

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΥΓΙΕΙΝΗ
ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΚΙΜΑΔΩΝ
ΤΟΥ ΕΜΠΟΡΙΟΥ (ΝΩΠΙΟΣ, ΚΑΤΕΨΥΓΜΕΝΟΣ, ΕΓΧΩΡΙΟΣ,
ΕΙΣΑΓΩΓΗΣ) ΜΕ ΕΜΦΑΣΗ ΣΤΗΝ ΑΝΑΖΗΤΗΣΗ ΣΑΛΜΟΝΕΛΛΩΝ
ΚΑΙ ΛΙΣΤΕΡΙΩΝ

ΓΕΩΡΓΙΟΣ Η. ΒΑΛΙΑΚΟΣ

ΚΤΗΝΙΑΤΡΟΣ Α.Π.Θ.

ΛΑΡΙΣΑ ΦΕΒΡΟΥΑΡΙΟΣ 2012

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΥΓΙΕΙΝΗ
ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΚΙΜΑΔΩΝ
ΤΟΥ ΕΜΠΟΡΙΟΥ (ΝΩΠΙΟΣ, ΚΑΤΕΨΥΓΜΕΝΟΣ, ΕΓΧΩΡΙΟΣ,
ΕΙΣΑΓΩΓΗΣ) ΜΕ ΕΜΦΑΣΗ ΣΤΗΝ ΑΝΑΖΗΤΗΣΗ ΣΑΛΜΟΝΕΛΛΩΝ
ΚΑΙ ΛΙΣΤΕΡΙΩΝ

ΓΕΩΡΓΙΟΣ Η. ΒΑΛΙΑΚΟΣ

ΚΤΗΝΙΑΤΡΟΣ Α.Π.Θ.

ΛΑΡΙΣΑ ΦΕΒΡΟΥΑΡΙΟΣ 2012

ΕΠΙΒΛΕΠΟΝΤΕΣ ΚΑΘΗΓΗΤΕΣ

ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ Δ. ΔΑΝΙΗΛΙΔΗΣ

ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΣ ΜΗΝΑΣ

ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ ΓΚΟΒΑΡΗΣ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα τρόφιμα ζωικής προέλευσης αποτελούν, ως γνωστόν, το πλέον κατάλληλο υπόστρωμα για την ανάπτυξη διαφόρων παθογόνων παραγόντων και ευθύνονται για το μεγαλύτερο ποσοστό των κρουσμάτων τροφιμογενών λοιμώξεων/τοξινώσεων στον άνθρωπο. Ο κιμάς (μιττωτός) αποτελεί το πλέον ευπαθές τρόφιμο ζωικής προέλευσης και καταναλώνεται ευρύτατα παγκοσμίως. Αποτελεί ένα θαυμάσιο υπόστρωμα για την ανάπτυξη όλων των βακτηρίων και υπόκειται εξαιρετικά εύκολα σε επιμολύνσεις από τις οποίες, πρακτικά, είναι τελείως απροστάτευτος. Τα στοιχεία αυτά επιβάλλουν την τήρηση άσπογων συνθηκών υγιεινής, την ψύξη και τη διάθεση του κιμά σε σύντομο χρονικό διάστημα από την παραγωγή του.

Ο έλεγχος της μικροβιολογικής ποιότητας του κιμά μπορεί να επιτευχθεί με τη μέτρηση της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας, της οποίας η τιμή αποτελεί ένα σημαντικό δείκτη τήρησης των κανόνων υγιεινής κατά τη διαδικασία παρασκευής ενός τροφίμου. Παράλληλα απαιτείται και η διερεύνηση ύπαρξης σημαντικών παθογόνων τα οποία δύναται να αποτελέσουν πηγή κινδύνων για τον άνθρωπο κατά το χειρισμό ή την κατανάλωση ενός τροφίμου. Περίοπτη θέση σε αυτόν τον κατάλογο των σημαντικών παθογόνων κατέχουν είδη των γενών *Salmonella* και *Listeria*. Αποτελούν μικροοργανισμούς οι οποίοι εμπλέκονται σε ένα σημαντικό ποσοστό κρουσμάτων τροφολοιμώξεων με παγκόσμια κατανομή.

