



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ στην

'ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΥΓΙΕΙΝΗ'

Θέμα Διπλωματικής Εργασίας: Έλεγχος της μικροβιολογικής ποιότητας των κιμάδων του εμπορίου (νωπός, καταψυγμένος, εγχώριος, εισαγωγής) με έμφαση στην αναζήτηση *E-coli* O157 και *Yersinia* spp.

Του μεταπτυχιακού φοιτητή

Παναγιώτη Στυλ. Μείχανετσίδα

Κτηνίατρος, Α.Π.Θ.

Μεταπτυχιακός Τίτλος στη Δημόσια Υγεία, Ε.Σ.Δ.Υ.

Λάρισα, 2012



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ στην

ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΥΓΙΕΙΝΗ

Θέμα Διπλωματικής Εργασίας: Έλεγχος της μικροβιολογικής ποιότητας των κιμάδων του εμπορίου (νωπός, καταψυγμένος, εγχώριος, εισαγωγής) με έμφαση στην αναζήτηση *E-coli* O157 και *Yersinia* spp.

Του μεταπτυχιακού φοιτητή

Παναγιώτη Στυλ. Μείχανετσίδα

Κτηνίατρος, Α.Π.Θ.

Μεταπτυχιακός Τίτλος στη Δημόσια Υγεία, Ε.Σ.Δ.Υ.

Λάρισα, 2012

ΕΠΙΒΛΕΠΟΝΤΕΣ ΚΑΘΗΓΗΤΕΣ

ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ Δ. ΔΑΝΙΗΛΙΔΗΣ

ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΣ ΜΗΝΑΣ

ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ ΓΚΟΒΑΡΗΣ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο κιμάς αποτελεί ένα από το πιο ευπαθή τρόφιμα και συχνά έχει συσχετιστεί με περιστατικά τροφιογενών εξάρσεων/εκρήξεων. Σε ένα κομμάτι κρέατος, οι μικροοργανισμοί ανευρίσκονται κυρίως στην επιφάνειά του, ενώ το εσωτερικό του είναι συνήθως στείρο. Ωστόσο, κατά τη διάρκεια της παρασκευής του κιμά, η επιφάνειά του αυξάνει σημαντικά και οι μικροοργανισμοί, που ήταν σε αυτήν διανέμονται σε όλη τη μάζα του.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε έλεγχος της μικροβιολογικής ποιότητας δειγμάτων κιμά διαφόρων χαρακτηριστικών (νωπός, κατεψυγμένος, εγχώριος, εισαγωγής) που ελήφθησαν τυχαία από καταστήματα λιανικής πώλησης κρέατος (κρεοπωλεία και υπεραγορές τροφίμων-σούπερ μάρκετ). Τα δείγματα εξετάστηκαν τόσο για Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα για τον έλεγχο των γενικών συνθηκών υγιεινής κατά τον τρόπο παρασκευής τους, όσο και για την παρουσία των βακτηρίων *E.coli* O157:H7 και *Yersinia enterocolitica*, που συναντώνται συχνά ως αίτια γαστρεντερικών ασθενειών σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Αρχή Ασφάλειας των Τροφίμων (EFSA).

Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι η Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα των δειγμάτων σε μεγάλο ποσοστό εμφάνιζε αποκλίσεις από τον Κανονισμό (ΕΚ) 2073/2005, όπως έχει τροποποιηθεί και ισχύει. Σε ότι αφορά τα βακτήρια *E.coli* O157:H7 και *Yersinia enterocolitica* δεν ανιχνεύθηκε η παρουσία τους σε κανένα από τα εξήντα δείγματα που ελήφθησαν, γεγονός που συμβαδίζει με το χαμηλό ποσοστό που έχει παρατηρηθεί σε ελληνικές και διεθνείς μελέτες.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	I
ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΠΙΝΑΚΩΝ	II
ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ	III
ΕΙΣΑΓΩΓΗ. ΤΡΟΦΙΜΟΓΕΝΗ ΝΟΣΗΜΑΤΑ	1
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΚΡΕΑΣ-ΚΙΜΑΣ	5
1.1 ΟΡΙΣΜΟΙ	5
1.2 ΘΡΕΠΤΙΚΗ ΑΞΙΑ ΤΟΥ ΚΡΕΑΤΟΣ ΚΑΙ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΟΥ	5
1.3 ΜΙΚΡΟΧΛΩΡΙΔΑ ΤΟΥ ΚΡΕΑΤΟΣ ΚΑΙ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΟΥ	8
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. <i>ESCHERICHIA COLI</i> O157	11
2.1 ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ENTEROBACTERIACEAE	11
2.2 <i>E. COLI</i>	13
2.3 <i>E. COLI</i> O157:H7	13
2.3.1 ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΚΑΙ ΛΟΙΜΟΓΟΝΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ	15
2.3.1.A SHIGA ΤΟΞΙΝΕΣ (STX)	15
2.3.1.B «ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ ΕΞΑΛΕΙΨΗΣ ΤΩΝ ENTEROKYTTARΩΝ» (LLE, LOCUS OF ENTEROCYTE EFFACEMENT)»	16
2.3.1.Γ ΑΛΛΑ ΝΗΣΙΔΙΑ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑΣ (PAI)	17
2.3.1.Δ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑ	18

2.3.2 ΔΕΞΑΜΕΝΕΣ ΤΗΣ <i>E. COLI</i> O157:H7	18
2.3.3 ΤΡΟΠΟΙ ΜΕΤΑΔΟΣΗΣ	19
2.3.3.Α ΤΡΟΦΙΜΟΓΕΝΗΣ ΜΕΤΑΔΟΣΗ	20
2.3.3.Β ΥΔΑΤΟΓΕΝΗΣ ΜΕΤΑΔΟΣΗ	21
2.3.3.Γ ΜΕΤΑΔΟΣΗ ΑΜΕΣΗ ΑΠΟ ΑΝΘΡΩΠΟ ΣΕ ΑΝΘΡΩΠΟ	22
2.3.4 ΔΥΣΜΕΝΕΙΣ ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗ ΥΓΕΙΑ	22
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. <i>YERSINIA</i> SPP	25
3.1 <i>YERSINIA ENTEROCOLITICA</i>	25
3.1.Α ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ <i>YERSINIA ENTEROCOLITICA</i>	27
3.1.Β ΔΕΞΑΜΕΝΕΣ ΤΗΣ <i>Y. ENTEROCOLITICA</i>	29
3.1.Β.Ι ΧΟΙΡΟΙ ΚΑΙ ΧΟΙΡΙΝΟ ΚΡΕΑΣ	29
3.1.Β.ΙΙ ΜΗΡΥΚΑΣΤΙΚΑ ΚΑΙ ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΤΟΥΣ	31
3.1.Β.ΙΙΙ ΠΟΥΛΕΡΙΚΑ	31
3.1.Β.ΙV ΛΑΧΑΝΙΚΑ	32
3.1.Β.ν ΑΛΛΕΣ ΠΗΓΕΣ ΜΟΛΥΝΣΗΣ	32
3.2 ΤΡΟΠΟΙ ΜΕΤΑΔΟΣΗΣ	33
3.3 ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ	34
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	37
4.1 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	37
4.2 ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ	38
4.3 ΑΡΙΘΜΗΣΗ ΟΛΙΚΗΣ ΜΕΣΟΦΙΛΗΣ ΧΛΩΡΙΔΑΣ	39
4.4 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ <i>E. COLI</i> O157:H7	43

4.4.1 ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ ΤΗΣ <i>E. COLI</i> O157:H7	44
4.4.2 ΒΙΟΧΗΜΙΚΗ ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ ΜΕΣΩ ΑΡΙ 20Ε	47
4.4.3 ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΤΗΣ ΤΑΙΝΙΑΣ ΑΡΙ 20Ε	48
4.4.4 ΟΡΟΛΟΓΙΚΗ ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ <i>E. COLI</i> O157	49
4.5 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ <i>YERSINIA ENTEROCOLITICA</i>	50
4.5.1 ΕΞΕΤΑΖΟΜΕΝΗ ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ, ΑΡΧΙΚΗ ΑΡΑΙΩΣΗ ΚΑΙ ΕΜΠΛΟΥΤΙΣΜΟΣ	51
4.5.2 ΣΠΟΡΑ ΣΕ ΣΤΕΡΕΑ ΕΚΛΕΚΤΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ	54
4.5.3 ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ <i>YERSINIA ENTEROCOLITICA</i>	58
4.5.4 ΒΙΟΧΗΜΙΚΗ ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ ΜΕΣΩ ΑΡΙ 20Ε	62
4.5.5 ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΤΗΣ ΤΑΙΝΙΑΣ ΑΡΙ 20Ε	63
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	65
5.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΟΛΙΚΗΣ ΜΕΣΟΦΙΛΗΣ ΧΛΩΡΙΔΑΣ (ΟΜΧ)	66
5.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣ <i>E. COLI</i> O157:H7	69
5.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ <i>YERSINIA ENTEROCOLITICA</i>	69
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ	70
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	74

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τους Επιβλέποντες Καθηγητές της διπλωματικής μου εργασίας κ. Βασίλειο Δ. Δανιηλίδη, κ. Αναστάσιο Μηνά και κ. Αλέξανδρο Γκόβαρη για τη καθοδήγησή τους και τις πολύτιμες συμβουλές τους.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα όλο το προσωπικό του Περιφερικού Εργαστηρίου Δημόσιας Υγείας Λάρισας για τη αμέριστη βοήθειά τους κατά τη πραγματοποίηση του εργαστηριακού τμήματος της διπλωματικής μου εργασίας.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στους γονείς μου για τη συμπαράσταση και στήριξή τους καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΠΙΝΑΚΩΝ

ΠΙΝΑΚΑΣ 1. ΑΡΙΘΜΟΣ ΤΩΝ ΔΗΛΩΘΕΝΤΩΝ ΚΡΟΥΣΜΑΤΩΝ ΤΡΟΦΙΜΟΓΕΝΟΥΣ ΝΟΣΗΜΑΤΟΣ ΣΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΥΠΟΧΡΕΩΤΙΚΗΣ ΔΗΛΩΣΗΣ, ΕΛΛΑΔΑ, 2003- 2010	4
ΠΙΝΑΚΑΣ 2. ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΕΙΔΩΝ ΚΡΕΑΤΟΣ ΣΕ ΑΜΙΝΟΞΕΑ (gr%)	6
ΠΙΝΑΚΑΣ 3. ΜΕΤΑΛΛΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΠΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΝΤΑΙ ΣΤΟ ΚΡΕΑΣ (ΣΕ mg/100g)	7
ΠΙΝΑΚΑΣ 4. ΒΙΟΧΗΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΒΙΟΤΥΠΩΝ <i>YERSINIA ENTEROCOLITICA</i>	26
ΠΙΝΑΚΑΣ 5. ΑΝΑΓΝΩΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΤΗΣ ΤΑΙΝΙΑΣ API 20E ΓΙΑ <i>E. COLI</i>	48
ΠΙΝΑΚΑΣ 6. ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΚΑΙ ΠΑΘΟΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΠΑΘΟΓΟΝΑ ΣΤΕΛΕΧΗ <i>YERSINIA ENTEROCOLITICA</i>	59
ΠΙΝΑΚΑΣ 7. ΒΙΟΧΗΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΕΙΔΩΝ <i>YERSINIA SPP</i>	60
ΠΙΝΑΚΑΣ 8. ΑΝΑΓΝΩΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΤΗΣ ΤΑΙΝΙΑΣ API 20E ΓΙΑ <i>YERSINIA ENTEROCOLITICA</i>	63
ΠΙΝΑΚΑΣ 9. ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΤΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΚΙΜΑ	65
ΠΙΝΑΚΑΣ 10. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕΤΡΗΣΗΣ Ο.Μ.Χ.	67

ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 1. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ <i>E. COLI</i> O157:H7	46
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 2. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ <i>YERSINIA ENTEROCOLITICA</i>	61

ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ

ΓΡΑΦΗΜΑ 1. ΔΙΑΧΡΟΝΙΚΗ ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΟΥ ΑΡΙΘΜΟΥ ΤΩΝ ΔΗΛΩΘΕΙΣΩΝ ΣΥΡΡΟΩΝ ΚΡΟΥΣΜΑΤΩΝ ΤΡΟΦΙΜΟΓΕΝΟΥΣ ΝΟΣΗΜΑΤΟΣ ΑΝΑ ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΚΟ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ, ΣΥΣΤΗΜΑ ΥΠΟΧΡΕΩΤΙΚΗΣ ΔΗΛΩΣΗΣ ΝΟΣΗΜΑΤΩΝ, 2004-2010	4
---	---

Εισαγωγή. Τροφιμογενή Νοσήματα

Η ασφάλεια των τροφίμων αποτελεί ολοένα και πιο σημαντικό θέμα δημόσιας υγείας. Τα τελευταία χρόνια οι κυβερνήσεις σε όλον τον κόσμο εντείνουν τις προσπάθειές τους για τη βελτίωση της δημόσιας υγείας παρά τις δυσκολίες που αντιμετωπίζουν.

Πράγματι, αιτίες όπως η αυξανόμενη αστικοποίηση του πληθυσμού, οι αλλαγές στις διατροφικές συνήθειες, η ανάπτυξη του τουρισμού, η ελεύθερη αγορά ως συνέπεια της παγκοσμιοποίησης και της απελευθέρωσης του παγκόσμιου εμπορίου, νέα τρόφιμα που μπορεί να δημιουργούν νέους κινδύνους, ευνοούν την εμφάνιση τροφιμογενών νοσημάτων, πολλές φορές μάλιστα χιλιόμετρα μακριά από την αρχική πηγή της μόλυνσης (WHO, 2002).

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας με τον όρο «Τροφιμογενές Νόσημα» αναφερόμαστε σε κάθε νόσημα, μολυσματικό ή τοξικό στη φύση του, που προκαλείται από παράγοντες που εισέρχονται στο ανθρώπινο σώμα με την κατανάλωση τροφίμου ή νερού (WHO, Factsheet 237, 2007).

Περισσότερα από 250 τροφιμογενή νοσήματα έχουν περιγραφεί μέχρι σήμερα, με κυριότερες αιτίες βιολογικούς παράγοντες, όπως βακτήρια, ιούς και παράσιτα. (CDC, Foodborne illness, 2005). Σύμφωνα με το Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων των Η.Π.Α. (C.D.C.) τα πιο συχνά εμφανιζόμενα τροφιμογενή νοσήματα οφείλονται στο καμπυλοβακτηρίδιο, στη σαλμονέλλα, στην *Escherichia coli* O157:H7 και σε μία ομάδα ιών που ονομάζεται καλικοϊοί, γνωστοί και ως «Norwalk» και «Norwalk-like» ιοί.

Ειδικότερα, το καμπυλοβακτηρίδιο είναι ένα παθογόνο βακτήριο που προκαλεί πυρετό, κοιλιακές κράμπες και διάρροια. Μάλιστα, αποτελεί το πιο συχνά διαγνωσμένο βακτηριακό αίτιο διαρροϊκής ασθένειας στον κόσμο. Το καμπυλοβακτηρίδιο ζει στο έντερο υγιών πουλιών και συναντάται σε μεγάλο ποσοστό σε ωμό κρέας πουλερικών (ECDC, 2010). Η κατανάλωση ατελώς ψημένου κρέας κοτόπουλου ή άλλων τροφών που έχουν επιμολυνθεί από χυμούς που προέρχονται από ωμό κοτόπουλο αποτελεί την πιο συχνή πηγή της μόλυνσης αυτής.

Η σαλμονέλλα είναι επίσης ένα βακτήριο που συναντάται ευρέως στο έντερο πουλιών, ερπετών και θηλαστικών. Μπορεί να μεταδοθεί στον άνθρωπο μέσω διαφορετικών

τροφίμων ζωικής προέλευσης. Η αρρώστια που προκαλεί περιλαμβάνει κυρίως πυρετό, διάρροια και κοιλιακές κράμπες. Σε άτομα με υποκείμενα προβλήματα υγείας ή σε ανοσοκατεσταλμένα άτομα μπορεί να εισέλθει στο κυκλοφορικό σύστημα και να θέσει σε κίνδυνο ακόμη και την υγεία τους.

Η *E.coli* O157:H7 είναι παθογόνο βακτήριο με δεξαμενή τόσο στις αγελάδες όσο και σε άλλα όμοια ζώα. Συνήθως η μόλυνση προκαλεί σοβαρή αιμορραγική διάρροια και επώδυνες κοιλιακές κράμπες, χωρίς μεγάλη άνοδο της θερμοκρασίας. Σε ένα ποσοστό 3%-5% των περιπτώσεων, μπορεί να εμφανιστεί μια επιπλοκή που είναι γνωστή ως «αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο», που χαρακτηρίζεται από προσωρινή αναιμία, ακατάσχετη αιμορραγία και νεφρική ανεπάρκεια.

Οι καλκοϊοί ή «Norwalk-like» ιοί αποτελούν εξαιρετικά συχνά αίτιο τροφιμογενούς νοσήματος, αν και η διάγνωσή τους είναι σπάνια, διότι η εργαστηριακή μέθοδος δεν είναι ευρέως διαδεδομένη. Προκαλούν οξείες γαστρεντερικές λοιμώξεις που χαρακτηρίζονται περισσότερο από εμέτους παρά διάρροιες, και υποχωρούν μέσα σε δύο ημέρες.

Στην Ευρώπη το καμπυλοβακτηρίδιο αποτελεί τον πιο συχνά διαγνωσμένο παράγοντα γαστρεντερικής ασθένειας με ρυθμό δήλωσης (44,1 ανά 100.000 πληθυσμού το 2008), περίπου όμοιο με τις προηγούμενες χρονιές ενώ το 2009 παρατηρείται μικρή αύξηση στο ποσοστό δήλωσής του (ECDC, 2010, EFSA-ECDC, 2011).

Σε ό,τι αφορά την σαλμονέλλα παρατηρείται μια σταθερή μείωση της σαλμονέλωσης τα τελευταία χρόνια, αν και η σαλμονέλλα εξακολουθεί να αποτελεί το πιο συχνό διαγνωσμένο αίτιο τροφιμογενούς επιδημικής έκρηξης-έξαρσης, με τα αυγά και τα προϊόντα με ωμά αυγά να είναι οι πιο συχνές πηγές τροφίμων σε αυτές τις εξάρσεις (ECDC, 2010).

Το 2009 διαπιστώθηκαν 3.573 επιβεβαιωμένες λοιμώξεις που οφείλονται σε βεροτοξινογόνες *E.coli*. (VTEC) και ο αριθμός των αναφερόμενων VTEC παρουσιάζει μικρή αύξηση. Οι περισσότερες από αυτές τις λοιμώξεις προκλήθηκαν από την *E.coli* O157. Γενικά, ο συνολικός ρυθμός δήλωσης (notification rate) της *E.coli* O157:H7 στην Ευρώπη παρέμεινε σχετικά αμετάβλητος τα τελευταία χρόνια (0,66 περιπτώσεις ανά 100.000 κατοίκους) και εξακολουθεί να είναι αυξημένος στα νεαρά παιδιά. Ο αριθμός των αναφερόμενων περιπτώσεων που εμφάνισαν αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο

παρουσίασε αύξηση της τάξης του 65,8% το 2009 σε σχέση με την προηγούμενη χρονιά. (ECDC, 2010, EFSA- ECDC, 2011).

Σε ό,τι αφορά τους ιούς, και κυρίως τους καλυκοϊούς (συμπεριλαμβανομένων και των νορο-ιών) το ένα τρίτο των περιπτώσεων των τροφιμογενών λοιμώξεων που παρατηρούνται στις ανεπτυγμένες χώρες οφείλεται σε αυτούς. Επίσης, αποτελούν τον δεύτερο αιτιολογικό παράγοντα πρόκλησης τροφιμογενών επιδημικών εξάρσεων μετά την σαλμονέλλα.

Αναφορικά με το βακτήριο της *Yersinia* spp. διαπιστώθηκαν 7.595 επιβεβαιωμένες περιπτώσεις υερσινίωσης στον άνθρωπο το 2009 σύμφωνα με τα στοιχεία της Ευρωπαϊκής Αρχής της Ασφάλειας των Τροφίμων (EFSA), αριθμός που παρουσιάζει σημαντική μείωση τα τελευταία χρόνια, παρόλο που η ασθένεια εξακολουθεί να αποτελεί την τρίτη σε συχνότητα δηλωμένη ζωνόσο στην Ευρώπη. Το βακτήριο της *Y. enterocolitica* είναι το είδος της υερσινίας, που ανιχνεύεται συχνότερα στον άνθρωπο και ανευρίσκεται κυρίως σε χοίρους και τρόφιμα από χοιρινό κρέας (EFSA-ECDC, 2011).

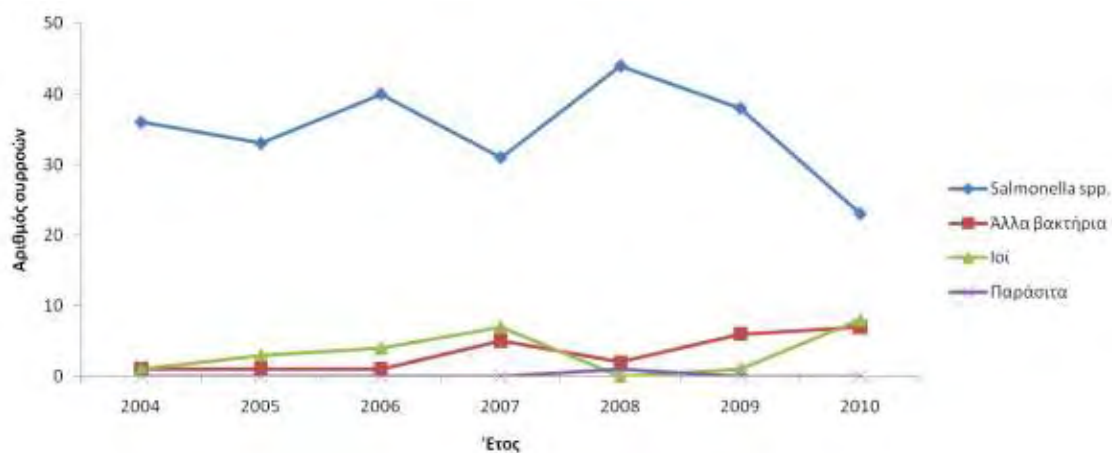
Σύμφωνα με την αναφορά την Ευρωπαϊκής Αρχής της Ασφάλειας των Τροφίμων το 2009 παρατηρήθηκαν 5.500 τροφιμογενείς εξάρσεις στην Ευρωπαϊκή Ένωση, που προκάλεσαν 48.964 ανθρώπινες περιπτώσεις ασθενών, εκ των οποίων οι 4.356 δέχθηκαν νοσοκομειακή περίθαλψη και 26 άνθρωποι έχασαν τη ζωή τους. Οι περισσότερες από τις εξάρσεις προκλήθηκαν από το βακτήριο της σαλμονέλλας, ενώ οι πιο σημαντικές πηγές μόλυνσης ήταν τα αυγά και τα προϊόντα τους, τα γεύματα που παραθέτονται σε μπουφέ, το χοιρινό κρέας και τα προϊόντα του (EFSA-ECDC, 2011).

Σε εθνικό επίπεδο, ο συχνότερος αιτιολογικός παράγοντας έξαρσης τροφιμογενών νοσημάτων για την περίοδο 2004-2010 ήταν το βακτήριο *Salmonella* spp και ακολουθούν οι ιοί και ειδικότερα ο ιός της Ηπατίτιδας Α. Η αύξηση στον αριθμό των δηλωθέντων εξάρσεων ιογενούς αιτιολογίας το 2010 οφείλεται πιθανότατα στη συχνότερη εργαστηριακή τους διάγνωση (Πίνακας 1, Γράφημα 1).

Πίνακας 1. Αριθμός των δηλωθέντων κρουσμάτων τροφιμογενούς νοσήματος στο Σύστημα Υποχρεωτικής Δήλωσης, Ελλάδα, 2003-2010.

Αριθμός δηλωθέντων κρουσμάτων								
Νόσημα	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010
Σαλμονέλλωση (μη τύφο- παρατυφική)	1037	1433	1230	975	731	814	408	300
Ηπατίτιδα Α	77	72	180	131	297	128	88	58
Σιγκέλλωση	16	64	26	30	49	19	37	33
Τυφοειδής πυρετός/ παράτυφος	0	20	19	16	18	11	4	10
Λιστερίωση	1	3	8	7	10	1	4	9
Λοίμωξη ΕΗΕC*	2	2	0	1	1	0	0	1
Τριχίνωση	0	0	0	0	0	0	2	4
Αλλαντίαση	0	0	0	0	0	0	0	0
Χολέρα	0	0	0	0	0	0	0	0

* Λοίμωξη από εντεροαμμορραγικό κολοβακτηρίδιο



Γράφημα 1. Διαχρονική εξέλιξη του αριθμού των δηλωθεισών συρροών κρουσμάτων τροφιμογενούς νοσήματος ανά αιτιολογικό παράγοντα στην Ελλάδα, σύστημα Υποχρεωτικής Δήλωσης Νοσημάτων, 2004-2010.

Κεφάλαιο 1. Κρέας-Κιμάς

1.1 Ορισμοί

Σύμφωνα με τον Κανονισμό της Ευρωπαϊκής Ένωσης 853/2004 που είναι σε ισχύ από το έτος 2006 :

«Κρέας» ονομάζονται τα εδώδιμα μέρη των κατοικίδιων σπληφόρων, των πουλερικών, των λαγόμορφων, των άγριων θηραμάτων, των εκτρεφόμενων θηραμάτων, των μικρών και των μεγάλων άγριων θηραμάτων, συμπεριλαμβανομένου του αίματος.

«Νωπό κρέας»: ονομάζεται το κρέας το οποίο δεν έχει υποστεί καμία άλλη επεξεργασία συντήρησης εκτός από την ψύξη, την κατάψυξη ή την ταχεία κατάψυξη, συμπεριλαμβανομένου του κρέατος που είναι συσκευασμένο σε κενό αέρος ή σε ελεγχόμενη ατμόσφαιρα

«Κιμάς»: το κρέας χωρίς οστά το οποίο έχει υποστεί άλεσμα σε τεμάχια και περιέχει αλάτι σε ποσοστό μικρότερο του 1 %.

1.2 Θρεπτική αξία του κρέατος και των προϊόντων του

Η διατροφική αξία του κρέατος είναι αρκετά υψηλή, διότι περιέχει μια σειρά θρεπτικών στοιχείων, που είναι απαραίτητα για τον άνθρωπο. Σε ένα κομμάτι κρέας συναντάμε τα παρακάτω συστατικά κατά σειρά μειούμενης περιεκτικότητας: νερό, πρωτεΐνες, λίπος, υδατάνθρακες, ιχνοστοιχεία και βιταμίνες. (Varrnam and Sutherland, 1999).

Η συγκέντρωση του νερού στο γραμμωτό μυϊκό ιστό ποικίλει από 70% έως 80% . Η ικανότητα συγκράτησης ύδατος (I.S.Y.) είναι σημαντική, διότι η μείωσή της επιφέρει μείωση του βάρους του κρέατος, μη ελκυστική εμφάνιση προς τον καταναλωτή, απώλεια υδατοδιαλυτών βιταμινών και δημιουργεί προβλήματα στη μηχανική αντοχή του (Τσακαλίδου, 2001)

Παράλληλα, το κρέας θεωρείται μια πλούσια πηγή σε αζωτούχες ενώσεις. Απ' αυτές το 95% είναι πρωτεΐνες και το 5% ολιγοπεπτίδια, αμινοξέα και άλλα συστατικά. Οι πρωτεΐνες αυτές είναι εξαιρετικής σημασίας και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη διατροφή του ανθρώπου. Πράγματι, η ζωική προέλευσή τους τις καθιστά αναντικατάστατες κυρίως λόγω της περιεκτικότητάς τους σε απαραίτητα αμινοξέα. Το ποσοστό των απαραίτητων αμινοξέων, δηλαδή των αμινοξέων που δεν μπορεί να συνθέσει ο ανθρώπινος οργανισμός, είναι ικανοποιητικό, γεγονός που καθιστά τις πρωτεΐνες του κρέατος και των προϊόντων του υψηλής βιολογικής αξίας (Varnam and Sutherland, 1999, Γεωργάκης και συν., 2000).

