Food Control*, **7**:135-140.
- Little C.L., Rawal N., de Pinna E., McLauchlin J. (2010), Survey of Salmonella contamination of edible nut kernels on retail sale in the U.K, *Food Microbiology*, **27**:171-174.
- Lopez A.L., Gomez F.R., Mendez M.V.R., Delgado A.C., Fernandez A.G. (2009), Sterols, fatty alcohol and triterpenic alcohol changes during ripe table olive processing, *Food Chemistry*, **117**:127-134.

- Lowy F.D. (1998), *Staphylococcus aureus* infections, *The New England Journal of medicine*, **339**:520-535.
- Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J. (2005), Brock Βιολογία των μικροοργανισμών, Ηράκλειο:Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης
- Maner J. (ed.) (2006), PCR methods in foods, New York:Springer science.
- Mao Y., Zhu C., Boedeker E.C. (2003), Foodborne enteric infections, *Current opinion in gastroenterology*, **19**:11-22.
- Μαρκάκης Π. (1996), Στοιχεία τεχνολογίας τροφίμων, Αθήνα:Τρίαινα Εκδοτική.
- McFarland, J. 1907. The nephelometer: an instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index for vaccines. *JAMA* **49**:1176-1178.2.
- Mead P.S., Slutsker L., Dietz V., McCaig L.F., Bresee J.S., Shapiro C., Griffin P.M., Tauxe R.V. (1999), Food-related illness and death in the United States, *Emerging Infectious Diseases*, **5**:607-625.
- Mozola M.A. (2006), Genetics-based methods for detection of *Salmonella* spp. in foods, *Journal of AOAC International*, **89**:517-529.
- Μπλούκας Ι.Γ. (2004), Επεξεργασία και συντήρηση τροφίμων, Αθήνα:Εκδόσεις Σταμούλη Α.Ε.
- Myint M.S., Johnson Y.J., Tablante N.L., Heckert R.A. (2006), The effect of preenrichment protocol on the sensitivity and specificity of PCR for detection of naturally contaminated *Salmonella* in raw poultry compared to conventional culture, *Food microbiology*, **23**:599-604.
- Norrung B., Anderson J.K., Schlundt J. (1999), Incidence and control of *Listeria monocytogenes* in foods in Denmark, *International journal of food microbiology*, **53**:195-203.
- Olsen J.E. (2000), DNA-based methods for detection of foodborne bacterial pathogens, *Food Research International*, **33**:257-266.
- Olsen J.E., Aabo S., Hill W., Notermans S., Wernars K., Granum P.E., Popovic T., Rasmussen H.N., Olsvik (1995), Probes and Polymerase chain reaction for detection of foodborne bacterial pathogens, *International Journal of food microbiology*, **28**:1-78.
- Ordonez-Santos L.E, Vazquez-Oderiz L., Arbones-Macineira E., Romero-Rodriguez M.A.(2009), The influence of storage time on micronutrients in bottled tomato pulp, *Food Chemistry*, **112**:146-149.

- Pathamanathan S.G., Cardona-Castro N., Sanchez-Jimenez M.M., Correa Ochoa M.M., Puthucherry S.D., Thong K.L. (2003), Simple and rapid detection of *Salmonella* strains by direct PCR amplification of the *hlyA* gene, *Journal of Medical Microbiology*, **52**:773-776.
- Παπαναγιώτου Κ.Π. και Δαλαίνα Β.Κ. (2004), Ιατρική μικροβιολογία και ιολογία, 2^η έκδοση, Θεσσαλονίκη: University Studio Press.
- Prasad P. and Vidyarthi A.S. (2009), DNA-based methods used for characterization and detection of foodborne bacterial pathogens with special consideration to recent rapid methods, *African Journal of Biotechnology*, **8**:1768-1775.
- Rahn K., De Grandis S.A., Clarke C., McEwen S.A., Galan J.E., Ginocchio C., Curtiss R., Gyles C.L. (1992), Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method for detection of *Salmonella*, *Molecular and Cellular probes*, **6**:271-279.
- Reddy N.R. and Pierson M.D. (1984), Chemical, nutritional and physiological aspects of dry bean carbohydrates-a review, *Food Chemistry*, **13**:25-68.
- Rijpens N.P. and Herman L.M.F. (2002), Molecular methods for identification and detection of bacterial food pathogens, *Journal of AOAC International*, **85**:984-995.
- Roberts T.A., Pitt J.I., Farkas J., Grau F.H (eds) (1998), Microorganisms in foods-microbial ecology of food commodities, London:Blackie Academic and Professional.
- Robinson R.K., Batt C.A, Patel P.D. (1999), Encyclopedia of food microbiology, Three Volume set, 1st edition, Academic Press.
- Rodriguez L.D. and Hernandez M. (2006), Molecular methodology in food microbiology diagnostics: trends and current challenges, IUFoST World Congress, 13th World Congress of food Science and Technology.
- Sagum R. and Arcot J.(2000), Effect of domestic processing methods on the starch, non starch polysaccharides and in vitro starch and protein digestibility of three varieties of rice with varying levels of amylase, *Food Chemistry*, **70**:107-111.
- Saroj S.D., Shashidhar R., Karani M., Bandekar J.R. (2008), Rapid, sensitive and validated method for detection of *Salmonella* in food by an enrichment broth culture-Nested PCR combination assay, *Molecular and Cellular probes*, **22**:201-206.