Κατά την παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε ο έλεγχος της μικροβιολογικής ποιότητας δειγμάτων κιμά διαφόρων χαρακτηριστικών (νωπός, κατεψυγμένος, εγχώριος, εισαγόμενος) τα οποία πάρθηκαν τυχαία από καταστήματα λιανικής πώλησης κρέατος (κρεοπωλεία, σούπερ μάρκετ) στην πόλη της Λάρισας. Εκτός της μέτρησης της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας (OMX), πραγματοποιήθηκε αναζήτηση Σαλμονελλών και Λιστεριών στα δείγματα. Οι τεχνικές που εφαρμόστηκαν συμφωνούν με τα αντίστοιχα πρότυπα ISO ενώ για την αναζήτηση Λιστεριών χρησιμοποιήθηκε και η τεχνική VIDAS. Ακολούθησε ανάλυση των αποτελεσμάτων και εξαγωγή συμπερασμάτων.

Ένα σημαντικό ποσοστό των δειγμάτων τα οποία ελέχθησαν κατά το πειραματικό μέρος της παρούσας διπλωματικής εργασίας, βρέθηκαν να φέρουν αρκετά αυξημένο μικροβιακό φορτίο, με τις τιμές της OMX να βρίσκονται ιδιαίτερα υψηλές σε περισσότερα από τα μισά δείγματα. Ενθαρρυντικό στοιχείο αποτέλεσε η απουσία ανίχνευσης *Salmonella* spp. σε όλα τα δείγματα, ενώ η έντονη παρουσία ειδών *Listeria* spp. και ιδιαίτερα *L.monocytogenes* στο κιμά επιβεβαιώνει μελέτες που διεξήχθησαν παγκοσμίως και είχαν παρόμοια αποτελέσματα. Τα ευρήματα καταδεικνύουν την ανάγκη τήρησης των κανόνων υγιεινής τόσο από τους επιχειρηματίες όσο και από τους καταναλωτές κατά το χειρισμό νωπού κρέατος, αλλά και την ανάγκη εντατικοποίησης των ελέγχων από τους αρμόδιους φορείς όσον αφορά τις συνθήκες συντήρησης και τους

κινδύνους διασταυρούμενης μόλυνσης που απορρέουν. Ο εργαστηριακός έλεγχος δειγμάτων κρίνεται ως απαραίτητο εργαλείο εκτίμησης της υπάρχουσας κατάστασης, και η τεχνική VIDAS μπορεί να προσφέρει μία αξιόπιστη και ταχύτατη εναλλακτική των καθιερωμένων κατά ISO προτύπων, τουλάχιστον σε ένα πρώτο στάδιο προκαταρκτικού ελέγχου (screening out) αρνητικών στη παρουσία *L.monocytogenes* δειγμάτων.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	I
ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΠΙΝΑΚΩΝ	II
ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ	III
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
<u>ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ – ΓΕΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ</u>	
Α' ΚΕΦΑΛΑΙΟ – <i>SALMONELLA</i> SPP.	5
ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ ΕΜΦΑΝΙΣΗΣ <i>SALMONELLA</i> SPP.	5
ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ <i>SALMONELLA</i> SPP.	6
ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ <i>SALMONELLA</i> SPP.	7
ΒΙΟΧΗΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ <i>SALMONELLA</i> SPP.	7
ΟΡΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ <i>SALMONELLA</i> SPP.	8
ΑΝΟΣΟΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ <i>SALMONELLA</i> SPP.	9
ΣΑΛΜΟΝΕΛΛΩΣΗ ΣΕ ΖΩΑ ΚΑΙ ΑΝΘΡΩΠΟ	11
ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ – ΣΙΤΙΟΓΕΝΕΙΣ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ	12
Β' ΚΕΦΑΛΑΙΟ - <i>LISTERIA</i> SPP.	14
ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ ΕΜΦΑΝΙΣΗΣ <i>LISTERIA</i> SPP.	14
ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ <i>LISTERIA</i> SPP.	17
ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ <i>LISTERIA</i> SPP.	17
ΒΙΟΧΗΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ <i>LISTERIA</i> SPP.	19
ΟΡΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ <i>LISTERIA</i> SPP.	22
ΑΝΟΣΟΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ <i>LISTERIA</i> SPP.	24
ΛΙΣΤΕΡΙΩΣΗ ΣΤΑ ΖΩΑ	25
ΛΙΣΤΕΡΙΩΣΗ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ	26
ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ <i>LISTERIA</i> SPP.	28
Γ' ΚΕΦΑΛΑΙΟ – ΚΙΜΑΣ (ΜΙΤΤΩΤΟΣ)	30
ΓΕΝΙΚΑ	30