Πίνακας 2. Περιεκτικότητα των πρωτεϊνών διαφόρων ειδών κρέατος σε αμινοξέα (gr %)

<i>Αμινοξέα</i>	<i>Κρέας βοοειδών</i>	<i>Κρέας χοίρων</i>	<i>Κρέας Προβάτων</i>
Ιστιδίνη	2,9	3,2	2,7
Ισολευκίνη	5,1	4,9	4,8
Λευκίνη	8,4	7,5	7,4
Λυσίνη	8,4	7,8	7,6
Μεθειονίνη	2,3	2,5	2,6
Φαινυλαλανίνη	4,0	4,1	3,9
Θρεονίνη	4,0	5,1	4,3
Βαλίνη	5,7	5,0	5,0

Πηγή :Niinivaara und Antila, 1972, Anonym, (1988)

Το ζωϊκό λίπος θεωρείται υψηλής βιολογικής αξίας, καθώς παρέχει το απαραίτητο για τον άνθρωπο λιπολεϊκό οξύ, μεταφέρει τις λιποδιαλυτές βιταμίνες (A,D,K,E) και προφυλάσσει τον ανθρώπινο οργανισμό, παρέχοντάς του ενέργεια σημαντικά μεγαλύτερη από την αντίστοιχη των υδατανθράκων και των πρωτεϊνών (το λίπος προσδίδει 2,25 φορές παραπάνω ενέργεια από ό,τι οι υδατάνθρακες και οι πρωτεΐνες. Στο μυϊκό ιστό το λίπος βρίσκεται είτε μέσα στα κύτταρα και στη κυτταρική μεμβράνη υπό μορφή λεπτών σταγονιδίων (ενδοκυτταρικό λίπος) είτε μεταξύ των κυττάρων (ενδομυϊκό λίπος). Η χοληστερόλη και τα κορεσμένα λιπαρά συστατικά του κρέατος έχουν και τα δύο συσχετιστεί με καρδιακές παθήσεις. Η περιεκτικότητα του άπαχου κρέατος σε χοληστερόλη δεν είναι υψηλή (65-70 mg/100gr), αλλά η κατανάλωση

μεγάλων ποσοτήτων οδηγεί σε μεγάλες τιμές (Romans et al.2001, Varnam and Sutherland, 1999).

Το κρέας και τα προϊόντα του αποτελούν καλή πηγή σιδήρου, ψευδαργύρου και φωσφόρου (Ascherio et al., 1996, Varnam and Sutherland,1999, Romans et al.2001). Σελήνιο, χαλκός, ασβέστιο, μαγνήσιο και άλλα ιχνοστοιχεία είναι επίσης παρόντα στο κρέας (Πίνακας 3). Τα ανόργανα συστατικά αποθηκεύονται κυρίως στο μυϊκό ιστό ενώ οι συγκεντρώσεις τους είναι χαμηλές στα λιπαρά τμήματα του ζώου (Γεωργάκης, 2005).

Πίνακας 3. Μεταλλικά στοιχεία που περιέχονται στο κρέας (σε mg/100gr)

Στοιχεία	Περιεκτικότητα (σε mg/100gr)	Σ.Η.Δ.% *
Ασβέστιο	5-7	0,6-0,8
Μαγνήσιο	10-30	2,7-8,1
Σίδηρος	10-200	72-1440
Φώσφορος	100	14,4
Ψευδάργυρος	3-5	30-50
Χαλκός	0,25-0,43	25-43

*Συνιστώμενη Ημερήσια Δόση

Πηγή : Judge 1975, Bowers et al., 1991,

Σε ό,τι αφορά τις βιταμίνες το κρέας αποτελεί εξαιρετική πηγή βιταμινών του συμπλέγματος Β, ιδίως θειαμίνης, ριβοφλαβίνης, νιασίνης, Β6 και Β12. Η περιεκτικότητα σε λιποδιαλυτές βιταμίνες εξαρτάται από τη διατροφή του ζώου. Από τις λιποδιαλυτές βιταμίνες, η βιταμίνη Α παρουσιάζει τη μεγαλύτερη συγκέντρωση ενώ όταν τα ζώα τρέφονται με τροφές πλούσιες σε τοκοφερόλη τα επίπεδα της βιταμίνης Ε είναι υψηλότερα, με αποτέλεσμα να διατηρείται ο ανοικτός ξανθός χρωματισμός του κρέατος για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα λόγω της αντιοξειδωτικής της δράσης (Varnam and Sutherland,1999, Γεωργάκης και συνεργάτες ,2000),.

1.3 Μικροχλωρίδα του κρέατος και των προϊόντων του

Το νωπό κρέας είναι ένα ευπαθές προϊόν για τους παρακάτω λόγους:

- Η τιμή του pH κυμαίνεται από 5,0 έως 7,0 και επιτρέπει την ανάπτυξη των περισσότερων μικροοργανισμών.
- Περιέχει αφθονία θρεπτικών συστατικών που είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη των βακτηρίων, των ζυμών και των μυκήτων.
- Έχει μεγάλη περιεκτικότητα σε υγρασία που αντιστοιχεί σε μια τιμή ενεργότητας ύδατος (a_w) περίπου 0,99, η οποία είναι ευνοϊκή για την ανάπτυξη των περισσότερων μικροοργανισμών.

Ωστόσο, στα υγιή ζώα οι μικροοργανισμοί εντοπίζονται μόνο στον εντερικό σωλήνα και στις επιφάνειες του ζώου που εκτίθενται στο περιβάλλον, όπως δέρμα και τρίχωμα (Gill, 1998, Koutsoumanis and Sofos, 2005). Μετά όμως τη σφαγή, οι μηχανισμοί άμυνας καταρρέουν, με αποτέλεσμα η μίανση του κρέατος να είναι αναπόφευκτη. Το περιβάλλον του χώρου σφαγής, επεξεργασίας και συσκευασίας αποτελεί την κυριότερη πηγή μίανσης του φρέσκου κρέατος. Πιο συγκεκριμένα, ο εντερικός σωλήνας, το δέρμα και το τρίχωμα των ζώων, τα κόπρανα, το νερό που χρησιμοποιείται για το ξέπλυμα των σφάγιων, ο εξοπλισμός που χρησιμοποιείται κατά τη σφαγή και την επεξεργασία του κρέατος αλλά και τα χέρια και ρούχα των εργατών διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην μίανση του κρέατος (Gill, 1998, Koutsoumanis and Sofos, 2005).

Η αρχική μικροχλωρίδα του κρέατος, τη στιγμή της σφαγής, αποτελείται πρωταρχικά από μεσόφιλα μικρόβια που δεν μπορούν να ανταγωνιστούν την ψύξη. Κατά τη διάρκεια της ψύξης, παρατηρείται μια μετατόπιση της σύστασης της αρχικής μικροχλωρίδας προς τους ψυχότροφους μικροοργανισμούς. Το αρχικό μικροβιακό φορτίο κυμαίνεται από 10^2 έως 10^5 cfu/cm², με μόνο ένα 10% του μικροβιακού πληθυσμού να μπορεί να αναπτυχθεί σε συνθήκες ψύξης (Garcia-Lopez, Otero, 1998). Τις πρώτες τέσσερις ώρες παρατηρείται αφυδάτωση στην επιφάνεια του κρέατος, γεγονός που μειώνει την τιμή της ενεργότητας του νερού (a_w) και καθιστά αδύνατη την ανάπτυξη μικροβίων όπως οι ψευδομονάδες. Ωστόσο, τις πρώτες 24 ώρες, το παραπάνω φαινόμενο εξισορροπείται από τη διάχυση νερού από την εσωτερική επιφάνεια του

κρέατος. Ζύμες, όπως π.χ. η *Candida* spp. αλλά και πολλοί άλλοι μύκητες μολύνουν την επιφάνεια του κρέατος (Garcia-Lopez et al., 1998).

Καθώς η θερμοκρασία του σφάγιου εξισορροπείται, οι ψυχρότροφοι μικροοργανισμοί αρχίζουν να κυριαρχούν. Η κυρίαρχη μικροχλωρίδα του κρέατος που διατηρείται σε αερόβιες συνθήκες ψύξης αποτελείται από την *Pseudomonas* spp., *Moraxella* spp., *Psychrobacter* spp. και *Acinetobacter* spp (ICMSF, 1998a).

Οι ψευδομονάδες μεταβολίζουν κατά προτίμηση τη γλυκόζη και παράγουν προϊόντα μεταβολισμού που δεν επηρεάζουν σημαντικά τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του κρέατος. Όταν όμως καταναλωθεί όλη η γλυκόζη από τα μικρόβια, οι ψευδομονάδες αρχίζουν να μεταβολίζουν αμινοξέα (κυστίνη, κυστεΐνη, και μεθειονίνη) και πρωτεΐνες με αποτέλεσμα το σχηματισμό αμμωνίας, αμινών και σουλφιδίων και οδηγούν σε δυσάρεστες οσμές και τελικά σε αλλοίωση του κρέατος (Gill and Newton, 1977). Επιπροσθέτως, ένα σημαντικά μεγάλο ποσοστό των ψευδομονάδων είναι ικανό να παράγει εξωκυτταρικές πρωτεΐνες όπως λιπάσες, προκαλώντας έτσι την αλλοίωση του κρέατος με χαρακτηριστικά όπως γλοιώδη επιφάνεια κρέατος, παραγωγή δυσάρεστων οσμών και μερική ή ολική υποβάθμιση του ζωικού ιστού (Liao, 2006)

Άλλες ομάδες βακτηρίων που εμπλέκονται στην αερόβια αλλοίωση του κρέατος είναι οι *Acinetobacter* spp., *Psychrobacter* spp. και *Moraxella* spp.. Τα παραπάνω αυστηρά αερόβια μικρόβια συναντώνται συχνά σε κρέατα με υψηλό pH (>5,8) ή κατά την αποθήκευσή του σε συνθήκες περιβάλλοντος. Σε αντίθεση με τις ψευδομονάδες, τα περισσότερα από αυτά καταναλώνουν άμεσα τα αμινοξέα και δεν μεταβολίζουν εξόνες.

Οι προαιρετικά αναερόβιοι, Gram αρνητικοί, μικροοργανισμοί που ανήκουν στην οικογένεια Enterobacteriaceae παρατηρούνται ευρέως στη φύση και στο περιβάλλον, οπότε είναι αναπόφευκτη η είσοδος ορισμένων μελών αυτής της οικογένειας στην τροφική αλυσίδα και κατ' επέκταση δυνητικά να προκαλέσουν τροφιμογενή νοσήματα. Οι πιο σημαντικοί εκπρόσωποι της οικογένειας Enterobacteriaceae είναι η *Serratia liquefaciens*, η *Hafnia alvei* και το *Enterobacter (Pantoea) agglomerans* (Samelis 2006). Οι μικροοργανισμοί της οικογένειας Enterobacteriaceae μεταβολίζουν κατά προτίμηση τη γλυκόζη και στη συνέχεια τα αμινοξέα. Ειδικότερα, η *Serratia liquefaciens* και η *Hafnia alvei* παράγουν δυσάρεστες διαμίνες (πουτρεσκίνη και καδαβερίνη), ενώ η ανάπτυξη των δύο παραπάνω μικροοργανισμών προκαλεί πράσινη δυσχρωμία στο κρέας (Stanbridge and Davies 1998). Ωστόσο, ο μικρός ρυθμός ανάπτυξης των

εντεροβακτηρίων σε χαμηλές θερμοκρασίες αποτρέπει συνήθως την επικράτησή τους στο κρέας που αποθηκεύεται υπό ψύξη (Gill and Newton, 1977).

Ο *Brochothrix thermosphacta* αποτελεί και αυτός ένα δευτερεύον μέλος της μικροχλωρίδας που προκαλεί αλλοιώσεις του κρέατος σε αερόβιες συνθήκες. Πρόκειται για Gram θετικό βακτήριο, προαιρετικά αναερόβιο που συναντάται συχνά σε νερό ή χώμα και αποτελεί συχνό κάτοικο του εντερικού σωλήνα των ζώων καθότι έχει απομονωθεί από μεγάλη ποικιλία κρεάτων, όπως πρόβειο, χοίρειο και βοδινό (Betts 2006). Οι αλλοιώσεις που προκαλεί οφείλονται κυρίως στην παραγωγή βουτυρικού και οξικού οξέος, ακετόνης, αλκοόλης και λιπαρών οξέων και επιφέρουν την παραγωγή δυσάρεστων οσμών (Betts 2006, Samelis 2006). Οι παραπάνω ουσίες παράγονται μόνο κατά τον αερόβιο μεταβολισμό, ενώ ο αναερόβιος μεταβολισμός οδηγεί στο σχηματισμό κυρίως γαλακτικού οξέος.

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια είναι μια ετερογενής ομάδα Gram θετικών μικροοργανισμών, που είναι προαιρετικά αναερόβια και παράγουν γαλακτικό οξύ ως κύριο προϊόν της ζύμωσης της γλυκόζης (Stanbridge and Davies, 1998). Από τα παραπάνω βακτήρια, αυτά που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αλλοίωση κρεάτων που συντηρούνται σε συνθήκες ψύξης είναι τα *Lactobacillus* spp., *Carnobacterium* spp. και *Leuconostoc* spp. Γενικά, δεν παράγουν δύσοσμες ουσίες πλην μερικών εξαιρέσεων (Dainty and Mackey 1992).

Σε ό,τι αφορά τον κιμά είναι γνωστό ότι η διάρκεια διατήρησής του επηρεάζεται από την μικροβιολογική ποιότητα του τεμαχίου κρέατος από το οποίο προήλθε. Ειδικότερα, ο κιμάς τείνει να έχει μικρότερη διάρκεια διατήρησης, διότι, συγκεκριμένες επεξεργασίες (π.χ. άλεσμα) αυξάνουν την μόλυνσή του, με την εξάπλωση σε όλη τη μάζα του, των υπαρχόντων μολυντών που εντοπίζονται στην επιφάνειά του. Η πρωταρχική μικροχλωρίδα που προκαλεί αλλοιώσεις στον κιμά αποτελείται κυρίως από ψευδομονάδες και ψυχροτροπικά Enterobacteriaceae. Τα παραπάνω βακτήρια είναι υπεύθυνα για την αλλοίωσή του, γιατί έχουν την ικανότητα να μεταβολίζουν συστατικά του κρέατος, αναπτύσσονται καλά σε εύρος pH 5,5-7,0 και είναι καλοί ανταγωνιστές έναντι των άλλων βακτηρίων (Doyle, Beauchat, and Montville, 2007).

Κεφάλαιο 2. *Escherichia coli* O157

2.1 Οικογένεια Enterobacteriaceae

Μια μεγάλη οικογένεια Gram-αρνητικών βακτηρίων που παρουσιάζει σημαντικό βαθμό συγγένειας είναι η οικογένεια Enterobacteriaceae. Αν και πολλά μέλη της οικογένειας κατοικούν σε έδαφος, σε νερό και σε αποσυνθετική ύλη, ωστόσο συναντώνται συχνά και στο παχύ έντερο τόσο ανθρώπων όσο και ζώων. Όλα τα μέλη είναι μικρά σε μέγεθος (κυρίως από 1μm έως 2-3μm), μη σπορογόντοι, ραβδόμορφοι σχηματισμοί. Αναπτύσσονται καλύτερα σε παρουσία αέρα και μπορούν να ζυμώσουν υδατάνθρακες ακολουθώντας μια αναερόβια οδό. Η παραπάνω ομάδα θεωρείται η πιο συχνά απομονούμενη σε κλινικά δείγματα τόσο ως μικροχλωρίδα όσο και ως παράγοντας νόσων (Foundations in Microbiology, 2011).

Η οικογένεια των Εντεροβακτηριοειδών (Enterobacteriaceae) διακρίνεται σε δύο υποκατηγορίες : α) τα Κολοβακτηριοειδή (Coliforms), που περιλαμβάνουν τόσο την *Escherichia coli* όσο και άλλα Gram-αρνητικά βακτήρια (μέλη της φυσιολογικής μικροχλωρίδας, που προκαλούν γρήγορη ζύμωση της γλυκόζης (εντός 48 ωρών) και β) τα μη Κολοβακτηριοειδή (Non-coliforms), που αποτελούνται από βακτήρια που δεν ζυμώνουν τη γλυκόζη ή τη ζυμώνουν αργά και μπορεί να ανήκουν τόσο στη φυσιολογική μικροχλωρίδα όσο και σε παθογόνα. Παραδείγματα των παραπάνω κατηγοριών αποτελούν για τα Coliforms το *E.coli*, η *Klebsiella* spp., το *Enterobacter* spp., η *Hafnia* spp., η *Serratia* spp., το *Citrobacter* spp. και για τα Non-Coliforms η *Morganella* spp., η *Edwardsiella* spp. , ο *Proteus* spp. , η *Providencia* spp. .

2.2 *E.coli*

Το βακτήριο της *E.coli*, πήρε το όνομά του από τον Γερμανό ιατρό Theodor Escherich και παρόλο που είναι γνωστό και ως Βάκιλλος του παχέος εντέρου και συχνά συναντάται στο έντερο των ανθρώπων, ωστόσο μειοψηφεί έναντι των αυστηρά

αναερόβιων βακτηρίων του εντέρου (*Bacteroides* και *Bifidobacterium*), που δεν καλλιεργούνται εύκολα. Η παρουσία στα κλινικά δείγματα οφείλεται στο γεγονός ότι αποτελεί το πιο κοινό αερόβιο, μη απαιτητικό βακτήριο του εντέρου. Ακόμη και αν η παρουσία του στο έντερο θεωρείται συμβιωτική, στην πραγματικότητα δεν είναι καθόλου ακίνδυνο.

Πάνω από 700 ορότυποι της *E.coli* έχουν αναγνωρισθεί. Τα περισσότερα στελέχη είναι ακίνδυνα. Ωστόσο, τα παθογόνα στελέχη διακρίνονται στις παρακάτω κατηγορίες :

1. Τα Εντεροτοξινογόνα στελέχη της *E.coli* που προκαλούν σοβαρές διαρροϊκές ασθένειες μέσω της παραγωγής δύο εξωτοξινών, μιας θερμοανθεκτικής και μιας θερμοευαίσθητης τοξίνης, που αυξάνουν την απώλεια υγρών και διεγείρουν την αυξημένη έκκριση. Με τον τρόπο αυτό μοιάζουν να μιμούνται την παθογένεση της χολέρας και ο ορότυπος αυτός χαρακτηρίζεται από προσάρτημα που παρέχει πρόσφυση στο βλεννογόνο του λεπτού εντέρου.
2. Τα Εντεροδιεισδυτικά στελέχη της *E.coli* που προκαλούν φλεγμονώδη νόσο παρόμοια με αυτή που προκαλεί η *Shigella dysenteriae*, και επιφέρουν εischώρηση και εξέλκωση του βλεννογόνου του παχέος εντέρου.
3. Τα Εντεροπαθογόνα στελέχη, που σχετίζονται με βρεφική διάρροια, η παθογένεση της οποίας δεν έχει γίνει ακόμα απόλυτα κατανοητή.
4. Τα Εντεροαιμορραγικά στελέχη (EHEC) της *E.coli*, που προκαλούν αιμορραγική κολίτιδα και μπορούν να οδηγήσουν σε αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο (HUS), που μπορεί να καταλήξει σε σοβαρές βλάβες στα νεφρά (Foundations in Microbiology, 2011). Τα στελέχη αυτής της κατηγορίας μπορούν να αναπτυχθούν σε εύρος θερμοκρασιών από 7°C έως 50°C, με βέλτιστη την θερμοκρασία των 37° C. Ορισμένα στελέχη αναπτύσσονται σε όξινα τρόφιμα με pH 4,4 και με ελάχιστη ενεργότητα νερού (a_w) 0,95. Τα στελέχη της κατηγορίας αυτής καταστρέφονται με σχολαστικό ψήσιμο των τροφών (θερμοκρασία 70°C ή μεγαλύτερη στο κέντρο της μάζας). Η *E.coli* O157:H7 είναι ο πιο σημαντικός ορότυπος της κατηγορίας αυτής και σχετίζεται με τη δημόσια υγεία (WHO, 2005).

2.3 *E.coli* O157:H7

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω περισσότεροι από 700 ορότυποι του βακτηρίου *E.coli* έχουν ήδη αναγνωριστεί. Τα Gram-αρνητικά βακτήρια έχουν στην επιφάνειά τους πολύπλοκα αντιγόνα, που είναι σημαντικά για την παθογένειά τους αλλά αποτελούν και τη βάση των ανοσολογικών αντιδράσεων. Τα «Ο», τα «Η» και «Κ» αντιγόνα στο σώμα τους και στις βλεφαρίδες διακρίνουν τους διαφορετικού ορότυπους. Ειδικότερα, το γράμμα «Ο» αναφέρεται στο σωματικό αντιγόνο, το «Η» στο βλεφαριδικό αντιγόνο, ενώ το «Κ» στο αντιγόνο της κάψας (Wikipedia, http://en.wikipedia.org/wiki/Escherichia_coli).

Οι ορότυποι της *E.coli*, που είναι υπεύθυνοι για πάρα πολλές εξάρσεις, που συνδέθηκαν με κατανάλωση μολυσμένων τροφίμων, είναι αυτοί που παράγουν τη Shiga τοξίνη (Stx). Η τοξίνη αυτή πήρε το όνομά της από την τοξίνη που παράγει η *Shigella dysenteriae* τύπος 1, διότι προκαλεί ίδια περίπου συμπτώματα. Για την ίδια Stx τοξίνη έχει επικρατήσει μία ακόμα ονομασία, αυτή της βεροτοξίνης (VT) λόγω της ικανότητάς της να επιφέρει ανεπανόρθωτη παθογόνα δράση στα βερο-κύτταρα (Vero-cells). Η πιο σημαντική και παγκόσμια γνωστή *E.coli* που παράγει Shiga τοξίνη είναι η *E.coli* O157:H7 (VTEC/STEC/EHEC), αν και τα τελευταία χρόνια λοιμώξεις έχουν παρατηρηθεί και από άλλους ορότυπους εκτός του O157, όπως από O26, O111, O103, O145 κ.ά.

Η *E.coli* O157:H7 αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά ως παθογόνο μικρόβιο το 1982, κατά τη διάρκεια έξαρσης μη συνηθισμένων γαστρεντερικών ασθενειών στις Η.Π.Α.. Η έξαρση αποδείχθηκε ότι προκλήθηκε από την κατανάλωση μολυσμένων μπιφτεκιών (hamburgers) και ο αιτιολογικός παράγοντας αναγνωρίστηκε ότι ήταν ένας σπάνιος ορότυπος της *E.coli*, η *E.coli* O157:H7. Ο ορότυπος αυτός είχε άλλη μία φορά απομονωθεί από έναν άρρωστο ασθενή το 1975 (Riley et al, 1983).

Τα επόμενα δέκα χρόνια μετά το 1982, περίπου 30 εξάρσεις που οφείλονταν στο βακτήριο *E.coli* O157:H7 καταγράφηκαν στις Η.Π.Α. (Griffin and Tauxe, 1991). Ο πραγματικός αριθμός των περιστατικών είναι πιθανόν πολύ μεγαλύτερος διότι η καταγραφή των λοιμώξεων από την *E.coli* O157:H7 δεν έγινε υποχρεωτική παρά μετά το 1987. Το Κέντρο Ελέγχου Πρόληψης Νοσημάτων (C.D.C.) των Η.Π.Α. έχει

υπολογίσει ότι το 85% των λοιμώξεων από *E.coli* O157:H7 έχουν τροφιμογενή προέλευση (Mead, et al.,1999). Το έτος 2008, από τις 36 τροφιμογενείς εξάρσεις που προκλήθηκαν στις Η.Π.Α. από το STEC, οι 35 οφείλονταν στο βακτήριο της *E.coli* O157, αριθμός τρεις φορές μεγαλύτερος από τον στόχο που είχε τεθεί με το Πρόγραμμα « Healthy People 2010» (C.D.C., 2011), ενώ το 2010 παρατηρήθηκαν 77 εξάρσεις λοιμώξεων από STEC O157. Ωστόσο, η επίπτωση της λοίμωξης από STEC O157 μειώθηκε στα επίπεδα του εθνικού στόχου που είχε τεθεί (≤ 1 περίπτωση ανά 100.000 κατοίκους) (C.D.C. internet site <http://www.cdc.gov/mmwr>).

Στην Ευρώπη, το 2008, 3210 επιβεβαιωμένα περιστατικά λοιμώξεων από βεροτοξινογόνα στελέχη *E.coli* αναφέρθηκαν από τα 27 κράτη-μέλη και χώρες της Ευρωπαϊκής Οικονομικής Περιοχής. Το γενικό ποσοστό ήταν 0,66 περιπτώσεις ανά 100.000 κατοίκους, ποσοστό που παρέμεινε στα ίδια με τα προηγούμενα χρόνια επίπεδα. Το μεγαλύτερο ποσοστό παρατηρήθηκε στα παιδιά κάτω των 5 ετών με 4,72 περιπτώσεις ανά 100.000 κατοίκους, ενώ ο αριθμός των περιστατικών που ανέπτυξαν αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο αυξήθηκε κατά 42% το 2008 σε σχέση με το 2007. Ο ορότυπος O157 συνδέθηκε με τις περισσότερες από τις επιβεβαιωμένες περιπτώσεις του 2008 και οι πηγές της λοίμωξης που σχετίστηκαν με τις εξάρσεις αυτές ήταν η κατανάλωση ωμών προϊόντων βόειου κρέατος (π.χ. κιμάς) και γάλα (Greenland et al. 2009, EFSA, 2010).

Το βακτήριο *E.coli* O157:H7 είναι αισθητά διαφορετικό από τα άλλα παθογόνα στελέχη της *E.coli*. Ειδικότερα, είναι αρνητικό για εισχώρηση (δοκιμή sereny), προσκολλάται μέσω της Κοινού Ινιδίου (ECP, *E. coli* Common Pillus) (Rendón, et al., 2007) και δεν προκαλεί αιμόλυση. Επιπλέον, είναι σορβιτόλη αρνητικό ενώ το 93% του συνόλου των στελεχών της *E.coli* ζυμώνουν την σορβιτόλη (Wells, Davis, et al,1983). Η *E.coli* O157:H7 στερείται της ικανότητας υδρόλυσης της β-γλυκουρονιδάσης και δεν αναπτύσσεται στους 45°C, με την παρουσία 0,15% χολικών αλάτων (Doyle and Schoeni, 1984).

2.3.1 Παθογένεια και λοιμογόντοι παράγοντες

2.3.1.α Shiga τοξίνες (Stx)

Θεωρούνται ο πιο σημαντικός λοιμογόνος παράγοντας των EHEC και αποτελούν μια οικογένεια βεροτοξινών με παρόμοια βιολογική δραστηριότητα και δομική συγγένεια. Υπάρχουν δύο κυρίως τύποι Shiga-τοξινών: Η Shiga-τοξίνη 1 (stx1), που είναι σχεδόν όμοια με την τοξίνη της *S. dysenteriae* τύπος 1, και η Shiga-τοξίνη 2(stx2) που έχει το μέγιστο 40% την ίδια αλληλουχία των αμινοξέων της stx1 (Melton-Celsa et al., 1998). Η stx1 έχει μεγαλύτερη ομοιότητα με την τοξίνη Shiga, αφού επίσης αποτελείται από τις A (μοριακό βάρος 32 kDa) και B (μοριακό βάρος 7,7kDa) υποομάδες και οι ομάδες B είναι δομικά ίδιες μεταξύ των δύο τοξινών. Οι ομάδες B προσκολλώνται στο δέκτη γλυκολιπιδίων Gb3 στην επιφάνεια των ευκαρυωτικών κυττάρων και η τοξίνη εισέρχεται εντός του κυττάρου με ενδοκύτωση και την υποομάδα A ενεργοποιημένη. Υδρολύει στη συνέχεια τον N-γλυκοσιδικό δεσμό μιας συγκεκριμένης αδενοσίνης στο 28S Rna με αποτέλεσμα την παύση της πρωτεϊνικής σύνθεσης στο κύτταρο.

Η γενετική πληροφορία για την παραγωγή και των δύο τοξινών εντοπίζεται στο γονιδίωμα του λαμβδοειδή προφάγου που είναι ενσωματωμένο στο χρωμόσωμα του STEC/EHEC και ενώ η stx1 εμφανίζει μικρές παραλλαγές αλληλουχίας, για την stx2 έχουν περιγραφεί διάφορες παραλλαγές με διαφοροποιημένα αντιγονικά ή βιολογικά χαρακτηριστικά όπως stx2c, stx2d, stx2e, stx2f (Scheutz et al., 2001, Melton-Celsa et al., 1998). Ένα στέλεχος EHEC μπορεί να εκφράσει μόνο την stx1, μόνο την stx2 και τις ή και τις δύο μαζί ή ακόμα και κάποιες από τις παραλλαγές της stx2.

Επιδημιολογικές μελέτες έχουν αποκαλύψει ότι η stx2 σχετίζεται περισσότερο με σοβαρές ασθένειες στον άνθρωπο σε σχέση με την stx1 (Boerlin et al., 1999). Η τοξίνη stx2 περιλαμβάνει επίσης δύο υποομάδες A και B, αλλά με μεγαλύτερα μοριακά βάρη από ότι στην stx1 (35 kDa και 10,7 kDa). Μεταξύ των παραλλαγών της stx2, οι stx2 και stx2c έχουν βρεθεί σε στελέχη που απομονώθηκαν από ασθενείς με αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο (HUS, Haemolytic Uraemic Syndrome), ενώ στελέχη που παράγουν stx2d απομονώνονται κυρίως από περιπτώσεις μη επιπλεγμένης διάρροιας (Friedrich et al., 2002). Άλλες παραλλαγές ανευρίσκονται κυρίως σε STEC που

προκαλούν τη νόσο του οιδήματος στους χοίρους (Mainil, 1999) και έχει βρεθεί ότι η *stx2f* σχετίζεται με STEC που παρατηρείται στα πτηνά (Schmidt et al., 2000).