- Scheu P.M., Berghof K., Stahl U. (1998), Detection of pathogenic and spoilage microorganisms in food with the polymerase chain reaction, *Food Microbiology*, **15**:13-31.
- Stephen A.M. (ed.) (1995), Food polysaccharides and their applications, USA:Marcel Dekker.
- Thomas L.V., Wimpenny J.W.T., Peters A.C. (1992), Testing multiple variables on the growth of a mixed inoculums of Salmonella strains using gradient plates, *International Journal of food microbiology*, **15**:165-175.
- Tietjen M. and Fung D.Y.C. (1995), Salmonellae and food safety, *Critical Reviews in microbiology*, **21**:53-83.
- Tsen H.-Y. and Chen T.-R. (1992), Use of the polymerase chain reaction for specific detection of type A,D and E enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in foods, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **37**:685-690.
- Unal K. and Nergiz C. (2003), The effect of table olive preparing methods and storage on the composition and nutritive value of olives, *Grasas y Aceites*, **54**:71-76.
- Wallace D.J., Gilder T.V., Shallow S., Fiorentino T., Segler S.D., Smith K.E., Shiferaw B., Etzel R., Garthright W.E., Angulo F.J., FoodNet working group (2000), Incidence of foodborne illnesses reported by the foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet)-1997, *Journal of food protection*, **63**:807-809.
- Wan J., King K., Craven H., McAuley C., Tan S.E., Coventry M.J. (2000), Probelia PCR system for rapid detection of *Salmonella* in milk powder and ricotta cheese, *Letters in Applied microbiology*, **30**:267-271.
- Wang R.-F., Cao W.-W., Cerniglia C.E. (1997), A universal protocol for PCR detection of 13 species of foodborne pathogens in foods, *Journal of Applied microbiology*, **83**:727-736.
- Watson J.D., Candy A.A., Myers R.M., Witkowski J.A. (2007), Ανασυνδυασμένο DNA: Γονίδια και γονιδιώματα-μία συνοπτική παρουσίαση, Τρίτη αγγλική έκδοση, Αλεξ/πολη: Ακαδημαϊκές εκδόσεις Ι. Μπάσδρα & ΣΙΑ Ο.Ε.
- Weeratna R.D. and Doyle M.P. (1991), Detection and production of verotoxin 1 in *Escherichia coli* O157:H7 in food, *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**:2951-2955.
- Wilson C.L. and Droby S. (eds) (2001), Microbial food contamination, USA:CRC Press LLC.

- Wilson I.G., Cooper J.E., Gilmour A. (1991), Detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in dried skimmed milk: use of the polymerase chain reaction for amplification and detection of Staphylococcal enterotoxin genes *entB* and *entC1* and the termonuclease gene *nuc*, *Applied and Environmental microbiology*, **57**:1793-1798.
- Yang Y., Xu-dong S.U., Yao-wu Y., Chu-Yu K., Ying-jun Li, Wei J., Xiao-Ying Z. (2007), Detection of *Staphylococcus aureus* in dairy products by polymerase chain reaction assay, *Agricultural sciences in China*, **6**:857-862.
- Yeon Sun Park Sang Rok Lee, Young Gon Kim (2006), Detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp. , *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in Kimchi by multiplex polymerase chain reaction (mPCR), *The Journal of microbiology*, **44**:92-97.
- Yong Li and Mustapha A. (2004), Simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* and *Shigella* in apple cider and produce by a multiplex PCR, *Journal of food Protection*, **67**:27-33.
- Ζεμπετάκης Γ. και Γδοντέλης Ν.(2006), HACCP από το Η έως το Ρ, Αθήνα: P.I.Publishing.