ΚΙΜΑΣ ΚΑΙ ΕΞΑΡΣΕΙΣ ΚΡΟΥΣΜΑΤΩΝ ΤΡΟΦΙΜΟΓΕΝΩΝ ΝΟΣΗΜΑΤΩΝ	31
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
Α' ΚΕΦΑΛΑΙΟ – ΣΚΟΠΟΣ ΚΑΙ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ	34
ΣΚΟΠΟΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	34
ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ	34
Β' ΚΕΦΑΛΑΙΟ – ΑΡΙΘΜΗΣΗ ΟΛΙΚΗΣ ΜΕΣΟΦΙΛΗΣ ΧΛΩΡΙΔΑΣ (ΟΜΧ)	37
ΑΡΙΘΜΗΣΗ ΟΜΧ ΚΑΤΑ ISO 4833	37
ΕΞΕΤΑΖΟΜΕΝΗ ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΑΡΧΙΚΗ ΑΡΑΙΩΣΗ	37
ΕΠΟΜΕΝΕΣ ΑΡΑΙΩΣΕΙΣ	37
ΕΝΣΩΜΑΤΩΣΗ ΣΕ ΡCΑ ΚΑΙ ΕΠΩΑΣΗ	38
ΑΡΙΘΜΗΣΗ ΑΠΟΙΚΙΩΝ	39
Γ' ΚΕΦΑΛΑΙΟ – ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ <i>SALMONELLA</i> SPP.	41
ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΗΣ <i>SALMONELLA</i> SPP. ΣΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ	41
ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΗΣ <i>SALMONELLA</i> SPP. ΚΑΤΑ ISO 6579	41
ΕΞΕΤΑΖΟΜΕΝΗ ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ, ΑΡΧΙΚΗ ΑΡΑΙΩΣΗ ΚΑΙ ΜΗ	
ΕΚΛΕΚΤΙΚΟΣ ΠΡΟΕΜΠΛΟΥΤΙΣΜΟΣ	41
ΕΚΛΕΚΤΙΚΟΣ ΕΜΠΛΟΥΤΙΣΜΟΣ	42
ΣΠΟΡΑ ΣΕ ΣΤΕΡΕΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ	44
ΑΝΑΣΠΟΡΑ ΓΙΑ ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ	46
ΒΙΟΧΗΜΙΚΗ ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ <i>SALMONELLA</i> SPP.	47
ΟΡΟΛΟΓΙΚΗ ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ <i>SALMONELLA</i> SPP.	51
ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΒΙΟΧΗΜΙΚΩΝ ΚΑΙ ΟΡΟΛΟΓΙΚΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΝ	52
ΟΡΙΣΤΙΚΗ ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ <i>SALMONELLA</i> SPP.	53
Δ' ΚΕΦΑΛΑΙΟ – ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i>	55
ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> ΣΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ	55
ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> ΚΑΤΑ ISO 11290	56
ΕΞΕΤΑΖΟΜΕΝΗ ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ, ΑΡΧΙΚΗ ΑΡΑΙΩΣΗ ΚΑΙ	
ΠΡΟΕΜΠΛΟΥΤΙΣΜΟΣ	56

ΕΚΛΕΚΤΙΚΟΣ ΕΜΠΛΟΥΤΙΣΜΟΣ	58
ΣΠΟΡΑ ΣΕ ΣΤΕΡΕΑ ΕΚΛΕΚΤΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ	59
ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ ΤΩΝ <i>LISTERIA</i> SPP.	63
ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ ΤΗΣ <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i>	64
ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΕ ΤΕΧΝΙΚΗ VIDAS	68
ΕΞΕΤΑΖΟΜΕΝΗ ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ, ΑΡΧΙΚΗ ΑΡΑΙΩΣΗ ΚΑΙ ΠΡΟΕΜΠΛΟΥΤΙΣΜΟΣ	68
ΕΚΛΕΚΤΙΚΟΣ ΕΜΠΛΟΥΤΙΣΜΟΣ	69
ΕΦΑΡΜΟΓΗ VIDAS	69
Ε' ΚΕΦΑΛΑΙΟ – ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	70
ΑΠΟΤΕΣΜΑΤΑ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΟΜΧ	72
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΝΑΖΗΤΗΣΗΣ <i>SALMONELLA</i> SPP.	77
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΝΑΖΗΤΗΣΗΣ <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i>	78
ΣΤ' ΚΕΦΑΛΑΙΟ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	81
ΠΕΡΙ ΟΜΧ	81
ΠΕΡΙ <i>SALMONELLA</i> SPP.	83
ΠΕΡΙ <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i>	84
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	86
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	88