2.3.1.β «Γενετική περιοχή εξάλειψης των εντεροκυττάρων» (LEE, Locus of Enterocyte Effacement)»

Τα περισσότερα STEC-nonO157 που περιλαμβάνονται στην ομάδα των EHEC, αλλά και το EHEC *E.coli* O157 αποικίζουν τον βλεννογόνο του εντέρου με έναν μηχανισμό που υπονομεύει τη λειτουργία των επιθηλιακών κυττάρων και προκαλεί μια χαρακτηριστική παθολογική αλλοίωση. Η αλλοίωση αυτή χαρακτηρίζεται από την εξάλειψη των μικρολαχνών και την προσκόλληση μεταξύ των βακτηρίων και των επιθηλιακών κυττάρων της μεμβράνης, με συσσώρευση της πολυμεράσης ακτίνης ακριβώς κάτω από τα προσκολλημένα βακτήρια (Nataro et al., 1998).

Ο σύνθετος αυτός μηχανισμός ρυθμίζεται από γονίδια που κωδικοποιούνται σε μια περιοχή 35kb και η οποία αποκαλείται «Γενετική περιοχή εξάλειψης των εντεροκυττάρων» (Frankel et al, 1998). Στην περιοχή αυτή κωδικοποιείται το σύστημα έκκρισης τύπου III καθώς και πρωτεΐνες (μέρους του εκκριτικού συστήματος) υπεύθυνες για την προσκόλληση στο έντερο. Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας προκαλούνται από τα βακτήρια μια σειρά αλλαγών στα εντεροκύτταρα (Donnenberg et al., 1997). Το εκκριτικό σύστημα τύπου III μεταφέρει την Tir πρωτεΐνη, που και αυτή κωδικοποιείται στην περιοχή LEE, εσωτερικά του εντεροκυττάρου και ενσωματώνεται στην μεμβράνη του. Εκεί ενεργεί ως δέκτης για μια πρωτεΐνη της εξωτερικής στοιβάδας του βακτηρίου, που και αυτή κωδικοποιείται στην περιοχή LEE, την ιντιμίνη (intimin), που μεσολαβεί για τη στενή σύνδεση με το βακτηριακό κύτταρο και τη μετέπειτα έναρξη παραγωγής ακτίνης, ακριβώς κάτω από την περιοχή πρόσδεσης στο εντεροκύτταρο (Delahay et al., 2001).

Η σύνδεση συνοδεύεται από αύξηση ενδοκυτταρικών επιπέδων Ca^{+2} , την απελευθέρωση φωσφορικής ινοσιτόλης και την ενεργοποίηση της κινάσης της τυροσίνης, ένα ένζυμο που φωσφορυλιώνει υπολείμματα τυροσίνης στις ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες. Λόγω των παραπάνω, τα εντεροκύτταρα διαμορφώνουν επιφάνειες που βοηθούν τα βακτήρια για ακόμη μεγαλύτερη προσκόλληση. Παράλληλα, όλα τα

παραπάνω οδηγούν και σε απώλεια μικρολαχνών, γεγονός που θεωρείται ότι προκαλεί τη διάρροια, αφού διαταράσσεται η ισορροπία μεταξύ της απορρόφησης και της έκκρισης στο λεπτό έντερο.

Η ιντιμίνη μεσολαβεί για την στενή σύνδεση των EHEC και των EPEC *E.coli* στο κύτταρο ξενιστή. Τα γονίδια που κωδικοποιούν την ιντιμίνη παρουσιάζουν σημαντική ανομοιογένεια στο τελικό τους 3-άκρο, που κωδικοποιεί τα C-τελικά 280 αμινοξέα και σχετίζονται με τη σύνδεση στα εντεροκύτταρα και στην πρωτεΐνη Tir (Hartland et al., 1999). Ανάλογα την αλληλουχία και τις αντιγονικές διαφοροποιήσεις στο τελικό 3-άκρο, παρατηρούνται τέσσερις τύποι ιντιμινών: α, β, γ και ε. Η ιντιμίνη α εντοπίζεται κυρίως σε EPEC, οι τύποι γ και ε σχετίζονται με EHEC, ενώ η ιντιμίνη γ παράγεται από τις *E.coli* O157, O111 και O145 (Oswald et al., 2000).

2.3.1.γ Άλλα νησίδια παθογένειας (PAI)

Η γενετική ανάλυση ολόκληρης της αλληλουχίας της EHEC *E.coli* O157:H7 έχει αποδείξει ότι περίπου το 20% των χρωμοσωμάτων του αποτελείται από ξένο DNA, λόγω της οριζόντιας γονιδιακής μεταφοράς (Reid et al., 2000). Στα EHEC O157, το νησίδιο O122 βρίσκεται μετά το LEE και θεωρείται ότι τα δύο αυτά νησίδια (LEE και PAI O#122) αποτελούσαν παλιά ένα μεγάλο PAI και διαχωρίστηκαν στη συνέχεια ως αποτέλεσμα χρωμοσωμικών αναδιατάξεων (Morabito et al., 2003). Το PAI O#122 μεταφέρει ένα 10kb παθογόνο γονίδιο το *efal*, που έχει σχετιστεί με τη καταστολή της αντίδρασης των λεμφοκυττάρων του ξενιστή (Klapproth et al., 2000). Η *in vivo* παρουσία αυτού το γονιδίου έχει συσχετιστεί με την δυνατότητα αποικισμού του εντερικού σωλήνα των βοοειδών και την πρόκληση διάρροιας στα νεαρά μοσχάρια (Stevens et al, 2002). Το PAI O#122 του VTEC O157 περιέχει μόνο το τελικό 5- άκρο του *efal* γονιδίου (παράγοντας EHEC για προσκόλληση), αλλά ακόμη και αυτό είναι αρκετό για να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στις προσκολλητικές του ιδιότητες (Tatsuno et al., 2000).

2.3.1.δ Πλασμίδια

Το EHEC O157 διαθέτει ένα μεγάλης λοιμογόνου δύναμης πλασμίδιο, με μοριακό βάρος περίπου 90kb και ονομάζεται pO157. Η νουκλεοτιδική αλληλουχία του πλασμιδίου έχει δείξει ότι κωδικοποιεί μια σειρά από πρωτεΐνες, 35 τον αριθμό, μερικές από τις οποίες πιθανόν να εμπλέκονται στην παθογένεια των EHEC λοιμώξεων (Burland et al., 1998). Το hly-operon του pO157 των EHEC O157 και άλλων VTEC κωδικοποιεί την παραγωγή της εντεροαιμολυσίνης, γι' αυτό και η παρουσία του θεωρείται ο καλύτερος δείκτης της παρουσίας του pO157 και παρατηρείται επίσης σε μεγάλα πλασμίδια που ανιχνεύονται στα περισσότερα non-O157 EHEC στελέχη (Brashears et al., 2003). Άλλοι δείκτες πλασμιδίου είναι τα katP και espP γονίδια, που κωδικοποιούν μια καταλάση-υπεροξειδάση και μια πρωτεάση σερίνης αντίστοιχα. Ωστόσο, η ανάμειξη των παραπάνω παραγόντων στην παθογένεια των EHEC εξακολουθεί να μην είναι ξεκάθαρη.

2.3.2 Δεξαμενές της *E.coli* O157:H7

Τα εντεροαιμορραγικά στελέχη της *E.coli* (EHEC) σπάνια προκαλούν ασθένειες στα ζώα, ενώ τα μηρυκαστικά έχουν αναγνωριστεί ως κύριες φυσικές δεξαμενές τους στη φύση. Πράγματι, τα βοοειδή θεωρούνται η πιο σημαντική ζωική πηγή των EHEC, που είναι παθογόνα για τον άνθρωπο, κυρίως της *E.coli* O157, και η οικολογία του μικροοργανισμού στα ζώα αυτά είχε μελετηθεί διεξοδικά (Caprioli et al., 2005). Η *E.coli* O157 μαζί με άλλους οροτύπους, που σχετίζονται με ανθρώπινες λοιμώξεις, έχουν συχνά απομονωθεί από εντερικό περιεχόμενο και άλλων μηρυκαστικών, όπως πρόβατα, αίγες, βουβάλια, και σπάνια από άλλα ζώα όπως χοίρους και πουλερικά.

Τα βοοειδή αποτελούν ασυμπτωματικούς φορείς των EHEC/VTEC O157, που αποτελούν μέλη της μικροβιακής χλωρίδας του εντέρου τους. Η παρουσία του EHEC/VTEC O157 φαίνεται να εξαρτάται τόσο από την ηλικία των ζώων όσο και από την εποχή. Η απέκκριση είναι συνήθως μεγαλύτερη και πιο έντονη σε μόσχους παρά σε ενήλικα βοοειδή και αυξάνεται με τον απογαλακτισμό και κατά τη θερινή περίοδο

(Caprioli et al., 2005). Εξετάσεις κοπράνων σε γαλακτοπαραγωγές αγελάδες σε όλον τον κόσμο έδειξαν ποσοστά παρουσίας για EHEC/VTEC O157 (0,2-48,8%) και για EHEC/VTEC το εύρος κυμαινόταν από 0,4 έως 74% (Hussein and Bollinger, 2005).

Το EHEC/VTEC O157, καθώς και άλλες οροομάδες που σχετίζονται με ανθρώπινες λοιμώξεις όπως π.χ. O91, O128 και O146 έχουν συχνά απομονωθεί και από το εντερικό περιεχόμενο των προβάτων (Heuvelink et al., 1998, Urdahl et al., 2003) . EHEC/VTEC O157 έχουν επίσης βρεθεί σε κρέας (Chapman et al., 2000) και γάλα προβάτου, οπότε το πρόβατο θεωρείται πια ως σημαντική δεξαμενή για την ανθρώπινη μόλυνση. Κοπάδια μικρών μηρυκαστικών μπορούν με τις απεκκρίσεις τους να βοηθήσουν στην εξάπλωση της μόλυνσης του περιβάλλοντος από EHEC/VTEC O157 (Ogden et al., 2002). Λιγότερο συχνά πηγές λοίμωξης από EHEC/VTEC O157 μπορεί να αποτελούν τόσο τα βουβάλια όσο και τα άγρια μηρυκαστικά όπως π.χ. τα ελάφια (Conedera et al., 2004, Renter et al., 2001).

Σε ό,τι αφορά την παρουσία EHEC/VTEC σε θηλαστικά πλην των μηρυκαστικών έχουν αναφερθεί σποραδικά περιστατικά, για τα οποία όμως δεν έχει αποδειχθεί εάν πρόκειται για πραγματικούς ξενιστές ή απλά αποικήθηκαν παροδικά μετά από επαφή με μηρυκαστικά. Έτσι, στελέχη EHEC/VTEC O157 έχουν απομονωθεί από ζώα συντροφιάς όπως άλογα, σκυλιά, κουνέλια τόσο άγρια όσο και ήμερα. (Wasteson et al., 2001, Trevena et al., 1996, Leclercq A. et al., 2003). Οι χοίροι από την πλευρά τους δεν αποτελούν σημαντική πηγή ανθρώπινης μόλυνσης με EHEC/VTEC. Έρευνες σε σφαγεία της Ευρώπης και της Αμερικής δεν έδειξαν υψηλά ποσοστά παρουσίας σε κόπρανα χοίρων (Feder et al., 2003, Bonardi et al., 2003).

2.3.3 Τρόποι μετάδοσης

Το CDC έχει υπολογίσει ότι το 83% των λοιμώξεων από *E.coli* O157:H7 έχει τροφιμογενή προέλευση. Το 2009 το CDC εξέδωσε μια επικαιροποιημένη αναφορά στην επιδημιολογία των Shiga-toxin *E.coli* (STEC) στις Η.Π.Α.. Σύμφωνα με αυτήν την αναφορά ο ετήσιος αριθμός ασθενειών που προκλήθηκαν από STEC και αναφορικά από *E.coli* O157:H7 ήταν ο ακόλουθος: 73.000 ασθένειες, 2200 άνθρωποι δέχθηκαν νοσοκομειακή φροντίδα και σημειώθηκαν 61 θάνατοι. Για την περίοδο 1998-2007, από

τις 334 εξάρσεις που σημειώθηκαν, οι φορείς γι' αυτές τις λοιμώξεις ήταν σε ό,τι αφορά την *E.coli* O157:H7 κατά 69% τροφιμογενούς προέλευσης, κατά 18% υδατογενούς προέλευσης, κατά 8% οφειλόταν σε ζώα και στο περιβάλλον τους και κατά 5% σε άμεση επαφή με άνθρωπο. Η κατανάλωση οποιασδήποτε τροφής, που έχει μολυνθεί από περιττώματα ζώων (κυρίως βοοειδών) μπορεί να οδηγήσει σε ασθένεια. Παρόλο, που η κύρια πηγή EHEC/VTEC θεωρούνται τα περιττώματα των μηρυκαστικών, υπάρχουν τρεις κύριες οδοί μετάδοσης με τις οποίες μπορούν οι παραπάνω οργανισμοί να μεταδοθούν στον άνθρωπο.

2.3.3.α Τροφιμογενής μετάδοση

Συχνά περιλαμβάνει την κατανάλωση ατελώς ψημένου κρέατος ή παρασκευασμάτων κρέατος (κυρίως βοδινού) που μολύνθηκαν μετά από επαφή με περιττώματα στο σφαγείο. Σε έρευνα στα Midwest των Η.Π.Α., περισσότερα από το 45% των περισσοτέρων από 330 σφάγιων που ελέγχθηκαν κατά την περίοδο Ιουλίου- Αυγούστου εμφάνισαν ανιχνεύσιμα επίπεδα *E.coli* O157:H7 (Elder et al., 2003). Το ποσοστό ανίχνευσης του βακτηρίου στα σφάγια κυμάνθηκε από 43% στο στάδιο του προ-εκσπλαχνισμού, στο 18% στο στάδιο του μετα-εκσπλαχνισμού και στο 2% μετά από επεξεργασία όπως, π.χ. πλύσεις με οργανικό οξύ, με καυτό νερό και απολύμανση με ατμό). Τα αρχικά υψηλά επίπεδα μόλυνσης μειώθηκαν αρκετά λόγω επεξεργασίας, που αποδεικνύει ότι στις παραπάνω εγκαταστάσεις τα μέτρα υγιεινής είναι αποτελεσματικά, αν και σε ορισμένα σφάγια που ήταν αρχικά αρνητικά σε *E.coli* O157:H7, στο τέλος της διαδικασίας βρέθηκαν θετικά, πιθανόν λόγω διασταυρούμενης επιμόλυνσης.

Γαλακτοκομικά προϊόντα (γάλα, τυρί, κρέμα) από βοοειδή, πρόβατα και αίγες μπορούν να μολυνθούν με βακτήρια *E.coli* O157:H7. Η σωστή παστερίωση θανατώνει τα βακτήρια και οι περιπτώσεις τροφιμογενών εξάρσεων από *E.coli* O157:H7 συχνά σχετίζονται α) με απαστερίωτο γάλα, β) με αποτυχία σωστής παστερίωσης, ακόμη και γ) με επιμόλυνση μετά την παστερίωση.

Η κοπριά θεωρείται πολύτιμο λίπασμα για τα χωράφια, όμως κοπριά μολυσμένη με *E.coli* O157:H7 μπορεί να αποτελέσει πηγή μόλυνσης για λαχανικά και φρούτα, που δεν μαγειρεύονται πριν την κατανάλωσή τους. Σε μία έρευνα, βακτήρια *E.coli* O157:H7

κατάφεραν να επιβιώσουν 42 ημέρες σε σωρούς κοπριάς που αναστρέφονταν και 90 ημέρες σε σωρούς που δεν αναστρέφονταν (Fremaux et al., 2006). Μολυσμένα λάχανα αποτελούν αναδυόμενη πηγή *E.coli* O157:H7 (Mermin et al., 1999). Σε λάχανα που έχουν αναπτυχθεί από μολυσμένους σπόρους έχουν παρατηρηθεί βιώσιμοι οργανισμοί, παρόλη την απολύμανση που πραγματοποιήθηκε στην εξωτερική επιφάνειά τους (Itoh et al., 1998).

Άλλα νωπά προϊόντα, όπως τομάτες, μαρούλια αποτελούν επίσης πιθανούς φορείς της των EHEC λοίμωξης, λόγω είτε μολυσμένης κοπριάς είτε μολυσμένου νερού άρδευσης. Μαρούλια που καλλιεργήθηκαν σε εδάφη μολυσμένα με *E.coli* O157:H7 δεν περιείχαν το βακτήριο στα φύλλα τους (Johannessen et al., 2005), ωστόσο ψεκασμός μαρουλιών με μολυσμένο νερό με *E.coli* O157:H7 είχε ως αποτέλεσμα την εναπόθεση των βακτηρίων στα φύλλα και την επιβίωσή τους για περίπου 30 ημέρες (Solomon et al., 2003). Ακόμη και απαστερίωτοι χυμοί φρούτων, ειδικότερα χυμός μήλου, έχουν συχνά συσχετιστεί με τροφιμογενείς εξάρσεις (Tozzi et al., 2001). Τα τελευταία χρόνια (2003-2007) παρατηρείται μια σημαντική αύξηση τροφιμογενών εξάρσεων που οφείλονται σε φυλλώδη λαχανικά όπως φαίνεται από την αναφορά του CDC 2009.

2.3.3.β Υδατογενής μετάδοση

Το νερό που χρησιμοποιείται για πόση ή για αναψυχή έχει αναφερθεί ως φορέας της λοίμωξης για 49 εξάρσεις : έξι σχετίστηκαν με πάρκα με τρεχούμενα νερά και πισίνες, δεκαοκτώ με λίμνες, κανάλια και πηγές, δέκα με πηγάδια νερού, δώδεκα με πόσιμα νερά και τρία νερά βρύσης. Η μόλυνση του νερού συμβαίνει συχνά λόγω ζωικών περιττωμάτων που μεταφέρονται από το γύρω περιβάλλον (Olsen et al., 2003). Εξάρσεις έχουν παρατηρηθεί μεταξύ ανθρώπων που επισκέπτονται υπαίθριες εκδηλώσεις ακόμη και φάρμες ζώων (Tozzi et al., 2001, Caprioli et al., 2005). Η επίσκεψη σε φάρμα θεωρείται τώρα πια ένας σημαντικός παράγοντας κινδύνου για την απόκτηση σοβαρών EHEC λοιμώξεων. Η άμεση ή έμμεση επαφή με ζώα και με τα περιττώματά τους έχει ως αποτέλεσμα την κατάποση EHEC *E.coli* εάν η ατομική υγιεινή δεν είναι ικανοποιητική (Caprioli et al., 2005). Τα EHEC μπορούν να μεταφερθούν τόσο επιφανειακά όσο και με την αποβολή των περιττωμάτων των ζώων, και κυρίως των μηρυκαστικών. Οι πηγές της

μόλυνσης περιλαμβάνουν νερά πηγαδιού, έκθεση σε λάσπη που έχει μολυνθεί με περιττώματα βοοειδών και άμεση επαφή με ζώα που εκθέτονται (Payne et al.,2003).

2.3.3.γ Μετάδοση άμεση από άνθρωπο σε άνθρωπο

Ο τρόπος αυτός μετάδοσης μέσω της κοπρανοστοματικής οδού είναι πολύ σημαντικός στη μετάδοση της EHEC O157:H7 μεταξύ ατόμων της ίδιας οικογένειας, σε σχολεία, σε παιδικούς σταθμούς και σε νοσοκομεία, όπου μπορούν να συμβούν παραλήψεις στην υγιεινή (Reida et al.,1994, Pennington TH,2000). Σε πολλές εξάρσεις, κάποιοι από αυτούς που κατανάλωσαν μολυσμένη τροφή ή νερό μετέδωσαν τη μόλυνση άμεσα και σε άλλους. Έχει παρατηρηθεί ότι ενώ σε παιδιά μολυσμένα με *E.coli* O157:H7 αποβάλλουν με τα κόπρανά τους το βακτήριο για μερικές ημέρες, σε παιδιά με πιο σοβαρά συμπτώματα , κύτταρα του *E.coli* O157:H7 αποβάλλονται ακόμη και επί 20-30 ημέρες. Ορισμένα μάλιστα παιδιά , παραμένουν ασυμπτωματικοί φορείς και συνεχίζουν να απεκκρίνουν το βακτήριο για ακόμη μεγαλύτερο διάστημα (Karch et al, 1995).

Από τα παραπάνω φαίνεται ότι τα τελευταία χρόνια έχει επέλθει μια αλλαγή στο είδος του τροφίμου που είναι υπεύθυνο για την πρόκληση ασθενειών από *E.coli* O157:H7. Ενώ τη δεκαετία του 80 κυριαρχούσε το βοδινό κρέας τώρα παρατηρούνται και εξάρσεις που οφείλονται σε χαμηλού pH προϊόντα, όπως σαλάμι ζύμωσης, γιαούρτι, φρούτα και φυλλώδη λαχανικά μολυσμένα από κοπριά που έχει *E.coli* O157:H7, σε απαστερίωτους χυμούς και σε άμεση επαφή.

2.3.4 Δυσμενείς επιπτώσεις για την ανθρώπινη υγεία

Η κατάποση του EHEC *E.coli* O157:H7 μπορεί να έχει πολλά πιθανά αποτελέσματα, από ασυμπτωματική λοίμωξη μέχρι θάνατο. Για να προκληθεί ασθένεια, θα πρέπει η *E.coli* O157:H7 να επιβιώσει τις όξινες συνθήκες που επικρατούν στο στομάχι και να μετακινηθεί στη συνέχεια στα άνω τμήματα του εντερικού σωλήνα. Ασθένεια που σχετίζεται με *E.coli* O157:H7 λαμβάνει χώρα κυρίως στο παχύ έντερο. Ειδικότερα τα

βακτήρια μετά την κατάποση πολλαπλασιάζονται στο παχύ έντερο και προσκολλούνται σε κύτταρα του εντερικού τοιχώματος. Η προσκόλληση αυτή διευκολύνει την απορρόφηση τοξινών και την είσοδό τους σε τριχοειδή αγγεία του εντέρου όπου συνδέονται με Gb3-υποδοχείς (The Marler Clark Network).

Η φλεγμονή που προκαλείται από τις τοξίνες θεωρείται το αίτιο για την αιμορραγική κολίτιδα, το πρώτο σύμπτωμα της λοίμωξης από *E.coli* O157:H7, που χαρακτηρίζεται από αιφνίδια έναρξη κοιλιακού άλγους και σοβαρών κραμπών, που συνοδεύονται εντός 24-72 ωρών από διάρροια που μπορεί να μετατραπεί και σε αιμορραγική (Boyce, Swerdlow and Griffin, 1995, Griffin and Mead 1998). Η περίοδος επώασης από τη στιγμή της κατάποσης μέχρι τη στιγμή της εμφάνισης των πρώτων συμπτωμάτων κυμαίνεται από μία έως οκτώ ημέρες.

Καθώς η λοίμωξη προχωρά, η διάρροια γίνεται υδαρής και στη συνέχεια μπορεί να μετατραπεί σε έντονα αιμορραγική, να συνοδευτεί από εμέτους και πυρετό. Σε σπάνιες περιπτώσεις, μπορεί να προκληθεί νέκρωση εντερικού τοιχώματος και διάτρηση.

Η αιμορραγική κολίτιδα μπορεί να αποτελέσει την μοναδική εκδήλωση της λοίμωξης από *E.coli* O157:H7. Ωστόσο, η πιο επικίνδυνη εκδήλωση της *E.coli* O157:H7 λοίμωξης είναι η εμφάνιση του αιμολυτικού ουραιμικού συνδρόμου (HUS), που χαρακτηρίζεται από νεφρική ανεπάρκεια, χαμηλό αριθμό αιμοπεταλίων αιμολυτική αναιμία και συχνά ακολουθεί την αιμορραγική κολίτιδα. Το ποσοστό των ασθενών που εμφάνισαν HUS μετά από λοίμωξη με *E.coli* O157:H7 ποικίλλει από σποραδικές περιπτώσεις (3%-7%) μέχρι και περιπτώσεις που σχετίζονται με εξάρσεις (20% - >20%) (Mead and Griffin, 1998). Το ποσοστό των ασθενών που θα εμφανίσουν HUS μετά από λοίμωξη με *E.coli* O157:H7 επηρεάζεται από ποικίλους παράγοντες, όπως ηλικία, αιμορραγική διάρροια, πυρετός, αυξημένος λευκοκυτταρικός αριθμός και τύπος τοξίνης (Griffin , 1995). Οι Wong et al. (2000) αναφέρουν ότι 10 (14,1%) από τα 71 παιδιά με *E.coli* O157:H7 εμφάνισαν HUS.

Το HUS είναι το πιο συχνό αίτιο οξείας νεφρικής ανεπάρκειας σε νεαρά παιδιά, ωστόσο έχει και μακροπρόθεσμες επιπλοκές. Ο Siegler και οι συνεργάτες του (1994) βρήκαν ότι το HUS προκαλεί χρόνια νεφρικά επακόλουθα, κυρίως ήπια, σε 51% των επιβιωσάντων. Νευρολογικές επιπλοκές παρατηρούνται σε ποσοστό 25% σε ασθενείς με HUS (Mead and Griffin, 1998) και τα συμπτώματα είναι κυρίως ήπια. Άλλες επιπλοκές του HUS

είναι η παγκρεατίτιδα, ο σακχαρώδης διαβήτης, η πλευριτική και περικαρδιακή συλλογή (Mead and Griffin, 1998).

Σπάνια, ασθενείς με *E.coli* O157:H7 διαγιγνώσκονται με θρομβωτική θρομβοπενική πορφύρα (TTP), μια κατάσταση παρόμοια με το HUS, αλλά πιο συχνή σε ενήλικες και με περισσότερο εμφανή νευρολογικά συμπτώματα και λιγότερο με τα νεφρά. Από τα 73 παιδιά και τους 10 ενήλικες που πληρούσαν το ορισμό της περίπτωσης HUS στην έρευνα του Banatvala και των συνεργατών του (2001), οκτώ (11%) παιδιά και οκτώ (80%) ενήλικες πληρούσαν ταυτόχρονα και τον ορισμό του TTP.

Κεφάλαιο 3. *Yersinia* spp

Το γένος *Yersinia* ανήκει στην οικογένεια των Enterobacteriaceae και αποτελείται από 12 είδη (*Y.pestis*, *Y.pseudotuberculosis*, *Y.enterocolitica*, *Y. frederiksenii*, *Y. kristensenii*, *Y.intermedia*, *Y.aldovae*, *Y. mollaretii*, *Y. bercovieri*, *Y.rohdei*, *Y.ruckeri* και *Y.aleksiciae*). Από τα παραπάνω είδη μόνο τα τρία πρώτα έχουν καθιερωθεί ως παθογόνα για τον άνθρωπο. Ειδικότερα, η *Y.pestis* αποτελεί τον αιτιολογικό παράγοντα της πανώλης, δεν συναντάται στην Ευρώπη και δεν θεωρείται τροφιμογενές παθογόνο. Η *Y.enterocolitica* και η *Y.pseudotuberculosis* είναι ευρέως διαδεδομένα στην Ευρώπη και έχουν τα χαρακτηριστικά των τυπικών εντεροπαθογόνων (EFSA, 2007).

3.1 *Yersinia enterocolitica*

Πρόκειται για προαιρετικά αναερόβιο βακτήριο, κινητό στους 25°C ακίνητο στους 37°C, που ζυμώνει τη γλυκόζη και όχι τη λακτόζη, είναι οξειδάση αρνητικό και ουρεάση θετικό. Το CIN άγαρ αποτελεί άκρως εκλεκτικό υπόστρωμα για την ανάπτυξη του οργανισμού, του οποίου οι αποικίες μετά από επώαση 18-20 ωρών στους 25°C εμφανίζουν ιδιαίτερη μορφολογία (μάτι του βοδιού – bull's eye) και καθαρά διαγραφόμενα όρια αποικίας.

Η *Y.enterocolitica* ταξινομείται λαμβάνοντας υπόψη σαφή βιοχημικές και ορολογικές αντιδράσεις. Έτσι, βασιζόμενοι στα βιοχημικά χαρακτηριστικά της έχουν περιγραφεί έξι βιότυποι της *Y.enterocolitica* (1A, 1B, 2, 3, 4, 5)(Πίνακας 4). Από αυτούς, οι βιότυποι 2, 3, και 4 είναι οι πιο συχνοί στους ανθρώπους. Σε ό,τι αφορά τους ορότυπους έχουν περιγραφεί πάνω από 48 και σχετίζονται με την ειδικότητα του O αντιγόνου. Από αυτούς οι πιο παθογόνοι για τους ανθρώπους θεωρούνται οι ορότυποι O:3, O:5,27, O:8 και O:9 (EFSA, 2007).

Πίνακας 4 . Βιοχημικά χαρακτηριστικά των διαφόρων βιοτύπων *Yersinia enterocolitica*

Βιοτυπικά σχήματα ^(a) για την <i>Y. enterocolitica</i>						
Biochemical test	Αντιδράσεις των βιοτύπων					
	1A	1B	2	3	4	5
Lipase	+	+	-	-	-	-
Esculin/salicin (24 h)	+/+	-	-	-	-	-
Indole	+	+	(+)	-	-	-
Xylose	+	+	+	+	-	-
Trehalose	+	+	+	+	+	-
Pyrazinamidase	+	-	-	-	-	-
Nitrate reduction	+	+	+	+	+	-

^a βασισμένα στον Wauters et al., (1987) , (+) = καθυστερημένη αντίδραση

+ = θετική, - = αρνητική

Τα στελέχη της *Y. enterocolitica* μπορούν επίσης να διαχωριστούν σε τρεις μεγάλες ομάδες ανάλογα την παθογένειά τους: σε α) υψηλής παθογένειας (pYV +, HPI+): βióτυπος 1B, β) μέτριας παθογένειας (Pyv+, HPI-): βióτυποι 2,3,4,5 και γ) μη παθογένειας (pYV-, HPI-): βióτυπος 1A

Ο υψηλής παθογένειας βióτυπος 1B απομονώνεται συχνά στη Βόρεια Αμερική και είναι σπάνιος στην Ευρώπη. Στελέχη βióτυπου 4 (ορότυπος O:3) και βióτυπου 2 (ορότυπος O:9) συχνά σχετίζονται με ανθρώπινες μολύνσεις στην Ευρώπη και σπάνια ανιχνεύονται στο περιβάλλον, ενώ οι βióτυποι 3 και 5 γενικά είναι σπάνιοι. Παρόλα αυτά, μη παθογόνα στελέχη του *Y. enterocolitica* βióτυπος 1A συναντούνται ευρέως στο περιβάλλον και συχνά ανιχνεύονται στα τρόφιμα, χωρίς όμως να υπάρχουν δεδομένα που να αποδεικνύουν ορισμένες παθογόνες ιδιότητες.

Στην Ευρώπη οι ορότυποι O:3, O:9 και O:5,27 είναι σημαντικοί για τον άνθρωπο, ενώ στην Αμερική κυριαρχούν οι ορότυποι O:8, O:3, O:13, O:20 και O:21. Ο ορότυπος O:3 ανιχνεύεται τόσο στην Αμερική όσο και στην Ευρώπη σε αντίθεση με το O:8, που σπάνια ανιχνεύεται στην Ευρώπη, αλλά παρατηρείται συχνά στην Αμερική (Robert Koch Institut, (2000)). Επίσης έχει παρατηρηθεί ότι η παθογένεια των οροτύπων

διαφέρει με αυτή του O:8 να είναι ισχυρότερη από των O:3 και O:9 (Robert Koch Institut, 2000).

Σε ό,τι αφορά την κατανομή τους στα ζώα έχει παρατηρηθεί ότι για κάθε είδος έχουν εντοπιστεί διαφορετικοί ορότυποι. Έτσι έχουμε τον O:1 στα τσιντσιλά, τον O:2 σε κουνέλια και αίγες, τον O:3 σε σκύλους, γάτες και πιθήκους. Στους χοίρους παρατηρούνται όλοι σχεδόν οι ορότυποι, συμπεριλαμβανομένων και των O:9 και O:3, χωρίς τα ζώα να εμφανίζουν συμπτώματα της νόσου (Selbitz, 1992)

3.1.α Παθογένεια *Yersinia enterocolitica*

Η *Y. enterocolitica* είναι ένα διεισδυτικό εντερικό βακτήριο, χωρίς ωστόσο όλα τα στελέχη της να είναι παθόγona. Τα περιβαλλοντικά στελέχη της είναι κυρίως μη παθογόνα ενώ τα παθογόνα στελέχη της απαντώνται κυρίως στα χοιρινά. Από τα παθογόνα στελέχη, αυτά που σχετίζονται με την Υερσινίωση στον άνθρωπο ανήκουν στους παρακάτω βιοορότυπους 1/B O:8, 2/O:5,27, 3/O:3, 2/O:9 και 4/O:3, με τους δύο τελευταίους να αποτελούν τους πιο κοινούς στην Ευρωπαϊκή Ένωση το έτος 2008 (EFSA, 2010).

Η παθογόνος δράση της *Y. enterocolitica* εξαρτάται τόσο από ένα παθογόνο πλασμίδιο γνωστό ως pYV (plasmid for Yersinia Virulence), όσο και από χρωμοσωμικά γονίδια που ελέγχουν την προσκόλλησή της, την εισβολή της και τον αποικισμό των εντερικών επιθηλιακών κυττάρων και των λεφadenών αλλά και την επιβίωσή της μέσα στα μακροφάγα. Το πλασμίδιο, το διαθέτουν όλα τα παθογόνα στελέχη της *Y. enterocolitica* και κωδικοποιεί πολλές πρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης του βακτηρίου. Μετά την κατάποση, το βακτήριο αποικίζει τον αυλό και εισβάλλει στο επιθήλιο του λεπτού εντέρου, οδηγώντας στον αποικισμό των υποκείμενων λεμφικών ιστών, γνωστών ως πλάκες του Peyer. Μια άμεση σχέση μεταξύ των πλακών του Peyer και των μεσεντέριων λεφμογαγγλίων μπορεί να οδηγήσει σε βακτηριακή διάδοση και κατ' επέκταση σε μεσεντερική λεμφαδενίτιδα. Η εξάπλωση σε περιοχές εκτός του εντέρου, όπως σπλήνας, υποτίθεται ότι συμβαίνει κυρίως μέσω δύο μηχανισμών: 1) με τον

αποικισμό των πλακών του Peyer, που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αρχικό στάδιο για περαιτέρω εξάπλωση στο αίμα ή στη λέμφο και κατ' επέκταση και σε άλλους ιστούς και 2) με την παράκαμψη των πλακών και απευθείας συστηματικό αποικισμό.

Ο αποικισμός του λεμφικού ιστού του εντέρου από την *Y. enterocolitica* απαιτεί τη μετανάστευσή της από τον αυλό του εντέρου και την προσκόλληση και είσοδό της στα Μ-κύτταρα, που βρίσκονται σε αυξημένους αριθμούς στο υπερκείμενο από τις πλάκες του Peyer εντερικό επιθήλιο. Στη συνέχεια, η *Y. enterocolitica* διεισδύει στα παραπάνω κύτταρα και αποκτά τη δυνατότητα να πολλαπλασιαστεί στους υποκείμενους ιστούς. Η παραπάνω προσκόλληση ενισχύεται από την πρωτεΐνη της εξωτερικής μεμβράνης με το όνομα YadA, που κωδικοποιείται από το πλασμίδιο PVY, και εκφράζεται άριστα σε θερμοκρασίας 37°C αλλά μπορεί να εκφραστεί και στους 25°C (Paerregaard et al., 1991, Wren, B.W, 2003). Η πρωτεΐνη YadA διαταράσσει επίσης, τη λειτουργία των κυττάρων του ξενιστή, εμποδίζοντας έτσι την απελευθέρωση προφλεγμονωδών κυτοκινών όπως η ιντερλευκίνη 8 (IL-8), που ασκεί κυρίως χημειοτακτική δράση και προσελκύει τα ουδετερόφιλα. Παράλληλα, ενεργοποιεί την φωσφατάση της τυροσίνης YopH που μπλοκάρει τον φαγοκυτταρικό μηχανισμό (Arun, Bhunia, 2008).

Η προσκόλληση αυτή και η είσοδος στα Μ-κύτταρα επιτυγχάνεται και με τη μεσολάβηση άλλων χρωμοσωμικών παραγόντων. Ειδικότερα, μια εξωτερική πρωτεΐνη της μεμβράνης με την ονομασία Invasin (inv) κωδικοποιείται από χρωμοσωμικό γονίδιο και προωθεί άμεσα την είσοδο στα κύτταρα με την προσκόλληση στους B1-υποδοχείς που βρίσκονται στην επιφάνεια του ευκαρυωτικού κυττάρου (Isberg et al., 1990, Handley SA et al., 2005).

Άλλη πρωτεΐνη που ενισχύει τη διείσδυση στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου είναι η Ail, που κωδικοποιείται από το χρωμοσωμικό γονίδιο ail. Η πρωτεΐνη αυτή παράλληλα προσδίδει στην *Y. enterocolitica* αντίσταση κατά του ορού. Πράγματι, μελέτες των Bliska και Falkow (1992) απέδειξαν ότι στελέχη της *Y. enterocolitica*, που στερούνταν των πρωτεϊνών YadA και inv, αλλά περιείχαν την Ail, εμφάνιζαν αντίσταση στον ορό λόγω του γεγονότος ότι η Ail δέσμευε κάποιο παράγοντα του ορού ή συμπληρωματικό συστατικό που δεν επέτρεπε την επίθεση κατά της υερσίνιας από την άμυνα του ανθρώπινου οργανισμού.

Η *Y. enterocolitica* επιβιώνει από την επίθεση των μακροφάγων με την έκφραση μιας αντιφαγοκυτταρική στρατηγικής, που εκδηλώνεται με την έκκριση πρωτεϊνών στο

εξωκυτταρικό περιβάλλον , σε όλη την εξωτερική της μεμβράνη και στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου ξενιστή. Οι πρωτεΐνες αυτές εκκρίνονται από ένα σύστημα έκκρισης τύπου III (TTSS), το οποίο αποτελείται από 28 πρωτεΐνες, και τα γονίδια που τις κωδικοποιούν και που βρίσκονται στο πλασμίδιο pYV. Ειδικότερα, από τις πρωτεΐνες αυτές οι πιο σημαντικές είναι οι YopH, T, και E και έχουν και οι τρεις ως σκοπό τη διαταραχή της κυτταροσκελετικής παραγωγής (Cornelis, 1998). Η YopT προκαλεί τον αποπολυμερισμό των ινών ακτίνης, παρακινώντας την ανακατανομή της RhoA GTPase (Zumbih et al., 1999) ενώ η YopE εκφράζει μια λειτουργία GAP που αναστέλλει τις μικρές GTPάσες της Rho οικογένειας που σχετίζεται με την φαγοκυττάρωση. Επομένως, το σύστημα TTSS μπλοκάρει την φαγοκυττάρωση και καταστέλλει το ανοσοποιητικό σύστημα επιτρέποντας την επιβίωση της *Y. enterocolitica* στους λεμφοειδείς ιστούς

Η είσοδος της *Y. enterocolitica* στα μεσεντέρια λεμφογγάγλια μπορεί να οδηγήσει σε συστηματική μόλυνση ή μεσεντερική αδενίτιδα. Η εντεροτοξίνη που παράγεται από αυτήν είναι παρόμοια με εκείνη της θερμο-σταθερής εντεροτοξίνης της *E.coli*. Ωστόσο, ο ρόλος στην πρόκληση ασθένειας είναι μικρός διότι έχουν παρατηρηθεί διαρροϊκά σύνδρομα χωρίς την παραγωγή εντεροτοξίνης.

Η *Y. enterocolitica* ανήκει στα βακτήρια που παράγουν το ένζυμο ουρεάση, δηλαδή είναι ουρεάση-θετικά. Αυτή η πρωτεΐνη (ουρεάση) κωδικοποιείται από χρωμοσωμικό γονίδιο του συμπλόκου της ουρεάσης και καταλύει την υδρόλυση της ουρίας γεγονός που οδηγεί στην παραγωγή αμμωνίας και στην αύξηση του pH ,γεγονός που διευκολύνει την επιβίωση στο όξινο περιβάλλον του στομάχου (De Koning-Ward et al., 1995).

3.1.β Δεξαμενές της *Y. enterocolitica*

3.1.β.i Χοίροι και χοιρινό κρέας

Οι χοίροι θεωρούνται ως μία από τις κύριες δεξαμενές της παθογόνου *Y. enterocolitica*, που σχετίζεται με ανθρώπινες ασθένειες και κυρίως των στελεχών της με βιοορότυπο 4/O:3 (λιγότερα συχνά με 2/O:9), που ανιχνεύονται σχεδόν αποκλειστικά σε

Ευρωπαϊκές χώρες, όπως Δανία, Ιταλία, Σουηδία, Ισπανία (Martinez et al., 2011, M. Fredriksson-Ahomaa et al., 2006). Τα στελέχη αυτά ανευρίσκονται στη στοματική κοιλότητα των χοίρων και το ποσοστό απομόνωσης από αμυγδαλές και γλώσσες είναι μεγαλύτερο από το ποσοστό απομόνωσης από περιττώματα και εντερικό περιεχόμενο (Fredriksson-Ahomaa et al., 2006).

Στελέχη του βιοορότυπου 4/O:3 ανευρίσκονται συχνά στις εξωτερικές επιφάνειες χοίρειων σφάγιων ως αποτέλεσμα εξάπλωσης του οργανισμού μέσω εντερικού περιεχομένου, περιττωμάτων και αμυγδαλών, τόσο κατά τη διάρκεια της σφαγής και του εκσπλαχνισμού όσο και κατά τη διάρκεια της μεταποίησης και διανομής τους. Ωστόσο, η *Y. enterocolitica* σπάνια ανευρίσκεται σε προϊόντα με βάση το χοίρειο κρέας στο στάδιο της λιανικής πώλησης, με εξαίρεση τις νωπές χοιρινές γλώσσες. Επιπλέον, ο χειρισμός μολυσμένων χοιρινών στα κρεοπωλεία θεωρήθηκε η πηγή μόλυνσης για χοιρινό κιμά, που παρασκευάστηκε στα καταστήματα αυτά (Andersen et al., 1991, EFSA, The EFSA Journal (2007)).

Σε προϊόντα που έχουν ψηθεί επαρκώς ή παστεριωθεί ο μικροοργανισμός δεν επιβιώνει (τόσο τα παθογόνα όσο και τα μη παθογόνα στελέχη του). Λόγω όμως του ψυχοτροπικού χαρακτήρα της, στελέχη της *Y. enterocolitica* που ανευρίσκονται στο κρέας μπορούν να πολλαπλασιαστούν κατά τη διάρκεια της ψύξης. Η ικανότητά τους αυτή ενισχύεται ακόμη περισσότερο όταν επικρατούν υψηλές θερμοκρασίες (>5°C) και σε κρέας με υψηλό pH, όπου μπορεί να ανταγωνισθεί τη μικροχλωρίδα του κρέατος και να κυριαρχήσει. Σε αυτές τις περιπτώσεις, είναι δυνατή η επιμόλυνση προϊόντων και παρασκευασμάτων κρέατος από νωπό μολυσμένο με *Yersinia* κρέας (EFSA, 2007).

Μεταξύ της εμφάνισης Υερσινίωσης στον άνθρωπο και της κατανάλωση ωμού ή ατελώς ψημένου χοιρινού κρέατος ή κρέατος που δέχθηκε λανθασμένους χειρισμούς και επιμολύνθηκε υπάρχει σχέση που έχει αποδειχθεί σε μελέτες περιπτώσεων (GrahekOgden et al., 2007, Fredriksson-Ahomaa et al., 2006). Χρησιμοποιώντας μοριακές τεχνικές, στελέχη της *Y. enterocolitica* αιθ-θετικά ανιχνεύθηκαν τόσο σε νωπά δείγματα χοιρινού (φιλέτο, χοιρομοιρι, κιμάς) όσο και σε τελικά προϊόντα (Lambertz et al., 2005). Ωστόσο, τα ποσοστά απομόνωσης παθογόνων βιοορότυπων της *Y. enterocolitica* υπήρξαν χαμηλά, με εξαίρεση εκείνα των εδωδιμων χοιρινών εντόσθιων, στα οποία απομονώθηκε συνήθως ο βιοορότυπος 4/O:3.

3.1.β.ii Μηρυκαστικά και προϊόντα τους

Τα βοοειδή μπορούν να αποτελούν ασυμπτωματικούς φορείς της *Y.enterocolitica* O:9, αφού πολλά ζώα έχουν βρεθεί θετικά σε εξετάσεις που πραγματοποιήθηκαν σε πρόγραμμα παρακολούθησης της βρουκέλλωσης, λόγω διασταυρούμενης αντίδρασης με την *Y.enterocolitica* O:9.

Ο βιοορότυπος 5:O2 έχει απομονωθεί σε κοπάδια προβάτων και αιγών στην Ευρώπη αλλά και σε Νέα Ζηλανδία και Αυστραλία και ο ίδιος βιοορότυπος έχει απομονωθεί και από ανθρώπους που έρχονταν σε επαφή με τα ζώα αυτά.

Στελέχη της *Y.enterocolitica* έχουν απομονωθεί τόσο στο γάλα όσο και σε γαλακτοκομικά προϊόντα αλλά τα περισσότερα ήταν μη-παθογόνα. Λίγες αναφορές γίνονται για ανίχνευση παθογόνων στελεχών και πρόκληση ανθρώπινης ασθένειας σε παστεριωμένο γάλα και αυτές σχετίζονται με προβλήματα στη διαδικασία παστερίωσης ή με επιμόλυνση του τελικού προϊόντος (Ackers et al., 2000). Το παστεριωμένο γάλα αποτελεί ιδανικό μέσο ανάπτυξης επιτρέποντας τον πολλαπλασιασμό της ψυχοτρόπου *Y.enterocolitica* χωρίς την παρουσία ανταγωνιστών.

3.1.β.iii Πουλερικά

Οι βιοορότυποι της *Y.enterocolitica* 4:O3 και 2:O9 έχουν απομονωθεί από πουλερικά το 1985 στην Γερμανία. Έκτοτε δεν έχουν απομονωθεί παθογόνοι βιοορότυποι από πουλερικά (EFSA, 2007). Το 2005 ο Favier και οι συνεργάτες του (Favier et al., 2005) απομόνωσαν *Y.enterocolitica* βιοορότυπους 2:O9 από την επιφάνεια του κελύφους αυγών στην Αργεντινή. Η μόλυνση της επιφάνειας των αυγών πιθανόν να προήλθε από επαφή με άλλο ζωικό προϊόν μολυσμένο με τον βιοορότυπο αυτόν, κατά τη συλλογή τους, κατά τη μεταφορά τους, ακόμα και κατά τους χειρισμούς στο στάδιο της λιανικής πώλησης.

3.1.β iv Λαχανικά

Στην Ευρώπη έχουν απομονωθεί από συσκευασμένα έτοιμα για κατανάλωση (ready to eat) λαχανικά μη παθογόνα στελέχη της *Y.enterocolitica* βιότυπος 1A. Ειδικότερα, στη Φινλανδία, το 8% των δειγμάτων στο στάδιο της επεξεργασίας βρέθηκε θετικό, ενώ το 86% των δειγμάτων των μη συσκευασμένων λαχανικών στο στάδιο της λιανικής πώλησης βρέθηκαν θετικά (EFSA, 2007). Στην Κορέα, ο Lee και οι συνεργάτες του (Lee et al, 2004) απομόνωσαν θετικά-ail στελέχη της *Y.enterocolitica* βιότυπου 3:O3 από έτοιμα για κατανάλωση λαχανικά, αποδεικνύοντας έτσι ότι τα λαχανικά μπορούν να αποτελέσουν πηγή ανθρώπινης μόλυνσης.

3.1.β v Άλλες πηγές μόλυνσης

Μολύνσεις από βιοορότυπους 4:O3 της *Y.enterocolitica* έχουν παρατηρηθεί σε σκυλιά και γάτες και έχει ειπωθεί ότι τα ζώα αυτά μπορούν να αποτελούν ασυμπτωματικούς φορείς της εντεροπαθογόνου Υερσίνιας (Fredriksson-Ahomaa et al.,2001).

Τα τρωκτικά αποτελούν δεξαμενές του βιότυπου 1B (ορότυποι O:8 και O:21) στην Ιαπωνία και πιθανόν στην Βόρεια Αμερική, ενώ ο βιότυπος 3 είναι υπεύθυνος για εξάρσεις κρουσμάτων σε τσιντσιλά τόσο στην Αμερική όσο και στην Ευρώπη (EFSA, 2007).

Το μολυσμένο περιβάλλον μπορεί να θεωρηθεί και αυτό ως πιθανή πηγή μόλυνσης. Αν και τα περισσότερα στελέχη που απομονώθηκαν από περιβαλλοντικά δείγματα όπως νερό, χώμα, χόρτα, ήταν στην πλειονότητά τους μη παθογόνα ή ανήκαν στον βιότυπο 1^A. Ωστόσο, περιστασιακά, στελέχη βιοορότυπου 4:O3 έχουν απομονωθεί από νερά λυμάτων (Berzero et al., 1991, Sulakvelidze et al.,1996). Το πόσιμο νερό έχει ευρέως διερευνηθεί και έχει διαπιστωθεί ότι αποτελεί σημαντική δεξαμενή για μη παθογόνα στελέχη *Y.enterocolitica*. Παρόλα αυτά ο Sandery και οι συνεργάτες (Sandety et al., 1996) του ανίχνευσαν με την μέθοδο PCR παθογόνα στελέχη *Y.enterocolitica* σε περιβαλλοντικά νερά. Πρόσφατα, ο Falcao και οι συνεργάτες του (Falcao et al., 2004), εξέτασαν στελέχη της *Y.enterocolitica* που ελήφθησαν από νερά που δεν είχαν υποστεί

κάποιο είδος απολύμανσης, για την παρουσία παθογόνων γονιδίων. Στην έρευνα αυτή κατέληξαν ότι όλα τα στελέχη του ορότυπου O:5,27 κατείχαν τα γονίδια *inv*, *ail*, υποδεικνύοντας έτσι ότι το νερό που δεν έχει υποστεί κανενός είδος απολύμανσης μπορεί να προκαλέσει ανθρώπινη μόλυνση με *Y.enterocolitica*.

Στην Ευρώπη, πολύ λίγες περιπτώσεις μόλυνσης με *Y.enterocolitica* λόγω πόσης μολυσμένου νερού έχουν αναφερθεί (Christensen, 1979).

3.2 Τρόποι μετάδοσης

Η πιο κοινή οδός μετάδοσης της παθογόνου *Y.enterocolitica* είναι η κοπρανο-στοματική μέσω μολυσμένων τροφίμων, ενώ η άμεση από άνθρωπο σε άνθρωπο επαφή παρατηρείται σπάνια. Λοιμώξεις *Y.enterocolitica* O:3 παρατηρήθηκαν σε βρέφη που εκτέθηκαν σε λοίμωξη από τις μητέρες τους (Lee et al., 1990), λόγω κυρίως ανεπαρκών μέτρων υγιεινής από την πλευρά τους. Το 2006, στην Ιαπωνία παρατηρήθηκε έξαρση κρουσμάτων *Y.enterocolitica* βιοορότυπος 2/O:9 σε μια οικογένεια, λόγω μετάδοσης από άνθρωπο σε άνθρωπο. Η πιθανή πηγή της μόλυνσης αυτής αποτέλεσε μολυσμένος φορέας που εμφάνιζε διάρροια (Moriki et al., 2010). Επιπρόσθετα, μια έξαρση διαρροϊκής ασθένειας λόγω *Y.enterocolitica* 1/O:5 παρατηρήθηκε σε νοσοκομειακούς ασθενείς, γεγονός από αποτέλεσε ένδειξη για ενδονοσοκομειακή έξαρση λόγω της *Y.enterocolitica* (Ratnam et al., 1982). Έμμεση μετάδοση από άνθρωπο σε άνθρωπο έχει παρατηρηθεί ορισμένες φορές λόγω μετάγγισης μολυσμένου αίματος (Bottone, 1999).

Άμεση επαφή ανθρώπων με χοίρους και μετάδοση της παθογόνου *Y.enterocolitica* από τους χοίρους δεν έχει ακόμα αποδειχθεί. Η κύρια πηγή ανθρώπινης μόλυνσης θεωρούνται το χοιρινό κρέας και τα προϊόντα του. Η παθογόνος *Y.enterocolitica* μπορεί να μεταδοθεί από τα σφαγεία στις επιχειρήσεις επεξεργασίας κρέατος και από εκεί στις επιχειρήσεις λιανικής πώλησης, μέσω των μολυσμένων χοίρειων σφάγιων και εντόσθιων (Fredriksson-Ahomaa et al., 2004, Fredriksson-Ahomaa et al., 2001). Μολυσμένο χοιρινό κρέας και εντόσθια θεωρούνται σημαντικές πηγές μετάδοσης από τα καταστήματα λιανικής πώλησης στους ανθρώπους (Fredriksson-Ahomaa et al., 2001). Επιμόλυνση των εντοσθίων και του χοιρινού κρέατος μπορεί να προέλθει άμεσα ή έμμεσα μέσω του εξοπλισμού, του αέρα, των χειριστών τροφίμων στα σφαγεία, στα

καταστήματα λιανικής πώλησης και στις οικιακές κουζίνες (Fredriksson-Ahomaa et al., 2000, Fredriksson-Ahomaa et al., 2004).

Η ανίχνευση της παθογόνου *Y.enterocolitica* στα ωμά χοιρινά προϊόντα είναι συχνή. Ωστόσο η κατανάλωση ωμού χοιρινού κρέατος δεν συνηθίζεται στις περισσότερες ανεπτυγμένες χώρες, και επομένως ο ρόλος της στην εμφάνιση Υερσινίωσης δεν είναι σημαντικός, αν και στη Γερμανία είναι συνηθισμένη γαστρονομική λιχουδιά η κατανάλωση ωμού χοιρινού κιμά με κρεμμύδι και πιπέρι, που μπορεί να αγορασθεί από τα κρεοπωλεία σε μορφή για απευθείας κατανάλωση. Η μετάδοση συμβαίνει κυρίως, μέσω ατελώς ψημένου χοιρινού ή προϊόντων του, ή μέσω λανθασμένων χειρισμών που επιφέρουν την μόλυνσή του.

Έμμεση μετάδοση υερσινίωσης στον άνθρωπο θεωρείται ότι μπορεί να πραγματοποιηθεί και από την στενή επαφή των ανθρώπων, κυρίως των παιδιών, με τα κατοικίδια ζώα (Wang et al., 2010). Η παθογόνος *Y.enterocolitica* μπορεί να μεταδοθεί εμμέσως από χοιρινό κρέας και εντόσθια μέσω των σκύλων και των γατών. Έρευνα στη Φινλανδία έδειξε ότι σκυλιά και γάτες που τρέφονταν με ωμό χοιρινό κρέας και προϊόντα που είναι μολυσμένα σε μεγάλο βαθμό με παθογόνα στελέχη της *Y.enterocolitica* 4/O:3 μπορούν να μολυνθούν με τα στελέχη αυτά (Fredriksson-Ahomaa et al., 2001). Επομένως, τόσο τα σκυλιά όσο και οι γάτες θα πρέπει να θεωρούνται ως σημαντικός ενδιάμεσος κρίκος στη μετάδοση παθογόνου *Y.enterocolitica* μεταξύ των χοίρων και των ανθρώπων και κυρίως των παιδιών (Wang et al., 2010).

3.3 Επιπτώσεις στον άνθρωπο

Η *Y.enterocolitica* έχει συχνά απομονωθεί από πολλά τρόφιμα, αλλά η πρόκληση τροφιμογενών εξάρσεων είναι σπάνια και οι περισσότερες μολύνσεις είναι σποραδικές (EFSA Journal 2011). Η μόλυνση του ανθρώπου με το βακτήριο του γένους *Yersinia* ονομάζεται υερσινίωση και ειδικότερα η μόλυνση με την *Y.enterocolitica* αποτελεί την τρίτη σε σειρά καταγραφής ζωνόσο στην Ευρώπη μετά την σαλμονέλλωση και την καμπυλοβακτηριδίαση (EFSA, ECDC 2011).

Η σοβαρότητα των συμπτωμάτων που προκαλεί πιστεύεται ότι είναι δοσοεξαρτώμενη. Ωστόσο, η ακριβής μολυσματική δόση δεν έχει διαπιστωθεί ακόμη. Διάφορες έρευνες προτείνουν ότι είναι υψηλή στους ενήλικες, πιθανώς $>10^4$ κύτταρα και μικρότερη σε βρέφη και σε ανοσοκατεσταλμένους (Robins-Browne, 1997).

Η μόλυνση με την *Y.enterocolitica* μπορεί να προκαλέσει ποικιλία συμπτωμάτων που σχετίζεται με την ηλικία του ανθρώπου που μολύνθηκε, τη φυσική του κατάσταση, ή τον βιορότυπο που σχετίζεται. Πιο συγκεκριμένα, η γαστερεντερίτιδα είναι ο πιο συχνός τύπος της υερσινίωσης και παρατηρείται πιο συχνά σε παιδιά ηλικίας μικρότερης των 5 ετών (ECDC, 2010). Χαρακτηριστικά της είναι η διάρροια, που σε σοβαρές περιπτώσεις μπορεί να είναι αιμορραγική, ο χαμηλός πυρετός και ο κοιλιακός πόνος που μπορεί να διαρκέσει από μία έως τρεις εβδομάδες. Τα συμπτώματα εμφανίζονται μετά από μια περίοδο επώασης που κυμαίνεται από μία έως έντεκα ημέρες, και μπορούν να διαρκέσουν μέχρι και μήνες σε περίπτωση επιπλοκών (Nesbakeen, 2006, HMSO. 1994). Η σηψαιμία μπορεί να αποτελέσει σπάνιο εύρημα σε νεογνά (κάτω του ενός έτους) μολυσμένα από ορότυπο O:3.