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τους Επιβλέποντες Καθηγητές της διπλωματικής μου εργασίας κ. Βασίλειο Δ. Δανηλίδη, κ. Αναστάσιο Μηνά και κ. Αλέξανδρο Γκόβαρη για τη καθοδήγησή τους και τις πολύτιμες συμβουλές τους σε κάθε στάδιο της δημιουργίας της.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα το προσωπικό του Περιφερικού Εργαστηρίου Δημόσιας Υγείας Λάρισας: Μαρία Καρανίκα, Αγγελική Δασκαλάκη, Φωτεινή Κολοκυθοπούλου, Δημήτρη Γκαγκτσή και Άννα Κατσιαφλάκα για τη αμέριστη βοήθειά τους κατά τη πραγματοποίηση του εργαστηριακού μέρους της διπλωματικής εργασίας.

Τέλος θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στους γονείς μου για τα όσα στερήθηκαν ώστε να μου εξασφαλίσουν το ιδανικό περιβάλλον προόδου, και στη σύζυγό μου για την υπομονή της και τη στήριξη που μου προσφέρει στις δύσκολες στιγμές.

Λάρισα, 8η Φεβρουαρίου 2012

ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΠΙΝΑΚΩΝ

ΠΙΝΑΚΑΣ 1 : ΑΡΙΘΜΟΣ ΟΡΟΤΥΠΩΝ <i>SALMONELLA</i> SPP.	7
ΠΙΝΑΚΑΣ 2 : ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΕΣ <i>SALMONELLA</i> SPP.	8
ΠΙΝΑΚΑΣ 3 : ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΑ ΟΡΟΤΥΠΩΝ <i>SALMONELLA</i> SPP.	9
ΠΙΝΑΚΑΣ 4 : ΕΠΙΔΗΜΙΕΣ ΛΙΣΤΕΡΙΩΣΗΣ ΠΕΡΙΟΔΟΣ 1992-2002	15
ΠΙΝΑΚΑΣ 5: ΒΙΟΧΗΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ <i>LISTERIA</i> SPP.	19
ΠΙΝΑΚΑΣ 6: ΒΙΟΧΗΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΕΙΔΩΝ <i>LISTERIA</i> SPP.	22
ΠΙΝΑΚΑΣ 7: ΟΡΟΤΥΠΟΙ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ <i>LISTERIA</i> SPP.	23
ΠΙΝΑΚΑΣ 8 : ΔΕΛΤΙΟ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ	36
ΠΙΝΑΚΑΣ 9 : ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ <i>SALMONELLA</i> SPP. ΚΑΙ ΠΟΣΟΣΤΑ ΕΝΤΟΠΙΣΗΣ	51
ΠΙΝΑΚΑΣ 10 :ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΟΡΟΛΟΓΙΚΩΝ ΚΑΙ ΒΙΟΧΗΜΙΚΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΝ	53
ΠΙΝΑΚΑΣ 11 :ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΤΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΚΙΜΑ	70
ΠΙΝΑΚΑΣ 12 : ΑΝΑΛΥΤΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΚΙΜΑ	71
ΠΙΝΑΚΑΣ 13 : ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΟΜΧ	73
ΠΙΝΑΚΑΣ 14 : ΑΝΑΛΥΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΟΜΧ.	75
ΠΙΝΑΚΑΣ 15 : ΑΝΑΛΥΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ <i>LISTERIA</i> SPP.	79

ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ Α : ΔΟΚΙΜΗ CAMP	21
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ Β : ΑΡΙΘΜΗΣΗ ΟΜΧ ΣΤΟΥΣ 30°C	40
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ Γ: ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΕΙΔΩΝ <i>SALMONELLA</i> SPP.	54
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ Δ: ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΕΙΔΩΝ <i>LISTERIA</i> SPP.	67
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ Ε: ΑΛΛΑΓΕΣ ΣΤΗΝ ΟΜΧ ΚΑΙ ΣΤΟΥΣ ΕΑΜ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΑΛΛΟΙΩΣΗ ΤΟΥ ΚΡΕΑΤΟΣ	82