Σε μεγαλύτερα παιδιά και νεαρούς ενήλικες κυρίως συμπτώματα θεωρούνται ο πυρετός και ο κοιλιακός πόνος στο κάτω δεξιό τεταρτημόριο της κοιλιακής χώρας, που συχνά συγχέονται με το σύνδρομο της οξείας σκωληκοειδίτιδας, ενώ λιγότερο συχνά παρατηρούνται ναυτίες, διάρροιες και έμετοι. Σε παρατεταμένες περιπτώσεις θανατηφόρα νεκρωτική εντεροκολίτιδα ή μια μορφή ψευδο-όγκου πυώδους αδενίτιδας μπορεί να προκύψει, ακόμα και σε παιδιά. Στις Η.Π.Α. οι πιο επιθετικές μορφές της μόλυνσης από *Y.enterocolitica* έχουν συσχετιστεί με τον ορότυπο O:8, ενώ οι ηπιότερες με τον βιορότυπο 4/O:3, που είναι το πιο κοινό αίτιο πρόκλησης εντερικής υερσινίωσης σε παγκόσμιο επίπεδο (Ostroff, 1995).

Η σηψαιμία που προκαλείται από την *Y.enterocolitica* μπορεί να παρατηρηθεί σε φυσιολογικούς ανθρώπους, σε ανοσοκατεσταλμένους αλλά και σε άτομα με υποκείμενες ασθένειες, όπως όταν έχουμε υπερφόρτωση σιδήρου (Blei and Puder, 1993). Μεταστάσεις σε άλλα σημεία του σώματος μπορούν να επιπλέξουν την πορεία της σηψαιμίας ή να επικεντρωθούν στο ενδοαγγειακό και να οδηγήσουν ανεύρυσμα βακτηριακής αιτιολογίας. Το μολυσματικό στέλεχος μπορεί να αποκτηθεί είτε από το στόμα είτε με τη μετάγγιση αίματος, λόγω παροδικής ή λανθάνουσας βακτηριαμίας που

μπορεί να επικρατεί σε αίμα δοτών με προγενέστερη μόλυνση από *Y.enterocolitica* (Bottone, 1997, Hoogkamp-Korstanje, et al.,1988).

Μολύνσεις με *Y.enterocolitica* και κυριότερα με ορότυπους O:3 και O:9, συχνά οδηγούν σε δευτερογενείς ανοσολογικές καταστάσεις όπως αρθρίτιδα (συνχρότερα), οζώδες ερύθυμα, σπειραματονεφρίτιδα, και μυοκαρδίτιδα. Οι δύο τελευταίες επιπλοκές σχετίζονται με το αντιγόνο HLA-B27 (Bottone,1997). Το οζώδες ερύθυμα εμφανίζεται ως επώδυνες υψωμένες κόκκινες ή μωβ χρώματος δερματικές αλλοιώσεις, κυρίως στα κάτω άκρα. Οι αλλοιώσεις παρατηρούνται δύο έως είκοσι ημέρες μετά την έναρξη του πυρετού και του κοιλιακού πόνου και εξαφανίζονται απότομα τις περισσότερες φορές σε περίπου ένα μήνα. Σε ό,τι αφορά την αρθρίτιδα, εμφανίζεται κυρίως στις μεγάλες αρθρώσεις των κάτω άκρων και τα συμπτώματα αρχίζουν μία έως δύο εβδομάδες μετά τα γαστρεντερικά συμπτώματα και παραμένουν για χρονικό διάστημα ενός έως τεσσάρων μηνών.

Κεφάλαιο 4. Πειραματικό Μέρος

4.1 Σκοπός της διπλωματικής εργασίας

Σύμφωνα με το θέμα της παρούσας διπλωματικής εργασίας πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία και εργαστηριακή διερεύνηση δειγμάτων κιμά διαφόρων χαρακτηριστικών (νωπός - κατεψυγμένος, εγχώριος-εισαγόμενος, βόειος - χοιρινός κτλ.) τα οποία συλλέχθηκαν από καταστήματα λιανικής πώλησης του προϊόντος (κρεοπωλεία, σούπερ μάρκετ) εντός της πόλης της Λάρισας, με έμφαση στην καταμέτρηση της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας και στην ανίχνευση της παρουσίας της *E.coli* O157:H7 και της *Yersinia enterocolitica*.

Σκοπός αυτής της μελέτης είναι:

- Η παρατήρηση των επικρατούντων μικροβιολογικών χαρακτηριστικών του κιμά εμπορίου, με έμφαση παρουσίας *E.coli* O157:H7 και *Yersinia enterocolitica*.
- Η διερεύνηση των πιθανών αιτιών τυχόν αποκλίσεων, η αναζήτηση τρόπων αντιμετώπισης και πρόληψής τους.
- Η εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με τον απαιτούμενο χειρισμό των τροφίμων από τους καταναλωτές.
- Η διερεύνηση της δυνατότητας πιθανής υιοθέτησης ξένων διατροφικών συνηθειών.

4.2 Δειγματοληψία

Η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε από καταστήματα λιανικής πώλησης κρέατος και παρασκευασμάτων κρέατος (κρεοπωλεία, σούπερ μάρκετ) εντός της πόλης της Λάρισας. Η επιλογή των καταστημάτων πραγματοποιήθηκε με τη διαδικασία της απλής τυχαίας δειγματοληψίας από τον ειδικό κατάλογο των μελών του Επιμελητηρίου Λάρισας (κωδικός 10103: Κρεοπωλεία). Ο ειδικός κατάλογος περιελάμβανε 286 επιχειρήσεις για τις οποίες υπήρξε αντιστοίχιση με αύξοντες αριθμούς 1 έως 286 και επιλέχθηκαν πραγματικά τυχαίοι (true random) αριθμοί μέσα από κατάλληλη ιστοσελίδα (www.random.org). Κατ' αυτόν τον τρόπο αποφεύγεται πιθανό συστηματικό λάθος που θα μπορούσε να προκύψει αν επιλέγονταν πολλά δείγματα από λίγες μονάδες πωλήσεως και οι οποίες μπορεί να παρουσίαζαν κάποιο μεμονωμένο πρόβλημα υγιεινής και το οποίο θα αλλοίωνε τα αποτελέσματα.

Κατά τη δειγματοληψία πάρθηκε από κάθε κατάστημα ποσότητα 200 gr από διαθέσιμο τύπο κιμά (βόειος - χοιρινός, νωπός - κατεψυγμένος), ποσότητα αρκετή να ικανοποιήσει τις απαιτήσεις του Ευρωπαϊκού κανονισμού 2073/2005 όπως αυτός τροποποιήθηκε από τον κανονισμό 1441/2005 για τον έλεγχο των μικροβιολογικών κριτηρίων. Η αποθήκευση και μεταφορά των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε κατά ISO 7218 (Μικροβιολογία τροφίμων και ζωοτροφών - Γενικοί κανόνες για τις μικροβιολογικές εξετάσεις), διατηρώντας τη ψυκτική αλυσίδα μέχρι την προσκόμιση στο εργαστήριο με χρήση ειδικών μέσων (ισοθερμικά δοχεία και παγοκύστες). Αξίζει να αναφερθεί ότι στη περίπτωση του νωπού κιμά, τα δείγματα πρέπει να συντηρούνται στην ψύξη και να εξετάζονται μέσα σε 24 ώρες. Εάν η συντήρησή τους επί μεγαλύτερο χρονικό διάστημα είναι αναπόφευκτη, πρέπει να καταψύχονται το ταχύτερο (στην περίπτωση αυτή, η κατάψυξη, η θερμοκρασία και ο χρόνος συντήρησης στην κατάψυξη, πρέπει να αναφέρονται στην αναφορά των αποτελεσμάτων). Όσον αφορά τον κατεψυγμένο κιμά τα δείγματα πρέπει να φθάνουν στο εργαστήριο κατεψυγμένα και σε κάθε περίπτωση, σε θερμοκρασία -18°C ή μικρότερη. Τα δείγματα αυτά συντηρούνται στην κατάψυξη.

Ειδικό δελτίο δειγματοληψίας συντάχθηκε στο οποίο κατά τη διαδικασία αναγράφονταν τα στοιχεία του καταστήματος (κρεοπωλείο - σούπερ μάρκετ), τα χαρακτηριστικά του κιμά υπό δειγματοληψία (είδος ζώου, νωπός - κατεψυγμένος, εγχώριος - εισαγόμενος), καθώς και ένας χώρος καταγραφής σχολίων σχετικά με την απαιτούμενη τήρηση των

κανόνων υγιεινής κατά τη παραγωγή του κιμά, όπως έχουν οριστεί σύμφωνα με τις απαιτήσεις των αρχών HACCP και αναγράφονται στον Οδηγό Υγιεινής του ΕΦΕΤ (Οδηγός Νο4) για τα κρεοπωλεία.

4.3 Αρίθμηση ολικής μεσόφιλης χλωρίδας

Η μέτρηση της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας (OMX) αποτελεί κριτήριο υγιεινής το οποίο εφαρμόζεται σύμφωνα με τον Ευρωπαϊκό Κανονισμό 2073/2005, όπως τροποποιήθηκε από τον κανονισμό 1441/2007, κατά το τέλος της διαδικασίας παραγωγής του κιμά και σε περίπτωση μη ικανοποιητικών αποτελεσμάτων υποδηλώνει την ανάγκη βελτίωσης στην υγιεινή της παραγωγής καθώς και στην επιλογή ή/και την προέλευση των πρώτων υλών. Η μέτρηση της OMX πραγματοποιήθηκε κατά το πρότυπο ISO 4833 όπως επιβάλλει ο Ευρωπαϊκός κανονισμός 2073/2005. Το κριτήριο αυτό δεν εφαρμόζεται εάν ο παραγόμενος κιμάς παράγεται λιανικά και διατηρείται για χρόνο μικρότερο των 24 ωρών.

Ακολουθεί η αναλυτική περιγραφή της εφαρμοζόμενης μεθοδολογίας.

4.3.1 Εξεταζόμενη ποσότητα του δείγματος και αρχική αραίωση

Ζυγίζονται σε σακούλα ομογενοποιητή (stomacher) 25 gr δείγματος κιμά για να προστεθεί εν συνεχεία αραιωτικό όγκου 225 ml. Το αραιωτικό θα είναι το Peptone Water (PW, 1 gr πεπτόνης σε 1000 ml νερό, με ρύθμιση του pH στο $7,2 \pm 0,1$ και αποστείρωση στους $121 \pm 1^\circ\text{C}$ για 15'). Ακολουθεί η ομογενοποίηση σε ομογενοποιητή (stomacher). Μετά την ομογενοποίηση, η αραίωση πρέπει να αφήνεται μέχρι 15 λεπτά, εάν είναι αναγκαίο, ώστε να καθιζάνουν τα μεγάλα σωματίδια.

4.3.2 Επόμενες αραιώσεις

Ένα ml της αρχικής αραιώσης (10^{-1}), μεταφέρεται σε δοκιμαστικό σωλήνα ο οποίος περιέχει 9 ml PW, κατάλληλης θερμοκρασίας και αναμιγνύεται ώστε να ληφθεί η δεύτερη αραιώση (10^{-2}). Εάν είναι απαραίτητο, η διαδικασία επαναλαμβάνεται για να ληφθούν περισσότεροι από ένας σωλήνες της ίδιας αραιώσης. Στην περίπτωση της OMX, γνωρίζοντας ότι τα όρια της νομοθεσίας κυμαίνονται μεταξύ 5×10^5 - 5×10^6 cfu/gr τροφίμου και με γνωστό ότι θεωρούνται αξιολογήσιμα αποτελέσματα όταν καταμετρούνται σε ένα τρυβλίο 15 έως 300 αποικίες, γίνεται εύκολα κατανοητό ότι οι αραιώσεις που μας ενδιαφέρουν θα είναι της τάξεως μέχρι 10^{-6} . Γενικά, οι αραιώσεις πρέπει παρασκευάζονται στον ελάχιστο δυνατό χρόνο, και οι ενοφθαλμισμοί στα καλλιεργητικά υποστρώματα να γίνονται εντός 45 λεπτών από την αρχική αραιώση.

4.3.3 Ενσωμάτωση σε PCA και επώαση

Παρασκευάζεται διπλή σειρά τρυβλίων (δηλαδή δύο τρυβλία για κάθε εξεταζόμενη αραιώση του τροφίμου). Τα δύο πρώτα τρυβλία ενοφθαλμίζονται με 1 ml της πρώτης δεκαδικής αραιώσης του τροφίμου. Ο ενοφθαλμισμός γίνεται με σιφώνιο ολικής διανομής. Από κάθε επόμενη δεκαδική αραιώση του τροφίμου, ποσότητα 1 ml ενοφθαλμίζεται σε καθένα από τα δύο τρυβλία της σειράς. Ο ενοφθαλμισμός γίνεται με τον ίδιο τρόπο, με νέο σιφώνιο.

Σε κάθε τρυβλίο προστίθενται άσηπτα, 15 ml υποστρώματος PCA θερμοκρασίας $45 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Αναμιγνύεται πολύ καλά το λιωμένο υπόστρωμα και το ενοφθάλμισμα, ώστε να προκύψει ομοιόμορφη διασπορά των μικροοργανισμών μέσα στη μάζα του υποστρώματος.

Τα τρυβλία αφήνονται για λίγη ώρα να στεγνώσουν στον πάγκο, αναστρέφονται και επωάζονται στους 30°C επί 72 ± 3 ώρες.

Plate Count Agar (PCA)

Σύνθεση:

- Tryptone	5,0 gr
- Dehydrated yeast extract	2,5 gr
- Anhydrous glucose	1,0 gr
- Agar	12 έως 18 gr
- Water	1000 ml

Διαλύονται τα συστατικά στο νερό, με θέρμανση.

Ρυθμίζεται το pH, εάν χρειάζεται, ώστε μετά την αποστείρωση να είναι 7,0 στους 25°C.

Διανέμεται σε φιάλες χωρητικότητας έως 500 ml σε ποσότητες που να μην ξεπερνούν το μισό του όγκου της φιάλης.

Ακολουθεί αποστείρωση με υγρή αποστείρωση στους 121°C για δεκαπέντε λεπτά της ώρας.

4.3.4 Αρίθμηση αποικιών

Επιλέγονται τα τρυβλία δύο διαδοχικών αραιώσεων που περιέχουν λιγότερες από 300 αποικίες. Είναι απαραίτητο, τουλάχιστον ένα από τα τρυβλία να περιέχει τουλάχιστον 15 αποικίες.

Ο αριθμός N των μικροοργανισμών που είναι παρόντες ανά gr δείγματος (προκειμένου για στερεά), υπολογίζεται χρησιμοποιώντας την ακόλουθη εξίσωση:

Σc

$$N = \frac{\Sigma c}{(n_1 + 0,1n_2)d}$$

όπου:

- Σc Το σύνολο των αποικιών που αριθμήθηκαν σε όλα τα τρυβλία, τα οποία λήφθηκαν από δύο διαδοχικές αραιώσεις, τουλάχιστον μία από τις οποίες περιείχε 15 αποικίες.
- n_1 Ο αριθμός των τρυβλίων των οποίων οι αποικίες αριθμήθηκαν, από την πρώτη αραιώση.
- n_2 Ο αριθμός των τρυβλίων των οποίων οι αποικίες αριθμήθηκαν, από τη δεύτερη αραιώση.
- d Ο συντελεστής αραιώσης, της πρώτης αραιώσης από την οποία αριθμήθηκαν αποικίες.

Τα αποτελέσματα που υπολογίσθηκαν, στρογγυλοποιούνται στα δύο πρώτα ψηφία. Εάν το τελευταίο ψηφίο είναι μικρότερο του 5, το προηγούμενο ψηφίο δεν τροποποιείται, ενώ εάν είναι ίσο ή μεγαλύτερο του 5, το προηγούμενο ψηφίο αυξάνεται κατά μία μονάδα.

Το αποτέλεσμα εκφράζεται ως αριθμός μικροοργανισμών ανά 1 gr ή ανά 1 ml τροφίμου, με τη μορφή αριθμού μεταξύ 1,0 και 9,9, που υψώνεται στην κατάλληλη δύναμη του 10. Π.χ. ο αριθμός 19.182 στρογγυλοποιείται σε 19.000, ή $1,9 \times 10^4$ /ml ή gr.

4.4 Ανίχνευση *E.coli* O157:H7

Για την ανίχνευση της *E.coli* O157:H7 χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος VIDAS UP *E.coli* O157 (συμπεριλαμβανομένου και του H7) (ECPT). Πρόκειται για μία γρήγορη μέθοδο ανίχνευσης της *E. coli* O157, που στηρίζεται σε αυτοματοποιημένη ανοσολογική μέθοδο. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιεί δύο μονάδες μίας χρήσεως: i) μία μικρή πιπέτα (φάση SPR) για την ανοσοδέσμευση των *E.coli* O157 βακτηρίων από τα εμπλουτισμένα δείγματα τροφίμων και ii) μία πλαστική ταινία που διαθέτει βυθίσματα για τα δείγματα και στην οποία είναι προεγκατεστημένα διαλύματα πλύσης.

Το αποτέλεσμα της παραπάνω τεχνικής είναι το αντίσωμα να δεσμεύσει το παθογόνο-στόχος και στη συνέχεια ένα δεύτερο αντίσωμα συνδεδεμένο με χρωμογόνο ένζυμο (αλκαλική φωσφατάση) να προσκολληθεί στο δεσμευμένο παθογόνο (δοκιμασία sandwich) και η ένταση του φθορισμού να ερμηνευτεί από τη συσκευή Vidas.

Σύμφωνα με την διαπιστευμένη μέθοδο AFNOR:

- Είκοσι πέντε γραμμάρια κιμά λαμβάνονται ασηπτικά από το δείγμα και τοποθετούνται σε σακούλα τύπου Stomacher με φίλτρο.
- Προστίθενται 225 gr Buffered Peptone Water προθερμασμένα στους $41,5 \pm 1^\circ\text{C}$
- Ακολουθεί ομογενοποίηση σε τύπου Stomacher μηχανήμα
- Στη συνέχεια τοποθετείται για επώαση στους $41,5 \pm 1^\circ\text{C}$ για 6-24 ώρες
- Μετά την επώαση, ακολουθεί ομογενοποίηση του περιεχομένου της σακούλας τύπου Stomacher
- Εφόσον γίνεται χρήση υδατόλουτρου, μεταφέρουμε 1-2 ml του εμπλουτισμένου ζωμού σε σωλήνα. Κλείνουμε καλά το σωλήνα και βράζουμε για πέντε λεπτά στους $95-100^\circ\text{C}$. Στη συνέχεια, αφήνουμε το σωλήνα να κρυώσει χωρίς να γίνει ανάδευση.
- Μεταφέρουμε 0,5 ml του βραστού ζωμού στο βύθισμα της ταινίας του VIDAS.
- Ξεκινάει η διαδικασία της συσκευής VIDAS.

Το αποτέλεσμα της εξέτασης δίδεται ως το πηλίκο της σχετικής τιμής φθορισμού (RFV) του δείγματος προς τη σχετική τιμή φθορισμού του πρότυπου. Αποτέλεσμα τιμής μεγαλύτερο ή ίσο του 0,04 θεωρείται θετικό και ότι το δείγμα είναι μολυσμένο με *E.coli* O157.

Αποτέλεσμα τιμής μικρότερης του 0,04 αποδεικνύει ότι το δείγμα δεν είναι μολυσμένο με *E.coli* O157 ή περιέχει σε συγκέντρωση μικρότερη του ορίου ανίχνευσης.

4.4.1 Επιβεβαίωση της *E.coli* O157:H7

Τα θετικά δείγματα της δοκιμής VIDAS UP *E.coli* O157 επιβεβαιώθηκαν με επώαση σε εκλεκτικό υπόστρωμα CT-SMAC στους 37°C για 18-24 ώρες. Ακολούθως, πέντε τυπικές αποικίες ύποπτες μεταφέρθηκαν σε θρεπτικό ζωμό (Nutrient agar) και επώαστηκαν στους 37°C για 18-24 ώρες. Μετά την επώαση ακολούθησαν επιβεβαιωτικές δοκιμές, τόσο βιοχημικές με API 20E όσο και ορολογικές με δοκιμή συγκόλλησης με ειδικό ορό (Latex test).

CT-SMAC

Σύνθεση

- Tryptone.....	17,0 gr
- Peptic digest of meat	3,0 gr
- D-Sorbitol	10,0 gr
- Bile salts n°3	1,5 gr
- Sodium chloride	5,0 gr
- Neutral red	30,0 mg
- Crystal violet.....	1,0 mg
- Cefixime	0,050 mg

- Potassium tellurite.....2,5 mg
- Bacteriological agar13,5 gr

Το pH του έτοιμου υποστρώματος θα πρέπει να ρυθμιστεί στο $7,1 \pm 0,2$. στους 25°C

Nutrient agar :

- Meat extract 3,0 g
- Peptone 5,0 g
- Agar 8,0 έως 18,0 g*
- Water 1000 ml

*ανάλογα τη δύναμη της γέλης του agar

Διαλύουμε τα συστατικά στο νερό και ρυθμίζουμε το pH στο 7,0. Η αποστείρωση γίνεται στους 121°C για 15 λεπτά και αφού κρυώσει το υλικό στους 45°C το μοιράζουμε σε τρυβλία.

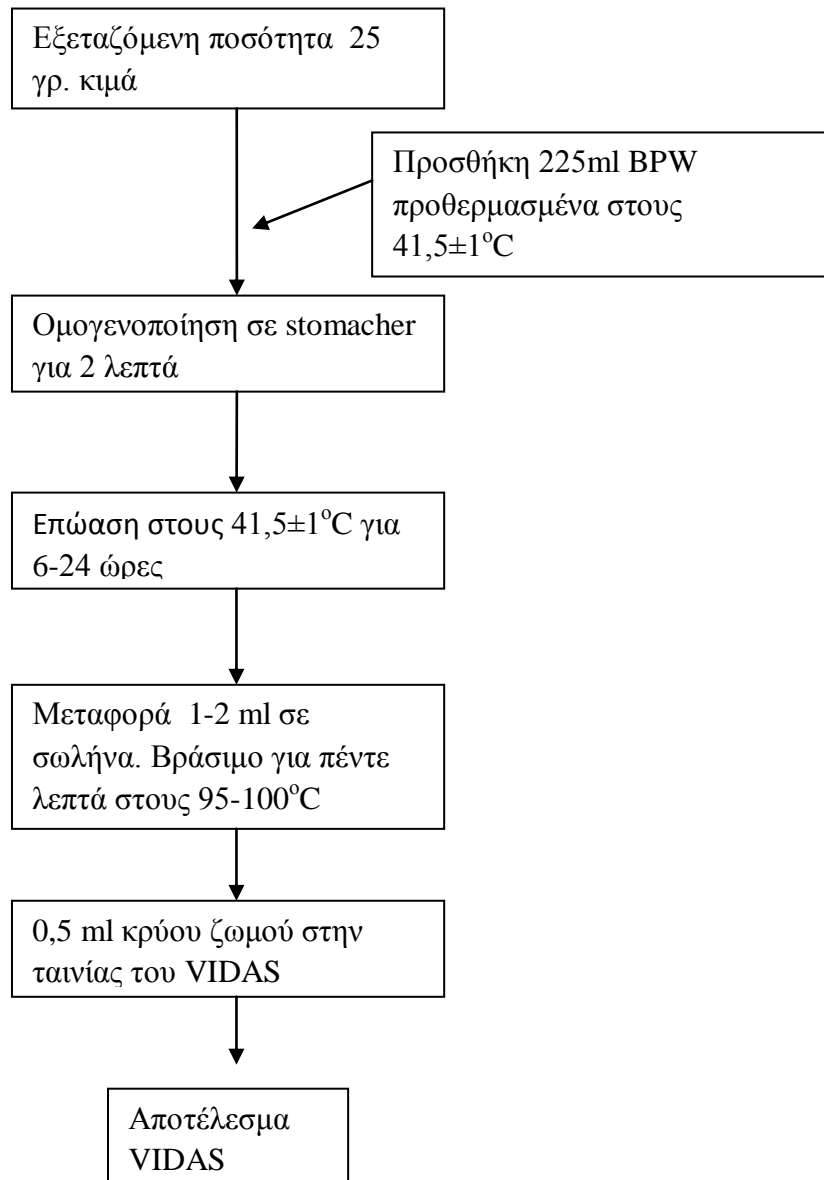
Πριν τη χρήση, ξηραίνουμε τα τρυβλία Petri σε φούρνο θερμοκρασίας μεταξύ των 37°C και 55°C , μέχρι η επιφάνεια του άγαρ να γίνει ξηρή.

Buffered peptone water

- Peptone 10,0 gr
- Sodium chloride (NaCl) 5,0 gr
- Disodium hydrogen phosphate dodecahydrate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) 9,0 gr
- Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) 1,5 gr
- Distilled water 1000ml

Διαλύουμε τα συστατικά στο νερό θερμαίνοντας ήπια, προσέχοντας να μη βράσει το υλικό. Ρυθμίζουμε το pH στο $7,2 \pm 0,1$ και μοιράζουμε το υλικό μέσα σε γυάλινες φιάλες ή σωλήνες. Αποστειρώνουμε στους $121 \pm 1^\circ\text{C}$ για 15 λεπτά.

Διάγραμμα 1. Ανίχνευση *E.coli* O157:H7



4.4.2 Βιοχημική επιβεβαίωση μέσω API 20E

i) Παρασκευή του ενοφθαλμίσματος

- Ανοίγουμε μία αμπούλα του API NaCl medium 0,85% (5 ml) ή μία αμπούλα API Suspension medium ή χρησιμοποιούμε οποιοδήποτε αμπούλα περιέχει 5 ml στείρου φυσιολογικού ορού ή αποστειρωμένο αποσταγμένο νερό, χωρίς τα πρόσθετα.
- Με τη βοήθεια πιπέτας ή PSIpette αφαιρούμε μόνο μία καλά απομονωμένη αποικία από το τρυβλίο Petri. Συνιστάται η χρήση νέων καλλιεργιών (18-24 ωρών)
- Προσεκτικά, διαλύουμε την αποικία για να επιτύχουμε ομοιόμορφη βακτηριολογική κατανομή στο διάλυμα.
- Το διάλυμα θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί αμέσως μετά την προετοιμασία του.

ii) Ενοφθαλμισμός της ταινίας API 20E

- Χρησιμοποιώντας την ίδια πιπέτα γεμίζουμε τόσο τους σωλήνες όσο και τα κύπελλα των δοκιμών CIT, VP, GEL με το βακτηριακό εναιώρημα.
- Γεμίζουμε μόνο τους σωλήνες για όλες τις άλλες δοκιμές.
- Δημιουργούμε συνθήκες αναερόβιες στις δοκιμές ADH, LDC, ODC, H₂S και URE επικαλύπτοντάς τες με ορυκτέλαιο.
- Κλείνουμε το κιβώτιο επώασης
- Επωάζουμε στους 36±2⁰C για 18-24 ώρες

4.4.3 Ερμηνεία των αποτελεσμάτων της ταινίας API 20E

Η ερμηνεία επιτυγχάνεται με τη χρήση αριθμητικού προφίλ.

- Προσδιορισμός του αριθμητικού προφίλ: στο φύλλο αποτελέσματος οι δοκιμές χωρίζονται σε ομάδες των τριών και μία τιμή 1 ή 2 ή 4 ορίζεται για την κάθε μία δοκιμή. Αθροίζοντας τις τιμές της κάθε ομάδες ξεχωριστά προκύπτει ένας επταψήφιος αριθμός για όλες τις είκοσι δοκιμές της ταινίας API 20E. Η αντίδραση της οξειδάσης αποτελεί την εικοστή πρώτη δοκιμή και λαμβάνει την τιμή 4 εάν είναι θετική.
- Αναγνώριση: πραγματοποιείται με τη χρήση της βάσης δεδομένων (V4.0)
 - 1) με τη χρήση του αναλυτικού προφίλ δείκτης, όπου γίνεται αναζήτηση του αριθμητικού προφίλ στη λίστα των προφίλ
 - 2) με το λογισμικό αναγνώρισης, όπου πληκτρολογούμε τον επταψήφιο αριθμό με τη βοήθεια του πληκτρολογίου.

Πίνακας 5. Ανάγνωση αποτελεσμάτων της ταινίας API 20E για E.coli

ΔΟΚΙΜΗ	ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ	ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΥ ΕΛΕΓΧΕΤΑΙ	(-) ΑΡΝΗΤΙΚΟ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ	(+)ΘΕΤΙΚΟ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ
ONPG	ONPG	beta-galactosidase	Άχρωμο	Κίτρινο
ADH	arginine	arginine dihydrolase	Κίτρινο	Κόκκινο/πορτοκαλί
LDC	lysine	lysine decarboxylase	Κίτρινο	Κόκκινο/πορτοκαλί
ODC	ornithine	ornithine decarboxylase	Κίτρινο	Κόκκινο/πορτοκαλί
CIT	citrate	citrate utilization	Απαλό πράσινο/κίτρινο	Μπλε-πράσινο/μπλε
H ₂ S	Na thiosulfate	H ₂ S production	Άχρωμο/γκρι	Μαύρη εναπόθεση
URE	urea	urea hydrolysis	Κίτρινο	Κόκκινο/πορτοκαλί
TDA	tryptophan	deaminase	Κίτρινο	καστανοκόκκινο

IND	tryptophan	indole production	Κίτρινο	Κόκκινο (δύο λεπτά)
VP	Na pyruvate	acetoin production	Άχρωμο	Ροζ/κόκκινο(δέκα λεπτά)
GEL	charcoal gelatin	gelatinase	Καθόλου διάχυση του μαύρου	Διάχυση του μαύρου
GLU	glucose	fermentation/oxidation	Μπλε/πρασino- μπλε	κίτρινο
MAN	mannitol	fermentation/oxidation	Μπλε/πρασino	κίτρινο
INO	inositol	fermentation/oxidation	Μπλε/πρασino	κίτρινο
SOR	sorbitol	fermentation/oxidation	Μπλε/πρασino	κίτρινο
RHA	rhamnose	fermentation/oxidation	Μπλε/πρασino	κίτρινο
SAC	sucrose	fermentation/oxidation	Μπλε/πρασino	κίτρινο
MEL	melibiose	fermentation/oxidation	Μπλε/πρασino	κίτρινο
AMY	amygdalin	fermentation/oxidation	Μπλε/πρασino	κίτρινο
ARA	arabinose	fermentation/oxidation	Μπλε/πρασino	κίτρινο
OX	oxidase	oxidase	Άχρωμο/κίτρινο	βιολετί

4.4.4 Ορολογική επιβεβαίωση *E.coli* O157 (Latex test)

Για την ορολογική επιβεβαίωση αρχικά λαμβάνουμε αποικίες που δεν ζυμώνουν τη σορβιτόλη σε CT-SMAC άγαρ.

Ακολουθεί η μέθοδος της δοκιμής:

1. Τα σωματίδια λάτεξ-αντιδραστήρια έρχονται σε θερμοκρασία δωματίου. Τα παραπάνω αντιδραστήρια αποτελούνται από μπλέ σωματίδια που έχουν ευαισθητοποιηθεί με συγκεκριμένα αντίσωμα κουνελιού, που έχει παραχθεί από το σωματικό αντιγόνο O157.

2. Ρίχνουμε μία σταγόνα του αντιδραστηρίου-λάτεξ πάνω σε έναν κύκλο στην κάρτα αντίδρασης.
3. Στην παραπάνω κάρτα αντίδρασης ρίχνουμε σε άλλο σημείο μία σταγόνα φυσιολογικού ορού.
4. Χρησιμοποιώντας ένα κρίκο παίρνουμε ένα τμήμα της ύποπτης αποικίας που θα εξεταστεί και το αναμιγνύουμε με τη σταγόνα του φυσιολογικού ορού.
5. Αναμιγνύουμε στη συνέχεια και με τη σταγόνα του αντιδραστηρίου-λάτεξ έτσι ώστε να καλύψει όλη την κάρτα αντίδρασης.
6. Κινούμε την κάρτα σε κυκλική κίνηση για όχι περισσότερο από ένα λεπτό και παρατηρούμε για συγκόλληση.
7. Αν δεν παρατηρηθεί τότε συνιστάται να ελέγξετε άλλες παρόμοιες αποικίες.
8. Εάν πάλι διαπιστωθεί συγκόλληση, τότε είναι απαραίτητο να εξετάσετε ένα άλλο τμήμα της εξετασθήσας αποικίας, για να αποκλειστεί το ενδεχόμενο να πρόκειται για απομονώση αυτό-συγκολλούμενου στελέχους.

Ερμηνεία της ορολογικής δοκιμής

Συγκόλληση των σωματιδίων-λάτεξ εντός ενός λεπτού θεωρείται ως θετικό αποτέλεσμα και αποδεικνύει την παρουσία *E.coli* οροομάδας O157.

Η μη-συγκόλληση εντός ενός λεπτού υποδηλώνει την απουσία *E.coli* οροομάδας O157.

4.5 Ανίχνευση *Yersinia enterocolitica*

Η ανίχνευση της παρουσίας της *Yersinia enterocolitica* πραγματοποιήθηκε εργαστηριακά σύμφωνα με τεχνικές του προτύπου ISO 10273. Ακόμη και σήμερα στην Ευρωπαϊκή Ένωση μετά και την τελευταία τροποποίηση του Κανονισμού 2073/2005 δεν έχει θεσπιστεί συγκεκριμένο όριο τόσο στον ωμό κιμά όσο και σε άλλα ζωικά προϊόντα.

Ωστόσο, η *Yersinia enterocolitica* αποτελεί την τρίτη σε σειρά καταγραφής ζωνόσο στην Ευρωπαϊκή Ένωση και λαμβάνοντας υπόψη ότι συναντάται συχνότερα σε μικρά παιδιά είναι χρήσιμο η αναζήτησή της σε προϊόντα ώστε να εξαχθούν συμπεράσματα για την απαίτηση θερμικής επεξεργασίας τους, για τους πιθανούς κινδύνους που μπορεί να προκύψουν τόσο κατά την κατανάλωση όσο και κατά το χειρισμό του προϊόντος από ευπαθείς ομάδες, όσο και για τη δυνατότητα υιοθέτησης νέων διατροφικών συνηθειών με τις υπάρχουσες συνθήκες παραγωγής και διαχείρισης του προϊόντος στη χώρα μας.

4.5.1 Εξεταζόμενη ποσότητα του δείγματος, αρχική αραίωση και εμπλουτισμός

Για την παρασκευή της αρχικής αραίωσης χρησιμοποιήθηκαν τόσο ο ζωμός PCB όσο και ο ζωμός ITC.

Ζωμός PCB (peptone, sorbitol and bile salts)

Σύνθεση:

Peptone	5,0 gr
Sorbitol	10,0 gr
Sodium chloride (NaCl)	5,0 gr
Disodium hydrogen phosphate (Na ₂ HPO ₄)	8,23 gr
Sodium dihydrogen phosphate monohydrate (NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O)	1,2 gr
Bile salts	1,5 gr
Water	1000 ml

Διαλύουμε τα συστατικά στο νερό θερμαίνοντας ήπια εάν χρειαστεί. Ρυθμίζουμε το pH, εάν χρειαστεί, ώστε μετά την αποστείρωση το pH να είναι 7,2 και μοιράζουμε το υλικό μέσα σε γυάλινες φιάλες. Ακολουθεί αποστείρωση στους 121°C για 15'.

Ζωμός ITC (irgasan, ticarcillin and potassium chlorate)

Βάση:

Τρυπτόνη	10,0 gr
Yeast extract	1,0 gr
Magnesium chloride hexahydrate (MgCl ₂ .6H ₂ O)	60,0 gr
Sodium chloride (NaCl)	5,0 gr
Malachite green, 0,2% aqueous solution	5,0 ml
Water	1000 ml

Διαλύουμε τα συστατικά στο νερό θερμαίνοντας ήπια εάν χρειαστεί. Ρυθμίζουμε το pH, εάν χρειαστεί, ώστε μετά την αποστείρωση το pH να είναι 6,9 και μοιράζουμε το υλικό μέσα σε γυάλινες φιάλες. Ακολουθεί αποστείρωση στους 121°C για 15'.

Διάλυμα Ticarcillin (1 mg/ml) :

- Ticarcillin	10 mg
- Νερό	10 ml

Διαλύουμε το Ticarcillin στο νερό και αποστειρώνουμε με διήθηση.

Αλκοολούχο διάλυμα Irgasan (1 mg/ml) :

- | | |
|------------------------|-------|
| - Irgasan | 10 mg |
| - Αιθανόλη , 95% (V/V) | 10 ml |

Διαλύουμε το Irgasan στην αιθανόλη.

Διάλυμα χλωρικού καλίου (100 mg/ml) :

- | | |
|-------------------------------------|--------|
| - Χλωρικό κάλιο (KClO_3) | 10 gr |
| - Νερό | 100 ml |

Διαλύουμε το χλωρικό κάλιο στο νερό και αποστειρώνουμε με διήθηση.

Ολοκληρωμένο υπόστρωμα :

- | | |
|-------------------------------|--------|
| - Βάση | 988 ml |
| - Ticarcillin solution | 1 ml |
| - Irgasan solution | 1 ml |
| - Potassium chloride solution | 10 ml |

Όταν χρειαστεί, προσθέτουμε το Ticarcillin, το Irgasan και το Potassium chlorate ασηπτικά στο βασικό υπόστρωμα στους 45°C και αναμιγνύουμε. Μοιράζουμε το υλικό σε φιάλες των 10 ή 100 ml.

Γενικά, για την παρασκευή της αρχικής αραίωσης, προστίθενται 25 gr εξεταζόμενης ποσότητας του δείγματος σε 225 ml υποστρώματος PSB και 2.250 ml υποστρώματος

ITC. Η αρχική αραίωση επωάζεται στους 22°C ή 25°C για πέντε ημέρες χωρίς ανάμειξη και στους 25°C για δύο ημέρες αντίστοιχα.

4.5.2 Σπορά σε στερεά εκλεκτικά υποστρώματα και ταυτοποίηση

Μετά τις δύο ημέρες από την καλλιέργεια του ITC ζωμού, με τη βοήθεια ενός κρίκου ενοφθαλμίζουμε την επιφάνεια ενός SSDC agar ώστε να πάρουμε καλοσχηματισμένες αποικίες. Ακολουθεί επώαση στους 30°C για 24 ώρες. Μετά την επώαση προκειμένου να ανιχνεύσουμε την παρουσία χαρακτηριστικών αποικιών της *Yersinia enterocolitica* θα πρέπει να δούμε αποικίες χρώματος γκρι με δυσδιάκριτο χείλος, μη ιριδίζουσες και πολύ λεπτή κοκκώδη επιφάνεια μετά από εξέταση με πλάγιο φωτισμό.

Μετά τις πέντε ημέρες επώασης, από την καλλιέργεια PSB ενοφθαλμίζουμε με τη βοήθεια ενός κρίκου την επιφάνεια ενός CIN άγαρ ώστε να πάρουμε καλοσχηματισμένες αποικίες. Παράλληλα, με αποστειρωμένη πιπέτα, μεταφέρουμε 0,5 ml της PSB καλλιέργειας σε 4,5 ml διαλύματος υδροξειδίου του καλίου και αναμιγνύουμε. Μετά από 20 δευτερόλεπτα, ενοφθαλμίζουμε με τη βοήθεια κρίκου την επιφάνεια ενός CIN άγαρ.

Μετά από επώαση 24 ωρών στους 30°C εξετάζουμε την παρουσία χαρακτηριστικών αποικιών της *Yersinia enterocolitica* σε CIN agar με πλάγιο φωτισμό ή μεγεθυντικό φακό. Οι αποικίες αυτές χαρακτηρίζονται ως μικρές και ομαλές με ένα κόκκινο κέντρο και διάφανο χείλος, μη ιριδίζουσες.

CIN agar:

Βάση

Peptone	20,0 gr
Yeast extract	2,0 gr
Mannitol	20,0 gr

Sodium pyruvate ($C_3H_3NaO_3$)	2,0 gr
Sodium chlorate ($NaClO_3$)	1,0 gr
Magnesium sulfate heptahydrate ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0,01 gr
Sodium desoxycholate ($C_{24}H_{39}NaO_4$)	0,5 gr
Neutral red	0,03 gr
Crystal violet	0,001 gr
Agar	8,0 έως 18,0 gr*
Water	1000 ml

*ανάλογα τη δύναμη της γέλης του agar

Διαλύουμε τα συστατικά στο νερό θερμαίνοντας ήπια. Ρυθμίζουμε το pH, εάν χρειαστεί, ώστε μετά την αποστείρωση το pH να είναι 7,4 και μοιράζουμε το υλικό μέσα σε γυάλινες φιάλες. Ακολουθεί αποστείρωση στους 121°C για 15'.

Διάλυμα Cefsulodin :

- Cefsulodin	1,5 gr
- Water	100 ml

Διαλύουμε το Cefsulodin στο νερό και αποστειρώνουμε με διήθηση.

Διάλυμα Irgasan :

- Irgasan	0,4 gr
- Ethanol, 95% (V/V)	100ml

Διαλύουμε το Irgasan στην αιθανόλη.

Διάλυμα Novobiocin :

- Novobiocin	0,25 gr
- Water	100 ml

Διαλύουμε το Novobiocin στο νερό και αποστειρώνουμε με διήθηση.

Ολοκληρωμένο υπόστρωμα :

- Βάση	997 ml
- Cefsulodine solution	1 ml
- Irgasan solution	1 ml
- Novobiocin solution	1 ml

Αναμιγνύουμε ασηπτικά κάθε ένα διάλυμα αντιβιοτικού με το βασικό υπόστρωμα, το οποίο έχει ψυχθεί στους 45°C. Ρίχνουμε περίπου 15 ml του ολοκληρωμένου υποστρώματος σε αποστειρωμένους δίσκους Petri.

Πριν τη χρήση, ξηραίνουμε τους δίσκους Petri σε θερμοκρασία μεταξύ 37°C και 55°C μέχρι η επιφάνεια του άγαρ να γίνει ξηρή. Εάν προετοιμαστούν πριν τη χρήση, θα πρέπει οι μη ξηροί δίσκοι να μείνουν σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι τέσσερις ώρες ή να μείνουν μέχρι μία ημέρα σε θερμοκρασίες 0°C μέχρι και 5°C.

SSDC agar :

Yeast extract	5,0 gr
Meat extraxt	5,0 gr

Meat peptone	5,0 gr
Lactose	10,0 gr
Bile salts	8,5 gr
Sodium desoxycholate ($C_{24}H_{39}NaO_4$)	10,0 gr
Calcium chloride ($CaCl_2$)	1,0 gr
Sodium citrate	1,9 gr
Sodium thiosulfate pentahydrate ($Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$)	8,5 gr
Iron (III) citrate	8,5 gr
Brilliant green	0,0003 gr
Neutral red	0,025 gr
Agar	8,0 έως 18,0 gr *
Water	1000 ml

*ανάλογα την δύναμη της γέλης του agar

Διαλύουμε τα συστατικά στο νερό θερμαίνοντας για ένα λεπτό. Ρυθμίζουμε το pH, εάν χρειαστεί, ώστε μετά την αποστείρωση το pH να είναι 7,4. Ρίχνουμε 20 ml του υποστρώματος, αφού έχει κρυώσει στους 45°C, σε αποστειρωμένους δίσκους Petri.

Πριν τη χρήση, ξηραίνουμε τους τρυβλία Petri σε θερμοκρασία μεταξύ 37°C και 55°C μέχρι η επιφάνεια του άγαρ να γίνει ξηρή. Εάν προετοιμαστούν πριν τη χρήση, θα πρέπει οι μη ξηροί δίσκοι να μείνουν σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι 4 ώρες ή να μείνουν μέχρι μία ημέρα σε θερμοκρασίες 0°C μέχρι και 5°C.

4.5.3 Επιβεβαίωση *Yersinia enterocolitica*

Επιλέγονται πέντε αποικίες από κάθε τρυβλίο κάθε εκλεκτικού υποστρώματος, οι οποίες θεωρούνται χαρακτηριστικές ή ύποπτες για *Yersinia enterocolitica* . Εάν σε κάποιο τρυβλίο υπάρχουν λιγότερες από πέντε ύποπτες αποικίες, επιλέγονται όλες.

Οι παραπάνω αποικίες σπείρονται στην επιφάνεια τρυβλίων με «ξηρό» θρεπτικό άγαρ, κατά τρόπο ώστε να ληφθούν καλά απομονωμένες αποικίες. Επωάζουμε στους 30°C για 24 ώρες.

Nutrient agar :

- Meat extract	3,0 g
- Peptone	5,0 g
- Agar	8,0 έως 18,0 g*
- Water	1000 ml

Διαλύουμε τα συστατικά στο νερό και ρυθμίζουμε το pH στο 7,0. Η αποστείρωση γίνεται στους 121°C για 15 λεπτά και αφού κρυώσει το υλικό στους 45°C το μοιράζουμε σε τρυβλία.

Πριν τη χρήση, ξηραίνουμε τα τρυβλία Petri σε κλίβανο θερμοκρασίας μεταξύ των 37°C και 55°C, μέχρι η επιφάνεια του άγαρ να γίνει ξηρή.

Οι βιοχημικές και παθογενητικές δοκιμές θα πρέπει να γίνονται σε καθαρές καλλιέργειες.

Ακολουθούν πίνακες για την ερμηνεία των βιοχημικών και παθογενετικών εξετάσεων για πιθανή παθογόνα στελέχη *Yersinia enterocolitica* και άλλων *Yersinia* στελεχών

Πίνακας 6. Βιοχημικές αντιδράσεις για παθογόνα στελέχη *Yersinia enterocolitica*

Δοκιμή	Αντίδραση
Ουρία	+
Απαμινάση της Τρυπτοφάνης	—
Γλυκόζη	+
Παραγωγή αερίου από τη γλυκόζη	—
Λακτόζη	—
Υδρόθειο	—
Οξειδάση	—
Λυσίνη αποκαρβοξυλίωση	—
Ορνιθίνη αποκαρβοξυλίωση	+
Σουκρόζη	+
Ραμνόζη	—
Κιτρικό άλας	—
Σαλικίνη	—
Εσκουλίνη	—
Πυραζιναμίδωση	—
Εξάρτηση από ασβέστιο στους 37°C	+

Πίνακας 7. Βιοχημικά χαρακτηριστικά των ειδών *Yersinia* spp

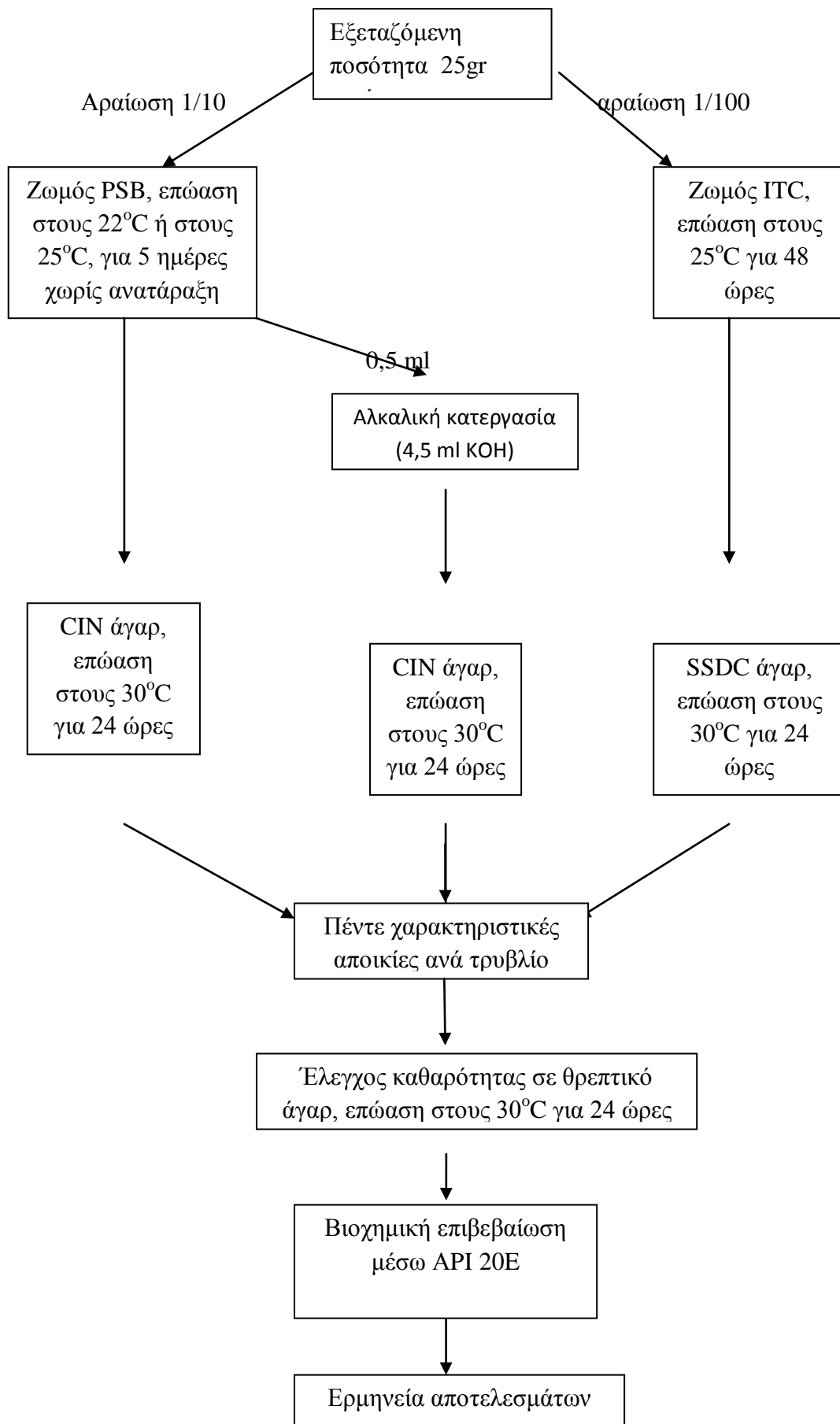
Biochemical Characteristics ^(a) of <i>Yersinia</i> species (2, 9, 10, 52)											
Reaction	<i>Yersinia</i> species										
	<i>Y. pestis</i>	<i>Y. pseudotuberculosis</i>	<i>Y. enterocolitica</i>	<i>Y. intermedia</i>	<i>Y. frederiksenii</i>	<i>Y. kristensenii</i>	<i>Y. aldovae</i>	<i>Y. rohdei</i>	<i>Y. mollaretii</i>	<i>Y. bercovieri</i>	<i>Y. ruckeri</i>
Lysine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arginine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ornithine	-	-	+(c)	+	+	+	+	+	+	+	+
Motility at RT (22-26°C)	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
35-37°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urea	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Phenylalanine deaminase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sorbitol	+/-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Cellobiose	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-
Adonitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Inositol	-	-	+/-(+)	+/-(+)	+/-(+)	+/-(+)	+	-	+/-	-	-
Sucrose	-	-	+(c)	+	+	-	-	+	+	+	-
Rhamnose	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-
Raffinose	-	+/-	-	+	-	-	-	+/-	-	-	-
Melibiose	-	+/-	-	+	-	-	-	+/-	-	-	-
Simmons citrate	-	-	-	+/-	+/-	-	-	+	-	-	+
Voges-Proskauer	-	-	+/-(+)	+	+	-	+	-	-	-	-
Indole	-	-	+/-	+	+	+/-	-	-	-	-	-
Salicin	+/-	+/-	+/-	+	+	-(+/-)	-	-	+/-	(+)	-
Esculin	+	+	+/-	+	+	-	+	-	(+)	(+)/-	-
Lipase	-	-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	-	-	-	-
Pyrazinamide	-	-	+/-	+	+	+	+	+	+	+	-

^a + = positive after 3 days at RT, (+) = positive after 7 days at RT.

^b Some strains of *Y. intermedia* are negative for either Simmons citrate, rhamnose, and melibiose, or raffinose and Simmons citrate.

^c Some biotype 5 strains are negative.

Διάγραμμα 2. Ανίχνευση *Yersinia enterocolitica*



4.5.4 Βιοχημική επιβεβαίωση μέσω API 20E

i) Παρασκευή του ενοφθαλμίσματος

- Ανοίγουμε μία αμπούλα του API NacCl medium 0,85% (5 ml) ή μία αμπούλα API Suspension medium ή χρησιμοποιούμε οποιοδήποτε αμπούλα περιέχει 5 ml στείρου φυσιολογικού ορού ή αποστειρωμένο αποσταγμένο νερό, χωρίς τα πρόσθετα.
- Με τη βοήθεια πιπέτας ή PSIPette αφαιρούμε μόνο μία καλά απομονωμένη αποικία από το τρυβλίο Petri. Συνίσταται η χρήση νέων καλλιεργιών (18-24 ωρών)
- Προσεκτικά, εναιωρούμε την αποικία για να επιτύχουμε ομοιόμορφη βακτηριολογική κατανομή στο διάλυμα.
- Το εναιώρημα θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί αμέσως μετά την προετοιμασία του.

ii) Ενοφθαλμισμός της ταινίας API 20E

- Χρησιμοποιώντας στείρο σιφώνιο γεμίζουμε τόσο τους σωλήνες όσο και τα κύπελλα των δοκιμών CIT, VP, GEL με το βακτηριακό εναιώρημα.
- Γεμίζουμε μόνο τους σωλήνες για όλες τις άλλες δοκιμές.
- Δημιουργούμε συνθήκες αναερόβιες στις δοκιμές ADH, LDC, ODC, H₂S και URE επικαλύπτοντάς τες με ορυκτέλαιο.
- Κλείνουμε το κιβώτιο επώασης
- Επωάζουμε στους 36±2°C για 18-24 ώρες

4.5.5 Ερμηνεία των αποτελεσμάτων της ταινίας API 20E

Η ερμηνεία επιτυγχάνεται με τη χρήση αριθμητικού προφίλ.

- Προσδιορισμός του αριθμητικού προφίλ: Στο φύλλο αποτελέσματος οι δοκιμές χωρίζονται σε ομάδες των τριών και μία τιμή 1 ή 2 ή 4 ορίζεται για την κάθε μία δοκιμή. Αθροίζοντας τις τιμές της κάθε ομάδες ξεχωριστά προκύπτει ένας επταψήφιος αριθμός για όλες τις είκοσι δοκιμές της ταινίας API 20E. Η αντίδραση της οξειδάσης αποτελεί την εικοστή πρώτη δοκιμή και λαμβάνει την τιμή 4 εάν είναι θετική.
- Αναγνώριση: πραγματοποιείται με τη χρήση της βάσης δεδομένων (V4.0) και ειδικότερα με το λογισμικό αναγνώρισης, όπου πληκτρολογούμε τον επταψήφιο αριθμό με τη βοήθεια του πληκτρολογίου.

Πίνακας 8. Ανάγνωση αποτελεσμάτων της ταινίας API 20E για *Yersinia enterocolitica*

ΔΟΚΙΜΗ	ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ	ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΥ ΕΛΕΓΧΕΤΑΙ	(-) ΑΡΝΗΤΙΚΟ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ	(+)ΘΕΤΙΚΟ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ
ONPG	ONPG	beta-galactosidase	Άχρωμο	Κίτρινο
ADH	arginine	arginine dihydrolase	Κίτρινο	Κόκκινο/πορτοκαλί
LDC	lysine	lysine decarboxylase	Κίτρινο	Κόκκινο/πορτοκαλί
ODC	ornithine	ornithine decarboxylase	Κίτρινο	Κόκκινο/πορτοκαλί
CIT	citrate	citrate utilization	Απαλό πράσινο/κίτρινο	Μπλε- πράσινο/μπλε
H ₂ S	Na thiosulfate	H ₂ S production	Άχρωμο/γκρι	Μαύρη εναπόθεση
URE	urea	urea hydrolysis	Κίτρινο	Κόκκινο/πορτοκαλί
TDA	tryptophan	deaminase	Κίτρινο	καστανοκόκκινο
IND	tryptophan	indole production	Κίτρινο	Κόκκινο (δύο λεπτά)
VP	Na pyruvate	acetoin production	Άχρωμο	Ροζ/κόκκινο(δέκα

				λεπτά)
GEL	charcoal gelatin	gelatinase	Καθόλου διάχυση του μαύρου	Διάχυση του μαύρου
GLU	glucose	fermentation/oxidation	Μπλε/πρασino-μπλε	κίτρινο
MAN	mannitol	fermentation/oxidation	Μπλε/πρασino	κίτρινο
INO	inositol	fermentation/oxidation	Μπλε/πρασino	κίτρινο
SOR	sorbitol	fermentation/oxidation	Μπλε/πρασino	κίτρινο
RHA	rhamnose	fermentation/oxidation	Μπλε/πρασino	κίτρινο
SAC	sucrose	fermentation/oxidation	Μπλε/πρασino	κίτρινο
MEL	melibiose	fermentation/oxidation	Μπλε/πρασino	κίτρινο
AMY	amygdalin	fermentation/oxidation	Μπλε/πρασino	κίτρινο
ARA	arabinose	fermentation/oxidation	Μπλε/πρασino	κίτρινο
OX	oxidase	oxidase	Άχρωμο/κίτρινο	βιολετί

Κεφάλαιο 5. Αποτελέσματα

Κατά το πειραματικό μέρος της παρούσας διπλωματικής εργασίας πραγματοποιήθηκε εργαστηριακή διερεύνηση 60 (εξήντα) δειγμάτων κιμά διαφόρων χαρακτηριστικών (νωπός - κατεψυγμένος, εισαγόμενος - εξαγόμενος, βόειος - χοιρινός κτλ.) τα οποία συλλέχθηκαν από είκοσι πέντε (25) καταστήματα λιανικής πώλησης του προϊόντος (δεκαπέντε κρεοπωλεία και δέκα σουπερ μάρκετ) εντός της πόλης της Λάρισας. Ο έλεγχος αφορούσε την καταμέτρηση της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας και στην ανίχνευση παρουσίας *E.coli* O157:H7 και *Yersinia enterocolitica*. Ο πίνακας 9 περιλαμβάνει τα συνολικά χαρακτηριστικά των δειγμάτων.