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα τροφιμογενή νοσήματα αποτελούν για τη σύγχρονη κοινωνία μία σοβαρή και αδιαπραγμάτευτη πρόκληση. Η σοβαρότητα και η αναγκαιότητα αντιμετώπισής τους μπορεί εύκολα να αποδειχτεί από τα παγκόσμια στοιχεία που παραθέτουν οι Διεθνείς Οργανισμοί, όπως ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO, 2007):

- Το 30% των κατοίκων των ανεπτυγμένων χωρών προσβάλλεται από ένα τουλάχιστον τροφιμογενές νόσημα κάθε χρόνο, σχεδόν ο ένας στους τρεις παγκοσμίως.
- Το 2005 έχασαν τη ζωή τους 1.800.000 άνθρωποι παγκοσμίως από διαρροϊκά σύνδρομα, τα περισσότερα εξ' αυτών οφειλόμενα σε τροφιμογενή νοσήματα.
- Μόνο στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής καταγράφονται 76.000.000 περιστατικά ετησίως, με 325.000 νοσηλείες και 5.000 θανάτους. Τα καταγεγραμμένα περιστατικά ανέρχονται στα 2.000.000 ετησίως για το Ηνωμένο Βασίλειο και στα 750.000 για την Γαλλία.
- Το κόστος που προέκυψε στις ΗΠΑ από τα τροφιμογενή νοσήματα, λόγω του κόστους νοσηλείας και της μείωσης παραγωγικότητας, ανήλθε σε 35.000.000.000. δολάρια για το 1997.

Όλα αυτά τα στοιχεία δεν μπορούν παρά να καταδείξουν την ανάγκη διαρκούς διερεύνησης των παραγόντων που οδηγούν στην πρόκληση τροφιμογενών νοσημάτων και στην ανάπτυξη προγραμμάτων πρόληψης που θα μπορούν να προστατεύσουν τον σύγχρονο πολίτη.

Η ανάγκη αυτή γίνεται πιο επιτακτική αν αναλογιστεί κανείς τους παράγοντες οι οποίοι συμβάλλουν στην αύξηση των κρουσμάτων των τροφιμογενών νοσημάτων και οι οποίοι αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι του σύγχρονου πολιτισμού, όπως η βιομηχανοποίηση της παραγωγής τροφίμων, η διακίνηση τροφίμων σε παγκόσμια κλίμακα, η αλλαγή διατροφικών συνηθειών (κατανάλωση σε κέντρα μαζικής εστίασης, fast food) και οι μεγάλες μετακινήσεις πληθυσμών.

Ιδιαίτερη θέση στις διατροφικές συνήθειες παγκοσμίως καταλαμβάνει ο μιττωτός (ή σύγκοπτο κρέας ή κιμάς) και τα προϊόντα του. Στην Ελλάδα η μέση κατανάλωση προϊόντων κιμά είναι ιδιαίτερα υψηλή αν αναλογιστούμε ότι η μέση ημερήσια κατανάλωση κόκκινου κρέατος (χοιρινού και βόειου) ανέρχεται στα 100 γραμμάρια (η υψηλότερη στη Ευρωπαϊκή Ένωση), σημαντικό ποσοστό της οποίας αντιστοιχεί σε προϊόντα κιμά (DAFNE, 2004).

Ο κιμάς είναι το πλέον ευπαθές τρόφιμο. Υπόκειται εξαιρετικά εύκολα σε επιμολύνσεις από τις οποίες, πρακτικά, είναι τελείως απροστάτευτος, επί πλέον δεν αποτελεί ένα θαναμάσιο υπόστρωμα για την ανάπτυξη όλων των βακτηρίων. Δεδομένου ότι η προσθήκη στον κιμά οποιασδήποτε ουσίας η οποία θα μπορούσε να παρεμποδίσει την ανάπτυξη μικροοργανισμών απαγορεύεται πλήρως, η μόνη προστασία που απομένει

είναι, εκτός από τις άψογες συνθήκες υγιεινής (αποφυγή αρχικής μόλυνσης κτλ), η ψύξη και η διάθεσή του σε σύντομο χρονικό διάστημα από τη παραγωγή του.

Ο έλεγχος της μικροβιολογικής ποιότητας του κιμά μπορεί να επιτευχθεί με τη μέτρηση της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας, της οποίας η τιμή αποτελεί ένα σημαντικό δείκτη της τήρησης των κανόνων υγιεινής κατά τη διαδικασία παρασκευής ενός τροφίμου. Αναγκαία όμως κρίνεται και η διερεύνηση ύπαρξης σημαντικών παθογόνων τα οποία δύνανται να αποτελέσουν πηγή κινδύνων για τον άνθρωπο κατά το χειρισμό ή την κατανάλωση ενός τροφίμου. Περίοπτη θέση σε αυτή τη λίστα κατέχουν είδη των γενών *Salmonella* και *Listeria*. Αποτελούν μικροοργανισμούς οι οποίοι εμπλέκονται σε ένα σημαντικό ποσοστό κρουσμάτων τροφολοιμώξεων με παγκόσμια κατανομή. Χαρακτηριστικό είναι ότι σε έρευνα στηριζόμενη στα στοιχεία ενός Δικτύου Ενεργητικής Επιτήρησης Τροφιμογενών Νοσημάτων (FoodNet) το οποίο έχει εγκατασταθεί στις ΗΠΑ, οι δύο αυτοί μικροοργανισμοί αποτελούν τα δύο σημαντικότερα αίτια θανάτων από τροφιμογενές νόσημα (υπεύθυνα για το 69% των θανάτων συνολικά) (Behravesk και συν.2011).

Οι σαλμονέλλες αποτελούν ένα από τα βασικότερα αίτια τροφιμογενών νοσημάτων παγκοσμίως. Τα κρούσματα σαλμονελλώσεων αποτελούν μία μεγάλη επιβάρυνση για τη Δημόσια Υγεία και ένα σημαντικό κόστος για πολλές χώρες. Εκατομμύρια περιστατικών αναφέρονται σε παγκόσμιο επίπεδο κάθε έτος και η ασθένεια προκαλεί χιλιάδες θανάτους. Μερικά χαρακτηριστικά στοιχεία που καταδεικνύουν το σημαντικό ρόλο της *Salmonella* στα τροφιμογενή νοσήματα:

- Στις ΗΠΑ υπολογίζεται ότι λαμβάνουν χώρα 1.300.000 κρούσματα σαλμονέλλωσης από τρόφιμα ετησίως, που οδηγούν σε 168.000 επισκέψεις σε ιατρό, 15.000 νοσοκομειακές περιθάλψεις και 580 θανάτους. Το κόστος ανέρχεται σε 3.000.000.000 δολάρια ετησίως (USDA, 2011).

- Στη Γαλλία και στο Ηνωμένο Βασίλειο υπολογίζεται ότι συμβαίνουν περίπου 300.000 κρούσματα σαλμονέλλωσης και 300 θάνατοι ετησίως. Στη Δανία το κόστος των κρουσμάτων ανέρχεται στα 15.000.000 δολάρια ετησίως (WHO, 2005).

- Οι ΗΠΑ καλούνται σχεδόν κάθε χρόνο να αντιμετωπίσουν εξάρσεις κρουσμάτων σαλμονέλλωσης (CDC, 2011).

Αντιθέτως, τα τροφιμογενή νοσήματα από *Listeria* spp. καταλαμβάνουν ένα μικρό ποσοστό όσον αφορά το σύνολο των περιστατικών που προκύπτουν από την κατανάλωση τροφίμων. Χαρακτηριστικό στατιστικό είναι το ποσοστό των διαγνωσμένων τροφοδηλητηριάσεων όπου ο αιτιολογικός παράγοντας ήταν είδη του γένους *Listeria* spp. Στις ΗΠΑ το 2001, ενώ τα περιστατικά των σαλμονελλώσεων ήταν 15,1 ανά 100.000 κατοίκους, του *Campylobacter* spp. 13,8 και της *Escherichia coli* O157:H7 ήταν 1,6 ανά 100.000, τα περιστατικά λιστερίωσης ήταν μόλις 0,3 ανά 100.000 κατοίκους. Στην Ευρώπη η συχνότητα νόσησης ποικίλλει από 0,2 έως 1,5 ανά 100.000 κατοίκους ενώ στην Ελλάδα ανέρχεται σε 0,03 ανά 100.000 πληθυσμού. Το 2006 στο ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ. δηλώθηκαν επτά μόνο κρούσματα λιστερίωσης. Η σοβαρότητα

όμως του νοσήματος έγκειται στο μεγάλο ποσοστό θνητότητας που παρατηρείται μεταξύ των νοσούντων.