Πίνακας 9. Συγκεντρωτικά στοιχεία δειγμάτων κιμά.

ΚΡΕΟΠΩΛΕΙΑ (N=15)	ΒΟΕΙΟΣ	ΕΛΛΗΝΙΚΟΣ	ΝΩΠΟΣ	12
			ΚΑΤΕΨΥΓΜΕΝΟΣ	0
		ΕΙΣΑΓΟΜΕΝΟΣ	ΝΩΠΟΣ	5
			ΚΑΤΕΨΥΓΜΕΝΟΣ	0
	ΧΟΙΡΙΝΟΣ	ΕΛΛΗΝΙΚΟΣ	ΝΩΠΟΣ	16
			ΚΑΤΕΨΥΓΜΕΝΟΣ	0
		ΕΙΣΑΓΟΜΕΝΟΣ	ΝΩΠΟΣ	0
			ΚΑΤΕΨΥΓΜΕΝΟΣ	0
ΣΟΥΠΕΡ ΜΑΡΚΕΤ (N=10)	ΒΟΕΙΟΣ	ΕΛΛΗΝΙΚΟΣ	ΝΩΠΟΣ	7
			ΚΑΤΕΨΥΓΜΕΝΟΣ	0
		ΕΙΣΑΓΟΜΕΝΟΣ	ΝΩΠΟΣ	2
			ΚΑΤΕΨΥΓΜΕΝΟΣ	5
	ΧΟΙΡΙΝΟΣ	ΕΛΛΗΝΙΚΟΣ	ΝΩΠΟΣ	8

			ΚΑΤΕΨΥΓΜΕΝΟΣ	0
			ΝΩΠΙΟΣ	0
		ΕΙΣΑΓΟΜΕΝΟΣ	ΚΑΤΕΨΥΓΜΕΝΟΣ	5
			ΣΥΝΟΛΟ	60

5.1 Αποτελέσματα Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας (OMX)

Η μέτρηση των αερόβιων αποικιών αποτελεί κατά τους Ευρωπαϊκούς Κανονισμούς (2073/2005 και 1441/2007) ένα κριτήριο υγιεινής. Σύμφωνα με τον ορισμό του «κριτηρίου υγιεινής της παραγωγικής διαδικασίας» είναι το κριτήριο που καθορίζει την αποδεκτή λειτουργία της διαδικασίας παραγωγής ένα τέτοιο κριτήριο δεν εφαρμόζεται στα προϊόντα που διατίθενται στην αγορά· ορίζει μια ενδεικτική τιμή μόλυνσης πάνω από την οποία απαιτούνται διορθωτικές ενέργειες προκειμένου να διατηρηθεί η υγιεινή της παραγωγικής διαδικασίας. Ειδικά στη περίπτωση του κιμά, το κριτήριο αυτό δεν είναι υποχρεωτικό να εφαρμοστεί στον κιμά ο οποίος παράγεται λιανικά, όταν η διάρκεια διατήρησής του αναμένεται να είναι μικρότερη των 24 ωρών. Κατά το πειραματικό σκέλος της παρούσας διπλωματικής εργασίας αποφασίσαμε να εκτελέσουμε τη μέτρηση της OMX για όλα τα δείγματα κιμά ώστε να εξαχθούν κάποια συμπεράσματα όσον αφορά το επίπεδο υγιεινής και κατά τη διαδικασία λιανικής παραγωγής του .

Σύμφωνα με τον Κανονισμό (ΕΚ) 1441/2007 για τον υπολογισμό των αερόβιων αποικιών απαιτούνται πέντε υποδείγματα του δείγματος κιμά για τα οποία το κριτήριο που ισχύει είναι ότι μόνο δύο από τα πέντε υποδείγματα μπορεί να κυμαίνονται μεταξύ 5×10^5 έως 5×10^6 cfu/gr τροφίμου. Όμως για τον εξορθολογισμό του κόστους της μελέτης, αποφασίστηκε ο έλεγχος ενός υποδείγματος ανά δείγμα κιμά. Όταν σε δείγμα μετρήθηκε η OMX να περιέχεται στο εύρος 5×10^5 έως 5×10^6 cfu/gr τροφίμου, το δείγμα θεωρήθηκε «μέτριας ποιότητας», ενώ θεωρήθηκε «καλής ποιότητας» ή «κακής

ποιότητας» όταν η OMX μετρήθηκε μικρότερη των 5×10^5 και μεγαλύτερη των 5×10^6 cfu/gr αντίστοιχα.

Ο πίνακας 10 περιλαμβάνει τα αποτελέσματα των 60 δειγμάτων κιμά οργανωμένα κατά τα κυριότερα χαρακτηριστικά τους.

Πίνακας 10. Αποτελέσματα μέτρησης OMX.

ΚΡΕΟΠ ΩΛΕΙΑ (N=15)	ΒΟΕΙ ΟΣ	ΕΛΛΗΝΙ ΚΟΣ	ΝΩΠΟΣ	12	ΚΑΛΗ ΠΟΙΟΤΗΤΑ	2
					ΜΕΤΡΙΑ ΠΟΙΟΤΗΤΑ	8
					ΚΑΚΗ ΠΟΙΟΤΗΤΑ	2
		ΕΙΣΑΓΟ ΜΕΝΟΣ	ΚΑΤΕΨΥΓ ΜΕΝΟΣ	0		
			ΝΩΠΟΣ	5	ΚΑΛΗ ΠΟΙΟΤΗΤΑ	0
					ΜΕΤΡΙΑ ΠΟΙΟΤΗΤΑ	2
					ΚΑΚΗ ΠΟΙΟΤΗΤΑ	3
			ΚΑΤΕΨΥΓ ΜΕΝΟΣ	0		
	ΧΟΙΡΙ ΝΟΣ	ΕΛΛΗΝΙ ΚΟΣ	ΝΩΠΟΣ	16	ΚΑΛΗ ΠΟΙΟΤΗΤΑ	3
					ΜΕΤΡΙΑ ΠΟΙΟΤΗΤΑ	10
					ΚΑΚΗ ΠΟΙΟΤΗΤΑ	3
			ΚΑΤΕΨΥΓ ΜΕΝΟΣ	0		
		ΕΙΣΑΓΟ ΜΕΝΟΣ	ΝΩΠΟΣ	0		
			ΚΑΤΕΨΥΓ ΜΕΝΟΣ	0		
ΣΟΥΠΕ Ρ ΜΑΡΚΕ	ΒΟΕΙ ΟΣ	ΕΛΛΗΝΙ ΚΟΣ	ΝΩΠΟΣ	7	ΚΑΛΗ ΠΟΙΟΤΗΤΑ	0
					ΜΕΤΡΙΑ ΠΟΙΟΤΗΤΑ	0

T (N=10)					ΚΑΚΗ ΠΟΙΟΤΗΤΑ	7
			ΚΑΤΕΨΥΓΜΕΝΟΣ	0		
		ΕΙΣΑΓΟΜΕΝΟΣ	ΝΩΠΟΣ	2	ΚΑΛΗ ΠΟΙΟΤΗΤΑ	0
					ΜΕΤΡΙΑ ΠΟΙΟΤΗΤΑ	0
					ΚΑΚΗ ΠΟΙΟΤΗΤΑ	2
			ΚΑΤΕΨΥΓΜΕΝΟΣ	5	ΚΑΛΗ ΠΟΙΟΤΗΤΑ	0
					ΜΕΤΡΙΑ ΠΟΙΟΤΗΤΑ	0
					ΚΑΚΗ ΠΟΙΟΤΗΤΑ	5
		ΧΟΙΡΙΝΟΣ	ΕΛΛΗΝΙΚΟΣ	ΝΩΠΟΣ	8	ΚΑΛΗ ΠΟΙΟΤΗΤΑ
	ΜΕΤΡΙΑ ΠΟΙΟΤΗΤΑ					5
	ΚΑΚΗ ΠΟΙΟΤΗΤΑ					3
	ΚΑΤΕΨΥΓΜΕΝΟΣ			0		
	ΕΙΣΑΓΟΜΕΝΟΣ		ΝΩΠΟΣ	0		
			ΚΑΤΕΨΥΓΜΕΝΟΣ	5	ΚΑΛΗ ΠΟΙΟΤΗΤΑ	2
					ΜΕΤΡΙΑ ΠΟΙΟΤΗΤΑ	0
ΚΑΚΗ ΠΟΙΟΤΗΤΑ	3					
ΣΥΝΟΛΟ					60	

Στο σύνολο των 60 δειγμάτων κιμά, μόλις τα 7 (11,6%) βρέθηκαν να είναι “καλής ποιότητας”. Είκοσι πέντε δείγματα (41,6%) βρέθηκαν να είναι «μέτριας ποιότητας» και τα υπόλοιπα είκοσι οκτώ δείγματα (46,6%) βρέθηκαν να είναι «κακής ποιότητας».

5.2 Αποτελέσματα ανίχνευσης παρουσίας *E.coli* O157:H7

Από τα εξήντα (60) δείγματα κιμά που εξετάστηκαν , έξι δείγματα (10%) έδωσαν θετικές τιμές στο VIDAS UP. Ωστόσο κανένα δείγμα δεν επιβεβαιώθηκε ότι περιέχει *E.coli* O157:H7 στελέχη. Από τα έξι παραπάνω δείγματα, δύο ήταν στελέχη *E.coli*, αρνητικά σε αντι-ορούς (33,3%), και από ένα δείγμα βρέθηκε μετά από βιοχημικές εξετάσεις (API 20E) ότι ήταν *Morganella morganii* (16,6%), *Acinetobacter baumannii* (16,6%), *Escherichia fergusonii* (16,6%) και *Hafnia alvei* (16,6%).

5.3 Αποτελέσματα ανίχνευσης *Yersinia enterocolitica*

Σε κανένα από τα εξήντα (60) δείγματα κιμά (τριάντα ένα δείγματα μοσχαρίσιου κιμά και είκοσι εννέα δείγματα χοιρινού κιμά) δεν ανιχνεύθηκε η παρουσία *Yersinia enterocolitica*. Από τα δείγματα που εμφάνισαν ύποπτες αποικίες στο CIN άγαρ, τα πιο συχνά απομονωμένα βακτήρια που ταυτοποιήθηκαν με τη βιοχημική μέθοδο (API 20E) ήταν : 1) *Serratia liquefaciens* (22,2%), 2) *Aeromonas hydrophila* τύπου 1 (18,5%), 3) *Enterobacter cloacae* (18,5%), 4) *Citrobacter braaki* (11,1%), 5) *Pantoea* spp (7,4%).

Κεφάλαιο 6. Συμπεράσματα – Συζήτηση

Ο προσδιορισμός των αερόβιων αποικιών των κιμάδων στη λιανική πώληση απέδειξε ότι περισσότερο από το 85% των δειγμάτων ανήκει στις κατηγορίες «μέτρια και κακή ποιότητα» και επομένως εάν οι απαιτήσεις του 1441/2007 εφαρμόζονταν σε κιμά λιανικής πωλήσεως, ο οποίος δεν επρόκειτο να διατηρηθεί άνω των 24 ωρών, τότε οι επιχειρήσεις θα έπρεπε να προβούν σε διορθωτικές ενέργειες. Το παραπάνω αποτέλεσμα θα μπορούσε να οφείλεται: 1) σε λανθασμένους χειρισμούς και επιμολύνσεις του κιμά κατά τη διάρκεια της παραγωγής του αλλά και κατά τη διάρκεια του εκσπλαχνισμού του σφάγιου, 2) σε διατάραξη της ψυκτικής αλυσίδας.

Κατεψυγμένος κιμάς βρέθηκε να διατίθεται μόνο από συγκεκριμένη αλυσίδα πολυεθνικού πολυκαταστήματος και ήταν εισαγόμενος από Γερμανία. Πραγματοποιήθηκαν δέκα δειγματοληψίες με τα εξής αποτελέσματα: Δύο δείγματα χοιρινού κατεψυγμένου κιμά σε σύνολο δέκα κατεψυγμένων δειγμάτων (20%) παρουσίασαν ανάπτυξη OMX εντός των προβλεπόμενων ορίων, ενώ τρία δείγματα χοιρινού κατεψυγμένου κιμά εμφάνισαν ανάπτυξη OMX εκτός των προβλεπόμενων ορίων (30%).

Από την άλλη πλευρά, και τα πέντε δείγματα μοσχαρίσιου κατεψυγμένου κιμά (50%) παρουσίασαν αποτελέσματα «κακής ποιότητας». Επομένως, οκτώ δείγματα σε σύνολο δέκα δειγμάτων (80%) εμφάνισαν OMX εκτός των προβλεπόμενων ορίων.

Σύμφωνα με το παραπάνω αποτέλεσμα, και λαμβάνοντας υπόψη μας ότι ο Κανονισμός 1441/2007, τίθεται σε ισχύ στον συγκεκριμένο τύπο κιμά, οι επιχειρήσεις που παρήγαγαν τον κατεψυγμένο κιμά θα πρέπει να προβούν σε διορθωτικές ενέργειες, όπως βελτίωση στην υγιεινή της παραγωγής καθώς και στην επιλογή ή/και την προέλευση των πρώτων υλών, προκειμένου να συμμορφωθούν με το κριτήριο υγιεινής του Κανονισμού.

Αναφορικά με τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα της μεθόδου Vidas, αυτά πιθανόν να οφείλονται σε βακτήρια που παρουσιάζουν διασταυρούμενη αντίδραση με αντισώματα κατά του O157 αντιγόνου π.χ. *Salmonella* group N, *Brucella melitensis*, *Yersinia enterocolitica* ορότυπος O:9 (Di Fabio et al., 1987) και μπορούν να μειωθούν με την καλλιέργεια σε υλικά στα οποία έχει προστεθεί cefixime και tellurite, καθώς η ελάχιστη

ανασταλτική συγκέντρωση έχει αποδειχθεί ότι είναι υψηλότερη για την *E.coli* O157:H7 απ' ότι για άλλα στελέχη *E.coli* και για πολλά εντερικά βακτήρια που δεν ζυμώνουν τη σορβιτόλη, όπως *Aeromonas* spp., *Morganella morganii*, *Providencia* spp., and *Hafnia alvei* (Weagant et al . 1995).

Οι Silveira et al, (1999) είχαν και αυτοί στα αποτελέσματα της έρευνάς τους υψηλό ποσοστό πιθανά ψευδώς θετικών δειγμάτων σε *E.coli* O157:H7 χρησιμοποιώντας ανοσοενζυμική μέθοδο. Στην έρευνα αυτή, τα πιο συχνά απομονούμενα βακτήρια ήταν *Enterobacter* spp. (33%, κυρίως *Enterobacter cloacae*), *Klebsiella* spp. (22,5%, ειδικά *Klebsiella pneumoniae* και *K. oxytoca*), *Citrobacter* spp. (5%), *Pantoea agglomerans* (3,7%), *Kluyvera ascorbata* (2,5%), *E. hermannii*, *E. fergusonii* (2,5%) και μη ταυτοποιήσιμα εντεροβακτήρια (6,3%).

Παρά το γεγονός ότι προϊόντα κρέατος και παρασκευάσματα μοσχαρίσιου κρέατος έχουν ευρέως ενοχοποιηθεί ως μεταφορείς της *E.coli* O157:H7, πολλές έρευνες σε παγκόσμιο επίπεδο έχουν αποτύχει να ανιχνεύσουν το μικροοργανισμό (Atalla et al . 2000 , Brooks et al. 2001) ή τον έχουν ανιχνεύσει σε μικρό ποσοστό σε μοσχαρίσιο κιμά.

Τα αποτελέσματα της έρευνάς μας αναφορικά με την παρουσία *E.coli* O157:H7 σε κιμά ήταν αρνητικά, γεγονός που συμβαδίζει και με τα αποτελέσματα άλλων ερευνών σε εθνικό επίπεδο. Οι Ντοντόρου και συνεργάτες (2002) εξέτασαν 600 δείγματα που ελήφθησαν από περιοχές της Βορειοδυτικής Ελλάδας και εκ των οποίων τα 64 ήταν δείγματα μοσχαρίσιου κιμά και τα 50 ήταν δείγματα κατεψυγμένων μοσχαρίσιων μπιφτεκιών. Από τα παραπάνω 114 δείγματα κανένα δεν βρέθηκε θετικό σε *E.coli* O157:H7. Ωστόσο, η παραπάνω έρευνα κατέληξε στο γεγονός ότι το βακτήριο της *E.coli* O157:H7 υπάρχει στην Ελλάδα, παρά τη χαμηλή συχνότητά του (τρία δείγματα θετικά σε σύνολο 600 δειγμάτων που αφορούσαν γάλα προβατίνας, νωπό λουκάνικο και έντερο χοίρου).

Παρόλα αυτά, στην Ελλάδα δεν έχει παρατηρηθεί ούτε τροφιμογενής έξαρση κρουσμάτων που να οφείλεται στην *E.coli* O157:H7 ούτε κάποια αναφορά ανθρώπινης μόλυνσης εργαστηριακά επιβεβαιωμένης. Οι λόγοι στους οποίους μπορεί να οφείλεται αυτό είναι :

1. Η χρήση μόνο συμβατικών καλλιεργειών για την ανίχνευση και όχι σε συνδυασμό με άλλες σύγχρονες μεθόδους όπως π.χ. IMS, PCR.
2. Οι διατροφικές συνήθειες των Ελλήνων, που επιθυμούν το κρέας τους να είναι καλοψημένο και όχι ωμό ή ελαφρώς ψημένο όπως προτιμούν οι Βόρειοι Ευρωπαίοι.

Σε ό,τι αφορά τα εργαστηριακά αποτελέσματα της αναζήτησης της *Yersinia enterocolitica*, σε ένα κανένα δείγμα από τα εξήντα της μελέτης μας δεν ανιχνεύθηκε η παρουσία *Yersinia enterocolitica*, γεγονός που μπορεί να οφείλεται 1) στο μικρό αριθμό των δειγμάτων της μελέτης, 2) στο μικρό ποσοστό εμφάνισης σε σφάγια ζώων στην Ελλάδα (Κοϊδης & Καραϊωάννογλου, 1988), και 3) στη χαμηλή ευαισθησία των μεθόδων καλλιέργειας.

Το παραπάνω αποτέλεσμα της μελέτης μας συμβαδίζει με επιστημονικές έρευνες που έχουν διεξαχθεί και αφορούσαν χοιρινά προϊόντα λιανικού εμπορίου. Στην Νορβηγία, *Yersinia enterocolitica* O:3 ανιχνεύθηκε σε ένα από τα εκατό είκοσι επτά δείγματα ωμού χοιρινού κρέατος (Nesbakken et al, 1985). Στην Ιταλία, σε ενενήντα δείγματα προϊόντων χοίρειου κρέατος δεν βρέθηκε κανένα θετικό στην παρουσία της *Yersinia enterocolitica* (De Giusti et al., 1995). Οι Fredriksson-Ahomaa και Korkealla (2003b) σε διακόσια πενήντα πέντε δείγματα χοιρινού κιμά που εξετάστηκαν με μεθόδους καλλιέργειας μόνο τέσσερα δείγματα (1,5%) βρέθηκαν θετικά. Αλλά και οι Boyapalle S. et al. (2001) σε τριακόσια δείγματα χοιρινού κιμά δεν μπόρεσαν να απομονωνώσουν σε κανένα δείγμα την *Yersinia enterocolitica*. Ωστόσο, υπάρχουν και μελέτες όπως των Vishnubhatla et al. (2001), όπου από τα εκατό δείγματα χοιρινού κιμά τα τριάντα δύο δείγματα βρέθηκαν θετικά σε *Yersinia enterocolitica* με μεθόδους καλλιέργειας.

Οι χοίροι θεωρούνται ως οι περισσότεροι μολυσμένοι με *Yersinia enterocolitica* σε σχέση με άλλα είδη ζώων, ενώ ο επιπολασμός της παθογόνου *Yersinia enterocolitica* είναι υψηλότερος στις αμυγδαλές σε σχέση με τα κόπρανα. Το υψηλότερο ποσοστό μόλυνσης αναμένεται να εντοπιστεί στα σφάγια των χοίρων και σε μικρότερο ποσοστό σε όργανα του ζώου, όπως καρδιά, ήπαρ και γλώσσα. Ωστόσο, τα παραπάνω όργανα δεν καταναλώνονται ωμά αλλά υφίστανται θερμική επεξεργασία που οδηγεί στην εξάλειψη του κινδύνου μόλυνσης (EFSA, 2007).

Διαπιστώσαμε, λοιπόν, από τη μελέτη μας ότι το επιπεδο υγιεινής των κιμάδων του λιανικού εμπορίου δεν συμβαδίζει σε μεγάλο ποσοστό με τον Κανονισμό (ΕΚ) 1441/2007. Η πιθανή μόλυνση των κιμάδων με *E.coli* O157:H7 αλλά και με *Yersinia enterocolitica*, παρόλο που έχει διαπιστωθεί σε άλλες επιστημονικές έρευνες, στη δική μας μελέτη δεν μπόρεσε να αποδειχθεί. Ωστόσο, έρευνες στην Ελλάδα έχουν απομονώσει τα παραπάνω βακτήρια σε ζώα, σε σφάγια και σε προϊόντα τους, έστω και σε μικρό ποσοστό. Για το λόγο αυτό, τόσο οι χειριστές τροφίμων αλλά και οι καταναλωτές οφείλουν να εφαρμόζουν κανόνες ορθής υγιεινής/βιομηχανικής πρακτικής κατά τη διάρκεια χειρισμών που γίνονται τόσο στο σφαγείο (σφαγή, τεμαχισμός, επεξεργασία νωπού κρέατος, συντήρηση, διανομή) και στη λιανική πώληση (κοπή κρέατος στη μηχανή του κιμά, συντήρηση) όσο και στη κουζίνα και στο ψυγείο του σπιτιού για να μειώσουν όσο περισσότερο μπορούν το κίνδυνο εμφάνισης τροφιμογενούς νοσήματος από τα παραπάνω βακτήρια.

Βιβλιογραφία Ελληνική

- Γεωργάκης Σ.Α, Βαρελτζής Κ.Π., Αμβροσιάδης Ι.Α., *Τεχνολογία Τροφίμων Ζωϊκής Προέλευσης*, Εκδόσεις Σύγχρονη Παιδεία, 2000
- Γεωργάκης Σπ.Α. (2005). *Το κρέας και τα προϊόντα του*. Εκδόσεις Σύγχρονη Παιδεία, Θεσσαλονίκη
- Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 853/2004 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου για τον καθορισμό ειδικών κανόνων υγιεινής για τα τρόφιμα ζωικής προέλευσης
- Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 2073/2005 της Επιτροπής της 15^{ης} Νοεμβρίου 2005 περί μικροβιολογικών κριτηρίων για τα τρόφιμα
- Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1441/2007 της Επιτροπής της 5^{ης} Δεκεμβρίου 2007 για την τροποποίηση του Κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 2073/2005 της Επιτροπής περί μικροβιολογικών κριτηρίων για τα τρόφιμα
- Κοΐδης Π. και Καραϊωάννογλου Πρ., (1988) *Αναζήτηση της Yersinia enterocolitica σε σφάγια βοοειδών, προβάτων και χοίρων*. Πρακτικά Δεύτερου Πανελλήνιου Συνεδρίου Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων
- Τσακαλίδου Ε. (2001). *Μαθήματα Βιοχημείας Τροφίμων* Ι. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Βιβλιογραφία Ξενόγλωσση

- Ackers M. L., Schoenfeld S., Markman J. et al., "An outbreak of *Yersinia enterocolitica* O:8 infections associated with pasteurized milk," **J Infect Dis**, vol. 181, no. 5, pp. 1834–1837, 2000.
- Andersen, J. K., Sorensen, R. and Glensbjerg, M. 1991. "Aspects of the epidemiology of *Yersinia enterocolitica*: a review". **Int. J. Food Microbiol.** 13 (3): 231-237.