Χαρακτηριστικό είναι ότι τα κρούσματα στις ΗΠΑ ανέρχονται περίπου στα 2.500 ετησίως, οι άνθρωποι όμως που τελικώς πεθαίνουν από λιστερίωση ανέρχονται στους 500, ένα ποσοστό θνητότητας της τάξεως του 20%, τη στιγμή που η θνητότητα στη πολύ πιο συχνή σαλμονέλλωση δεν ξεπερνά το 1% (CDC, www.cdc.gov, 2009).

Εκτός της σημαντικής θνητότητας, ιδιαίτερα επιβεβλημένη καθιστά την πρόληψη και την αντιμετώπιση των κρουσμάτων λιστερίωσης το γεγονός της μεγαλύτερης εμφάνισής της σε ευαίσθητες ομάδες, και ιδιαίτερα στις έγκυες γυναίκες. Η πιθανότητα να νοσήσουν αυτές σε σχέση με τους άλλους ενήλικες παρουσιάζεται να είναι 20 φορές μεγαλύτερη, ενώ ένα στα έξι περιστατικά λιστερίωσης αφορά γυναίκες σε εγκυμοσύνη (CDC, 2011).

Η παρούσα έρευνα έχει ως σκοπό τη διερεύνηση της μικροβιολογικής ποιότητας κιμάδων εμπορίου, με έμφαση στον έλεγχο της παρουσίας των παθογόνων μικροοργανισμών *Salmonella* spp. και *Listeria* spp., την πιθανή συσχέτιση των αποτελεσμάτων με χαρακτηριστικά των ειδών κιμά (είδος ζώου, προέλευση, συνθήκες συντήρησης) και των τηρούμενων κανόνων υγιεινής και η αναζήτηση των ιδιαίτερων απαιτήσεων που προκύπτουν όσον αφορά τις διατροφικές συνήθειες και πρακτικές συντήρησης των διαφόρων προϊόντων κιμά. Η έρευνα διενεργήθηκε στη πόλη της Λάρισας με τυχαία δειγματοληψία από καταστήματα λιανικής πώλησης κιμά (κρεοπωλεία και σούπερ μάρκετ).

**ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ – ΓΕΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ
ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ**

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Α΄

SALMONELLA SPP.

ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ ΕΜΦΑΝΙΣΗΣ *SALMONELLA SPP.*

Το γένος *Salmonella* οφείλει το όνομά του στον Αμερικανό κτηνίατρο Daniel Elmer Salmon ο οποίος, αναζητώντας τον αιτιολογικό παράγοντα της «χολέρας των χοίρων», νόσημα γνωστό σήμερα ως Classical Swine Fever (CSF), απομόνωσε το 1885, μαζί με τον Theobald Smith, έναν μικροοργανισμό από αρρώστους χοίρους τον οποίο και ονόμασαν «Hog cholera bacillus», που αργότερα μετονομάστηκε *Salmonella cholerae-suis*. Το οξύμωρο είναι ότι ο ισχυρισμός τους ήταν λανθασμένος, καθώς ο αιτιολογικός παράγοντας της CSF είναι ιός του γένους Pestivirus, εντούτοις όμως άνοιξαν το δρόμο για την ανακάλυψη των ειδών του γένους *Salmonella* η οποία ευθύνεται για πλήθος άλλων νοσημάτων.

Το γένος *Salmonella* θεωρείται ότι απασχόλησε την ανθρωπότητα ως παθογόνος παράγοντας ήδη από την αρχαιότητα. Μία ομάδα επιστημόνων στο πανεπιστήμιο του Μέριλαντ των Η.Π.Α. πρότεινε ότι η *Salmonella* αποτέλεσε τον αιτιολογικό παράγοντα του θανάτου του Μεγάλου Αλεξάνδρου το 323 π.Χ., βασίζοντας την υπόθεσή τους στην περιγραφή των συμπτωμάτων του στρατηλάτη από τον Έλληνα συγγραφέα Αριανό της Νικομήδειας (Oldach και συν., 1998). Ο πρίγκιπας Αλβέρτος, σύζυγος της βασίλισσας Βικτώριας πέθανε από σαλμονέλλωση το 1861. Στην Βικτωριανή περίοδο, θεωρείται ότι 50.000 κρούσματα σαλμονέλλωσης παρουσιάζονταν ετησίως στην Αγγλία.