- Anonym** (1988) : *Designs Foods*. National Academic Press. Washington, D.C. 1988.
- Arun K. Bhunia**, “*Foodborne Microbial Pathogens Mechanisms and Pathogenesis*”, 2008, Springer Food Science Text Series
- Ascherio A., Rimm E. B., Giovannucci E. L., Spiegelman D., Stampfer M., Willet W. C.** (1996). “*Dietary fat and risk of coronary heart disease in men: cohort follow up study in the United States*”, **Br. Med. J.**;313:84-90
- Atalla, H.N., Johnson, R., McEwen, S., Osborne, R.W. and Gyles, C.L.** , “*Use of a Shiga toxin (Stx)-enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblot for detection and isolation of Stx-producing Escherichia coli from naturally contaminated beef*”, **J Food Protect.** 63(9), 1167–1172 (2000)
- Banatvala, N., Griffin P.M, Greene K.D., Barrett T.J., Bibb W.F., Green J.H., Wells J.G., and the Hemolytic Uremic Syndrome Study Collaborators.** “The United States national prospective hemolytic uremic syndrome study: microbiologic, serologic, clinical, and epidemiologic findings”, **J Infect Dis** 183:1063-1070, (2001)
- Berzero R.,Volterra L., and Chiesa C.**, “*Isolation of yersinia from sewage,*” **Contributions to Microbiology and Immunology**, vol. 12, pp. 40–43, 1991"
- Betts, G.** (2006). *Other spoilage bacteria. In Food spoilage microorganisms*, pp. 213-286. Edited by C. de W. Blackburn. Cambridge, Woodhead Publishing Limited, Abington Hall, Abington.
- Blei F., Puder D.R.**, “*Yersinia enterocolitica bacteremia in a chronically transfused patient with sickle cell anemia. Case report and review of the literature*”, **Amer. J. Pediatr. Hema-tol. Oncol.** 15 (1993) 430–434.
- Bliska J.B., Falkow S.**, “*Bacterial resistance to complement killing mediated by the Ail protein*”, **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 89 (1992) 3561–3565
- Boerlin P., McEwen S.A., Boerlin-Petzold F., Wilson J.B., Johnson R.P., Gyles C.L.**, “*Associations between virulence factors of Shiga toxin-producing Escherichia coli and disease in humans*”, **J. Clin. Microbiol.** 37 (1999) 497–50

- Bonardi S., Brindani F., Pizzin G., Lucidi L., D'Incau M., Liebana E., Morabito S.,**
“Detection of Salmonella spp., Yersinia enterocolitica and verocytotoxin-producing Escherichia coli O157 in pigs at slaughter in Italy”, **Int. J. Food Microbiol.** 85 (2003) 101–110.
- Bottone E.J.**, “Yersinia enterocolitica: the charisma continues”, *Clin. Microbiol. Rev.* 10 (1997) 257–276.
- Bottone E.J.**, “Yersinia enterocolitica: overview and epidemiologic correlates,” *Microbes and Infection* , vol. 1, no. 4, pp. 323–333, 1999
- Bowers, J.A.** etc (1991). *Lessons on Meat National Live Stock and Meat Board* Chicago, USA
- Boyapalle S, Wesley IV, Hurd HS & Reddy PG**, “Comparison of culture, multiplex, and 5' nuclease polymerase chain reaction assay for the rapid detection of Yersinia, enterocolitica in swine and pork products”. **J Food Prot** 2001, 64: 1352–1361.
- Boyce, T.G., D.L. Swerdlow, and P.M. Griffin.** “Escherichia coli O157:H7 and the hemolytic-uremic syndrome”, **N Engl J Med**, 1995a.,333:364-368.
- Brashears M.M., Galyean M.L., Loneragan G.H., Mann J.E., Killinger-Mann K.,**
“Prevalence of Escherichia coli O157:H7 and performance by beef feedlot cattle given Lacto-bacillus direct-fed microbials”, **J. Food Prot.** 66 (2003) 748–754.
- Brooks, H.J.L., Mollison, B.D., Bettelheim, K.A., Matejka, K., Paterson, K.A. and Ward, V.K.**, “Occurrence and virulence factors of non-O157 Shiga toxin-producing Escherichia coli in retail meat in Dunedin New Zealand”, **Letters in Applied Microbiology** 32, 118–122, (2001)
- Burland V., Shao Y., Perna N.T., Plunkett G., Sofia H.J., Blattner F.R.,** *The complete DNA sequence and analysis of the large virulence plasmid of Escherichia coli O157:H7*, *Nucleic Acids Res.* 26 (1998) 4196–4204.
- C.D.C.** *Morbidity and Mortality Weekly Report, Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks- United States 2008*, September 9, 2011/ Vol. 60/ No.35

- C.D.C.**, *Morbidity and Mortality Weekly Report, Vital Signs: Incidence and Trends of Infection with Pathogens Transmitted Commonly Through Food --- Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 U.S. Sites, 1996--2010*, <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwr>
- Caprioli, A., Morabito, S., Brugere, H. and Oswald, E.**, “*Enterohaemorrhagic Escherichia coli: emerging issues on virulence and modes of transmission*”, *Vet. Res.* 2005, 36 (3): 289-311
- Caroff, M., Bundle, D.R. and Perry, M.B.** , “*Structure of the O-chain of the phenol-phase soluble cellular lipopolysaccharide of Yersinia enterocolitica serotype O:9*”, *European J Biochem.* 139, 195–200 (1984)
- Chapman P.A., Siddons C.A., Cerdan Malo A.T., Harkin M.A.**, “*A one year study of Escherichia coli O157 in raw beef and lamb products*”, *Epidemiol. Infect.* 124 (2000) 207–213.
- Christensen, S. G.** (1979). *Isolation of Yersinia enterocolitica O:3 from a well suspected as the source of yersiniosis in a baby.* *Acta Vet. Scand.* 20 (1): 154-156
- Conedera G., Dalvit P., Martini M., Galiero G., Gramaglia M., Goffredo E., Loffredo G., Morabito S., Ottaviani D., Paterlini F., Pezzotti G., Pisanu M., Semprini P., Caprioli A.**, *Verocytotoxin-producing Escherichia coli O157 in minced beef and dairy products in Italy*, *Int. J. Food Microbiol.* 96 (2004) 67–73.
- Cornelis G.R.**, “*The Yersinia deadly kiss*,” *Journal of Bacteriology*, vol. 180, no. 21, pp. 5495–5504, 1998
- De Giusti M., De Vito E., Serra A., Quattrucci A., Boccia A., Pacifico L., Ranucci A., Ravagnan G., and Chiesa.** *Occurrence of pathogenic in slaughtered pigs and pork products*, *Contrib. Microbiol. Immunol.* 13:126-129(1995).
- Dainty, R.H., Mackey, B.M.**, (1992). “*The relationship between the phenotypic properties of bacteria from chill-stored meat and spoilage processes*”. *J. Appl. Bacterial. Symp. Suppl.* 73, 103-114

- De Koning Ward, Robins-Browne, R.M.** *Contribution to urease to acid tolerance in Yersinia enterocolitica*, Infect. Immun. (1995), 63: 3790- 3795
- Delahay R.M., Frankel G., Knutton S.**, *Intimate interactions of enteropathogenic Esche-richia coli at the host cell surface*, Curr. Opin. ,Infect. Dis. 14 (2001) 559–565
- Di Fabio, J.L., Perry, M.B. and Bundle, D.R.** (1987) *Analysis of the lipopolysaccharide of Pseudomonas maltophilia 555*. Canadian J Biochem. Cell. Biol. 65, 968–977
- Donnenberg M. S., Kaper J. B., Finlay B. B.,** *Interactions between enteropathogenic Escherichia coli and host epithelial cells*. Trends Microbiol (1997) 5:109-114
- Dontorou C., Papadopoulou C., Filioussis G., Economou V., Apostolou I., ZakkasG., Salamoura A., Kansouzidou A., Levidiotou S.**, *"Isolation of Escherichia coli O157:H7 from foods in Greece"*,**International J Food Microb.**82 (2003) 273 – 279
- Doyle, M. P., Beuchat, L. R., & Montville, T. J .** (2007). *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers*. Washington, DC: ASM Press
- Doyle MP, Schoeni JL.** *"Survival and growth characteristics of Escherichia coli associated with hemorrhagic colitis "*. Applied and environmental microbiology 48 (1984) (4): 855–6
- ECDC**, *Annual epidemiological report on communicable diseases in Europe 2010*, www.ecdc.europa.eu" Ecdc, *Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in the European Union in 2008*, April 2010
- EFSA, ECDC**, *"SCIENTIFIC REPORT OF EFSA AND ECDC" The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2009"*, **Efsa J** (2011);9(3):2090
- EFSA, ECDC**, *"The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents and Foodborne Outbreaks in The European Union in 2008"*, **EFSA Journal** 2010 8(1):1496

- EFSA**, *Monitoring and identification of human enteropathogenic Yersinia spp* , **The Efsa J** (2007) 595, 1-30
- Elder RO, Keen JE, Siragusa GR, Barkocy-Gallagher GA, Koohmaraie M, and Laegreid WW.** *Correlation of enterohemorrhagic Escherichia coli O157 prevalence infeces, hides, and carcasses of beef cattle during processing.* Proc Nat Acad Sci USA 97(2000):2999–3003"
- Falcao J.P, Brocchi M, Proenca., J.L. , Modena, Acrani, G.O, Cor ea., E.F., and Falc ao D.P.,** “Virulence characteristics and epidemiology of *Yersinia enterocolitica* and Yersinia other than *Y. pseudotuberculosis* and *Y. pestis* isolated from water and sewage,” **Journal of Applied Microbiology**, vol. 96, no. 6, pp. 1230–1235, 2004.
- Favie G.I.,Escudero M.E., and de Guzman A.M.S,** “*Genotypic and phenotypic characteristics of Yersinia enterocolitica isolated from the surface of chicken egg shells obtained in Argentina,*” **Journal of Food Protection** ,vol. 68,no.9,pp.1812–1815, 2005
- Feder I., Wallace F.M., Gray J.T., Fratamico P., Fedorka-Cray P.J., Pearce R.A., Call J.E., Perrine R., Luchansky J.B.,** *Isolation of Escherichia coli O157 from intact colon faecal samples of swine,* Emerg. Infect. Dis. 9 (2003) 380–383.
- Frankel G., Phillips A.D., Rosenshine I., Dougan G., Kaper J.B., Knutton S.,** *Enteropathogenic and enterohaemorrhagic Escherichia coli: more subversive elements,* Mol. Microbiol. 30 (1998) 911–921.
- Fredriksson-Ahomaa M & Korkeala H (2003b)** *Molecular epidemiology of Yersinia enterocolitica 4/O:3.* Adv Exp Med Biol 529: 295–369.
- Fredriksson-Ahomaa M, Koch U. , Klemm C ., Bucher M., and Stolle A. ,** “*Different genotypes of Yersinia enterocolitica 4/O:3 strains widely distributed in butcher shops in the Munich area,*” **Intern. J Food Microb.**, vol. 95, no. 1, pp. 89–94, 2004

- Fredriksson-Ahomaa M, Korte T., and Korkeala H.** “Contamination of carcasses, offals, and the environment with *yadA*-positive *Yersinia enterocolitica* in a pig slaughterhouse,” **J of Food Prot.** , vol. 63, no. 1, pp. 31–35, 2000
- Fredriksson-Ahomaa M, Korte T., and Korkeala H.**, “ Transmission of *Yersinia enterocolitica* 4/O:3 to pets via contaminated pork,” *Letters in Appl. Microb.*, vol. 32, no. 6, pp. 375–378, 2001
- Fredriksson-Ahomaa M., Hallanvuori S., Korte T, Siitonen A., and Korkeala H .,** “Correspondence of genotypes of sporadic *Yersinia enterocolitica* bioserotype 4/O:3 strains from human and porcine sources,” **Epidemiology and Infection** , vol. 127, no.1, pp. 37–47, 2001
- Fredriksson-Ahomaa M., Stolle A, and Korkeala H.**, “Molecular epidemiology of *Yersinia enterocolitica* infections,” *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, vol. 47, no. 3, pp.315–329, 2006.
- Fredriksson-Ahomaa M., Stolle A., Siitonen A., and Korkeala H.**, “Sporadic human *Yersinia enterocolitica* infections caused by bioserotype 4/O:3 originate mainly from pigs,” **Journal of Medical Microbiology**, vol. 55, no. 6, pp. 747–749, 2006.
- Fremaux B, Delignette-Muller ML, Prigent-Combaret C, Gleizal A, and Vernozy-Rozand C.** 2006. “Growth and survival of non-O157:H7 shiga-toxin-producing *Escherichia coli* in cow manure”. **J Appl Microbiol** 2007 Jan;102(1):(89-99)
- Friedrich A.W., Bielaszewska M., Zhang W.L., Pulz M., Kuczius T., Ammon A., Karch H.**, *Escherichia coli* harboring Shiga toxin 2 gene variants: frequency and association with clinical symptoms, **J. Infect. Dis.** 185 (2002) 74–84
- Garcia-Lopez, M.L., M.Prieto, A. Otero.** (1998). *The physiological attributes of Gram-negative bacteria associated with the spoilage of meat and meat products.* In: A Davies, R Board. Eds. *The Microbiology of Meat and Poultry*. London :Blackie Academic & Professional, pp 1-34
- Gill C.O.**, *Microbiological contamination of meat during slaughter and butchering of cattle, sheep and pigs.* In: A Davies, R Board. Eds. *The Microbiology of Meat and Poultry*, pp118-157. London: Blackie Academic and Professional (1998).

- Gill C.O., Newton K.G.** “*The development of aerobic spoilage on meat stored at chill temperatures*”. **J Appl Bacteriol** 43:189-195, (1977)
- GrahekOgden D. , Schimmer B., Cudjoe K. S.,Nygard K., and Kapperud G.,** “*Outbreak of Yersinia enterocolitica serogroup O:9 infection and processed pork, Norway,*” *Emerging Infectious Diseases*, 2007, vol. 13, no. 5, pp. 754–756, .
- Greenland K, de Jager C, Heuvelink A, van der Zwaluw K, Heck M, Notermans D, et al.** *Nationwide outbreak of STEC O157 infection in the Netherlands, December 2008-January 2009: continuous risk of consuming raw beef products.* *Euro Surveill.* 2009;14(8):pii=19129.Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19129>
- Griffin P.M. & Tauxe R.V. .** *The Epidemiology of Infections Caused by Escherichia coli O157: H7, Other Enterohemorrhagic E. coli, and the Associated Hemolytic Uremic Syndrome,* *Epidemiol Rev* (1991) 13(1): 60-98
- Griffin, P.M. 1995.** *Escherichia coli O157:H7 and other enterohemorrhagic Escherichia coli.* Pp. 739-761 in **Infections of the Gastrointestinal Tract**, M.J. Blaser, P.D. Smith, J.I. Ravdin, H.B. Greenberg, and R.L. Guerrant, eds. New York: Raven Press, Ltd.
- Handley SA, Newberry RD, Miller VL.** *Yersinia enterocolitica invasin-dependent and invasin-independent mechanisms of systemic dissemination.* *Infect Immun.* Dec 2005;73(12):8453-5
- Hartland E.L., Batchelor M., Delahay R.M., Hale C., Matthews S., Dougan G., Knutton S., Connerton I., Frankel G.,** *Binding of intimin from enteropathogenic Escherichia coli to Tir and to host cells,* *Mol. Microbiol.* 32 (1999) 151–158
- Heuvelink A.E., Van den Biggelaar F.L., De Boer E., Herbes R.G., Melchers W.J., Huis in 't Veld J.H., Monnens L.A.,** “*Isolation and characterization of verocytotoxin-producing Escherichia coli O157 strains from Dutch cattle and sheep*”, **J. Clin. Microbiol.** 36 (1998)878–882.

- HMSO**, *Management of Outbreaks of Foodborne Illness. Yersinia enterocolitica*. Ed. Department of Health. London.. 1994,97-8
- Hoogkamp-Korstanje J.A.A., deKoning J., Heeseman J.**, *Persistence of Yersinia enterocolitica in man*, *Infection* 16 (1988) 81–85
- Hussein, H. S. and Bollinger, L. M.** . “Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef cattle”. **J. Food Prot.** 68 (10): 2224-2241 (2005)
- International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF)** (1998a). *Meat and meat products. In Microorganisms in foods*, book 6, microbial ecology of food commodities(pp. 1–74). London: Blackie Academic and Professional.
- Isberg R.R., Leong J.M.**, *Multiple B1 chain integrins are receptors for invasin a protein that promotes bacterial pen-etration into mammalian cells*, *Cell* 60 (1990) 861–871.
- Itoh Y., Sugita-Konishi Y., Kasuga F., Iwaki M., Hara-Kudo Y., Saito N., Noguchi Y., Konuma H., Kumagai S.**, *Enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 present in radish sprouts*, *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (1998) 1532–1535.
- Johannessen GS, Bengtsson GB, Heier BT, Bredholt S, Wasteson Y, and Rorvik LM.** . *Potential uptake of Escherichia coli O157:H7 from organic manure into crisphead lettuce*. *Appl Environ Microbiol* 71 (2005):2221–2225.
- Judge ,D.** (1975). *Principles of Meat Science*. Kendall Hunt Publ. Co., Iowa
- Karch H, Russmann H, Schmidt H, Schwarzkopf A, and Heesemann J.**, “Long-term shedding and clonal turnover of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 in diarrheal diseases”. **J Clin Microbiol** 33(1995):1602–1605"
- Kathleen Park Talaro, Barry Chess**, *Foundations in Microbiology*, Eighth Edition 2011, McGraw Hill Higher Education
- Klapproth J.M., Scaletsky I.C., McNamara B.P., Lai L.C., Malstrom C., James S.P.,Donnenberg M.S.**, *A large toxin from patho-genic Escherichia coli strains that inhibits lymphocyte activation*, *Infect. Immun.* 68 (2000) 2148–2155

- Koutsoumanis K. and Sofos J.N.** *Microbiology of carcasses and cuts*. In: Jensen W., Devine C., and Dikeman, M.eds. *Encyclopedia of Meat Sciences*. Academic Press (2005)
- Lambertz S. T. and Danielsson-Tham M.L.**, “*Identification and characterization of pathogenic Yersinia enterocolitica isolates by PCR and pulsed-field gel electrophoresis*,” **Applied and Environmental Microbiology**, vol. 71, no. 7, pp. 3674–3681, 2005
- Leclercq A., Mahillon J.**, *Farmed rabbits and ducks as vectors for VTEC O157:H7*, *Vet.Rec.* 152 (2003) 723–724.
- Lee L. A., Gerber A. R, Lonsway D. R et al.**, “*Yersinia enterocolitica O:3 infections in infants and children, associated with the household preparation of chitterlings*,” **The New England J of Med.** , vol. 322, no. 14, pp. 984–987, 1990
- Lee T.S., Lee S.W., Seok W.S et al.**, “*Prevalence, antibiotic susceptibility, and virulence factors of Yersinia enterocolitica and related species from ready-to-eat vegetables available in Korea*,” **J Food Protect.** , vol. 67, no. 6, pp. 1123–1127, 2004
- Liao, C. H.** (2006). *Pseudomonas and related genera. In Food spoilage microorganisms*, pp. 213-286. Edited by C. de W. Blackburn, Cambridge: Woodhead Publishing Limited, Abington Hall, Abington
- Mainil J.**, *Shiga/verocytotoxins and Shiga/verotoxigenic Escherichia coli in animals*, *Vet. Res.* 30 (1999) 235–257
- Martinez P. O. , Fredriksson-Ahomaa M. , Pallotti A. , Rosmini R., Houf K., and Korkeala H.**, “*Variation in the prevalence of enteropathogenic Yersinia in slaughter pigs from Belgium, Italy, and Spain*,” *Foodborne Pathogens and Disease* , vol. 8, no. 3, pp. 445–450, 2011
- Mead, P., and P. Griffin.** 1998. “*Escherichia coli O157:H7*”. **Lancet** 352:1207-1212.
- Mead, P.S., Slutsker, L., Dietz, V., McGaig, L.F., Bresee, J.S., Shapiro, C., Griffin, P.M. and Tauxe, R.V..** *Food related illness and death in the United States*. *Emerging Infectious Dis.* 5, 607–625, (1999)

- Melton-Celsa A.R., O'Brien A.**, *Structure, biology, and relative toxicity of Shiga toxin family members for cells and animals*, in: *Kaper J.B., O'Brien A.D. (Eds.), Escherichia coli O157:H7 and other Shiga toxin-producing E. coli strains*, American Society for Microbiology, Washington, DC, 1998, pp. 121–128
- Mermin J.H., Griffin P.M.**, “Public health in crisis: outbreaks of *Escherichia coli* O157:H7 infections in Japan”, **Am. J. Epidemiol.** 150 (1999) 797–803.
- “Monitoring and identification of human enteropathogenic *Yersinia* spp. Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards”, **The EFSA Journal** (2007) 595, 1-30
- Morabito S., Tozzoli R., Oswald E., Caprioli A.**, *A mosaic pathogenicity island made up of the locus of enterocyte effacement and a pathogenicity island of Escherichia coli O157:H7 is frequently present in attaching and effacing E. coli*, *Infect. Immun.* 71 (2003) 3343–3348
- Moriki S. , Nobata A., Shibata H. et al.**, “Familial outbreak of *Yersinia enterocolitica* serotype O9 biotype 2,” **J Infection and Chemoth.**, vol. 16, no. 1, pp. 56–58, 2010
- Nataro J.P., Kaper J.B.**, *Diarrheagenic Escherichia coli*, *Clin. Microbiol. Rev.* 11 (1998) 142–201.
- Nesbakeen T.** *Yersinia enterocolitica*, in *Emerging Foodborne Pathogens*. Eds Motarjemi Y., Adams M. Cambridge. Woodhead Publishing Ltd., 2006, 373 -405
- Nesbakken T., Gondrosen B., and Kapperud G.**, “Investigation of *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia enterocolitica*-like and thermotolerant campylobacters in Norwegian pork products”. **Int. J. Food Microbil.** (1985), 1:311-320
- Niinaavara, F. und P. Antila** (1972). *Der Nährwerte des Fleisches*. Verl. Der Rhein Hessischen Druckwerkst., Alzey.
- Ogden I.D., Hepburn N.F., MacRae M., Strachan N.J., Fenlon D.R., Rusbridge S.M., Pennington T.H.**, *Long-term survival of Escherichia coli O157 on pasture following an outbreak associated with sheep at a scout camp*, *Lett. Appl. Microbiol.* 34 (2002) 100–104."

- Olsen S.J., Miller G., Breuer T., Kennedy M., Higgins C., Walford J., McKee G., Fox K., Bibb W., Mead P.,** *A waterborne out-break of Escherichia coli O157:H7 infections and hemolytic uremic syndrome: implications for rural water systems*, Water Sci. Technol. 47 (2003) 7–14.
- Ostroff S.,** *Yersinia as an emerging infection. Epidemiologic aspects of yersiniosis*, Contrib. Microbiol. Immunol. 13 (1995) 5–10
- Oswald E., Schmidt H., Morabito S., Karch H., Marches O., Caprioli A.,** *Typing of intimin genes in human and animal entero-hemorrhagic and enteropathogenic Escherichia coli: characterization of a new intimin variant*, Infect. Immun. 68 (2000) 64–71
- Paerregaard A., Espersen F., Jensen O.M., Skurnik M.,** *Interactions between Yersinia enterocolitica and rabbit ileal mucus: growth adhesion, penetration, and subsequent changes in surface hydrophobicity and ability to adhere to ileal brush border membrane vesicles*, Infect. Immun. 59 (1991) 253–260.
- Payne C.J., Petrovic M., Roberts R.J., Paul A., Linnane E., Walker M., Kirby D., Burgess A., Smith R.M., Cheasty T., Willshaw G., Salmon R.L.,** *Vero cytotoxin-producing Escherichia coli O157 gastroenteritis in farm visitors, North Wales*, Emerg. Infect. Dis. 9 (2003) 526–530
- Pennington TH.** 2000. “VTEC: lessons learned from British outbreak”s. **J Appl Microbiol** 88:90S–98S.
- Ratnam S, Mercer E.,and Picco B.,**“Anosocomial outbreak of diarrheal disease due to Yersinia enterocolitica serotype O:5, biotype 1 ,” **J Infection Dis** , vol. 145, no. 2, pp.242–247, 1982
- Reid S.D., Herbelin C.J., Bumbaugh A.C., Selander R.K., Whittam T.S.,** *Parallel evolution of virulence in pathogenic Escherichia coli*, Nature 406 (2000) 64–67.
- Reida P, Wolff M, Pohls HW, Kuhlmann W, Lehmacher A, Aleksic S, Karch H, and Bockemuhl J..** “An outbreak due to enterohaemorrhagic Escherichia coli O157:H7 in a children day care centre characterized by person-to-person transmission and environmental contamination”,. **Int J Med Microbiol Virol Parasitol Infect Dis** 281:534–43 (1994)

- Rendón, M. A.; et al.** (2007). "*Commensal and pathogenic Escherichia coli use a common pilus adherence factor for epithelial cell colonization*". *PNAS* 104 (25): 10637–10642
- Renter D.G., Sargeant J.M., Hygnstorm S.E., Hoffman J.D., Gillespie J.R.,** "*Escherichia coli O157:H7 in free-ranging deer in Nebraska*", **J. Wildl. Dis.** 37 (2001) 755–760
- Riley L, Remis R, Helgerson S, McGee H, Wells J, Davis B, Hebert R, Olcott E, Johnson L, Hargrett N, Blake P, Cohen M .** "*Hemorrhagic colitis associated with a rare Escherichia coli serotype*". **N Engl J Med** 308 (12): 681–5. PMID 6338386,(1983)
- Robert Koch Institut,** (2000), *Stellungnahme des Arbeitskreises Blut: Yersinia enterocolitica*, Internet: www.rki.de/GESUND/AKBLUT/STELL/ST05.HTM
- Robins-Browne R. M. ,** "*Yersinia enterocolitica,*" in *Food Microbiology, Fundamentals and Frontiers*, M. P. Doyle, L. R. Beuchat, and T. J. Montville, Eds., pp. 215–245, ASM Press, Washington, DC, USA, 2nd edition, 2011
- Romans J.R., Costello W.J., Carlson C.W., Greaser M.L. and Jones K.W.** (2001). *The meat we eat. Fourteenth Edition.* Interstate Publishers, Danville, Illinois
- Sakai T., Nakayama A., Hashida M., Yamamoto Y., Takebe H., and Imai S..** "*Outbreak of food poisoning by Yersinia enterocolitica serotype O8 in Nara Prefecture: the first case report in Japan,*" **Japanese J Infect Dis** , vol. 58, no. 4, pp. 257–258, 2005
- Samelis J.,** *Managing microbial spoilage in the meat industry*, C. Blackburn (Ed)., Food Spoilage Microorganisms, Woodhead Publishing, Cambridge (2006), pp 213-286
- Sandery M. , Stinear T., and Kaucner C.,** "*Detection of pathogenic Yersinia enterocolitica in environmental waters by PCR,*" **J of Applied Bacter.**, vol. 80, no. 3, pp. 327–332, 1996
- Scheutz F., Beutin L., Pierard D., Smith H.R.,** *Nomenclature of Verocytotoxins*, in: Duffy G., Garvey P., McDowell D. (Eds.), *Verocytotoxigenic Escherichia coli*, Food & Nutrition Press Inc., Trumbull, 2001, pp. 447–45

- Schmidt H., Scheef J., Morabito S., Caprioli A., Wieler L.H., Karch H.,** *A new Shiga toxin 2 variant (Stx2f) from Escherichia coli isolated from pigeons*, Appl. Environ. Microbiol. 66 (2000) 1205–1208
- Selbitz, H.-J.** (1992). *Lehrbuch der veterinärmedizinischen Bakteriologie*, Gustav Fischer Verlag Jena
- Siegler, R.L., A.T. Pavia, R.D. Christofferson, and M.K. Milligan.** . *A 20-year population-based study of postdiarrheal hemolytic uremic syndrome in Utah*. Pediatrics 94:35-40 (1994)
- Silveira, N.F.A., Silva, N., Contreras, C., Miyagusku, L., Baccin, M.L.F., Koono, E. and Beraquet, N.J.** “*Occurrence of Escherichia coli O157:H7 in hamburgers produced in Brazil*”, **J of Food Prot.** 62(11), 1333–1335,(1999)
- Solomon EB, Pang HJ, and Matthews KR.,** “*Persistence of Escherichia coli O157:H7 on lettuce plants following spray irrigation with contaminated water*”. **J Food Prot** (2003) 66:2198–2202.
- Stanbridge, L. H. & Davies, A. R.** (1998). *The microbiology of chill stored meat. In The microbiology of meat and poultry*, pp. 174-219. Edited by A. R. Davies and R.G. Board, London: Blackie Academic and Professional
- Stevens M.P., Van Diemen P.M., Frankel G., Phillips A.D., Wallis T.S.,** *Efa1 influences colonisation of the bovine intestine by Shiga-toxin producing Escherichia coli serotypes O5 and O111*, Infect. Immun. 70 (2002) 5158–5166.
- Sulakvelidze A., Dalakishvili K., Bary E. et al.,** “*Analysis of clinical and environmental Yersinia isolates in the Republic of Georgia*,” **J of Clin Microb.**, 1996, vol. 34, no. 9, pp. 2325–2327
- Tatsuno I., Kimura H., Okutani A., Kanamaru K., Abe H., Nagai S., Makino K., Shinagawa H., Yoshida M., Sato K., Nakamoto J., Tobe T., Sasakawa C.,** *Isolation and characterization of mini-Tn5Km2 insertion mutants of enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 deficient in adherence to Caco-2 cells*, Infect. Immun. 68 (2000) 5943–5952

The Marler Clark Network, <http://www.marlerclark.com/>

- Tozzi A.E., Goriatti S., Caprioli A.**, *Epidemiology of human infections by Escherichia coli O157 and other verocytotoxin-producing E. coli*, in: Duffy G., Garvey P., McDowell D. (Eds.), *Verocytotoxigenic Escherichia coli*, Food & Nutrition Press Inc., Trumbull, 2001, pp. 161–179
- Trevena W.B., Hooper R.S., Wray C., Willshaw G.A., Cheasty T., Domingue G.**, *Vero cytotoxin-producing Escherichia coli O157 associated with companion animals*, *Vet. Rec.* 138 (1996) 400
- Urdahl A.M., Beutin L., Skjerve E., Zimmermann S., Wasteson Y.**, “*Animal host associated differences in Shiga toxin-producing Escherichia coli isolated from sheep and cattle on the same farm*”, *J. Appl. Microbiol.* 95 (2003) 92–101.
- Varnam A.H. and Sutherland J.P.** (1999). *Το κρέας και τα προϊόντα του*. Εκδόσεις ΙΩΝ και ΣΙΑ, Περιστέρι, Αττική
- Vishnubhatla, A., Oberst, R. D., Fung, D. Y. C., Wonglumsom, W., Hays, M. P. and Nagaraja, T. G.** (2001) “*Evaluation of a 5'-nuclease (TagMan) Assay for the detection of virulent strains of Yersinia enterocolitica in raw meat and tofu samples*”, *J Food Prot* 64:355–360.
- Wang X., Cui Z., Wang H. et al.**, “*Pathogenic strains of Yersinia enterocolitica isolated from domestic dogs (Canis familiaris) belonging to farmers are of the same subtype as pathogenic Y. enterocolitica strains isolated from humans and maybe a source of human infection in Ji ang su Province, China,*” *J Clinical Microb.*, vol. 48, no. 5, pp. 1604–1610, 2010
- Wasteson Y.**, *Epidemiology of verocytotoxin-producing E. coli in non-ruminant animals*, in: Duffy G., Garvey P., McDowell D. (Eds.), *Verocytotoxigenic Escherichia coli*, Food & Nutrition Press Inc., Trumbull, 2001, pp. 149–160.
- Weagant, S.D., Bryant, J.L. and Jinneman, K.G.** (1995) “*An improved rapid technique for isolation of Escherichia coli O157:H7 from foods*”, *J Food Protect.*, 7–12.
- Wells JG, Davis BR, Wachsmuth IK, et al** (September 1983). “*Laboratory investigation of hemorrhagic colitis outbreaks associated with a rare Escherichia coli serotype*”. *J of Clin. Microb.* 18 (3): 512–20

WHO , *Global strategy for food safety*, 2002

WHO, *Factsheet 237*, 2007

WHO, *Factsheet 125*, 2011

Wikipedia, http://en.wikipedia.org/wiki/Escherichia_coli

Wong, C.S., S. Jelacic, R.L. Habeeb, S.L. Watkins, and P.I. Tarr.. *The risk of the hemolytic-uremic syndrome after antibiotic treatment of E. coli O157:H7 infections.* **N Engl J Med** 342(26):1930-1936 (2000).

Wren, B.W., *The Yersiniae—a Model Genus to Study the Rapid Evolution of Bacterial Pathogen*, *Nat. Rev. Microbiol.*, 2003, vol. 1, pp. 55–64.

Zumbihl R.,Aepfelbacher M,Andor A. et al., “ *The cytotoxin YopT of Yersinia enterocolitica induces modification and cellular redistribution of the small GTP-binding protein RhoA,*” **J Biological Chem.**, vol. 274, no. 41, pp. 29289–29293, 1999.