Μεγάλες εξάρσεις κρουσμάτων για τις οποίες ενοχοποιείται το γένος *Salmonella* έλαβαν χώρα εδώ και εκατοντάδες χρόνια. Στην πόλη Jamestown της Βιρτζίνια των Η.Π.Α., η σαλμονέλλα θεωρείται υπεύθυνη για 6.000 θανάτους την περίοδο 1607-1624. Επιδημία σαλμονέλλωσης στον Αμερικανο-Ισπανικό πόλεμο (1898) θεωρείται υπεύθυνη για 1.590 θανάτους. Χαρακτηριστική δε είναι η περίπτωση του Νοτιοαφρικανικού πολέμου (1899-1902) όπου 13.000 Βρετανοί στρατιώτες πέθαναν λόγω τυφοειδούς πυρετού (υπεύθυνη η *Salmonella Typhi*), ενώ στο πεδίο των μαχών οι απώλειες περιορίστηκαν στις 8.000.

Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται μία αυξανόμενη έξαρση κρουσμάτων σαλμονέλλωσης η οποία συνδέεται με την κατανάλωση τροφίμων. Αν και κύρια πηγή μόλυνσης θεωρούνταν τα αυγά και τα κοτόπουλα, εντούτοις πλήθος τροφίμων συνδέθηκαν με κρούσματα της νόσου. Χαρακτηριστικές είναι οι ακόλουθες πρόσφατες εξάρσεις:

- Το 2005, μαλακό τυρί παραγόμενο από νωπό γάλα, αλλά και απαστερίωτος χυμός πορτοκαλιού θεωρήθηκαν υπεύθυνα τρόφιμα για κρούσματα σαλμονέλλωσης στις ΗΠΑ (Jain και συν., 2005).
- Το 2006 στις ΗΠΑ, η κατανάλωση ντομάτας σε εστιατόρια θεωρήθηκε υπεύθυνη για 183 περιστατικά σαλμονέλλωσης (CDC, 2006).
- Την ίδια χρονιά, η βρετανική εταιρία Cadbury Schweppes ανακάλεσε 1.000.000 τεμάχια σοκολάτας λόγω υποψίας πιθανής παρουσίας σαλμονέλλας.
- Το 2008 ένα ιδιαίτερα ανθεκτικό στα αντιβιοτικά στέλεχος *S.Typhimurium* θεωρήθηκε υπεύθυνο για πλήθος κρουσμάτων στην Ολλανδία, στην Ελβετία και στη Δανία. Κύριο υπεύθυνο τρόφιμο θεωρήθηκε το χοιρινό κρέας, και ιδιαίτερα ο παραγόμενος από αυτό κιμάς (Doorduyn και συν., 2008).

Επιδημίες αυτού του μεγέθους συνεπάγονται και ανάλογα μεγάλες αποσύρσεις τροφίμων, μεγάλο οικονομικό κόστος στις εταιρείες, αλλά και μεγάλη δυσφήμιση, την οποία δύσκολα αντιμετωπίζουν οι εταιρείες σε αρκετές περιπτώσεις.

Είναι χαρακτηριστικό ότι πρόσφατες μελέτες αποδεικνύουν μία σημαντική αύξηση κρουσμάτων σαλμονέλλωσης τα τελευταία χρόνια, γεγονός που δημιουργεί εύλογες ανησυχίες περί των αιτιών του φαινομένου, αλλά και απαιτεί τη περαιτέρω διερεύνησή του.

ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ *SALMONELLA* SPP.

Το γένος *Salmonella* ανήκει στην οικογένεια Enterobacteriaceae και περιλαμβάνει τουλάχιστον 2.541 οροτύπους οι οποίοι αναγνωρίζονται ορολογικά με βάση το σωματικό αντιγόνο O της εξωτερικής επιφάνειας του βακτηρίου, το βλεφαριδικό αντιγόνο H και το αντιγόνο ελύτρου Vi το οποίο συναντάται στους οροτύπους *S.Typhi*, *S.Paratyphi* και *S.Dublin*. Το γένος περιλαμβάνει δύο είδη, τη *S.enterica* και τη *S.bongori* (ένα τρίτο είδος έχει προταθεί, *S.subterranean*). Το είδος *S.enterica* διαχωρίζεται σε έξι υποείδη (τα οποία αναφέρονται και με τη χρήση Ρωμαϊκών αριθμών): *S.enterica* subsp. *enterica* (I), *S.enterica* subsp. *salamae* (II), *S.enterica* subsp. *arizonae* (IIIa), *S.enterica* subsp. *diarizonae* (IIIb), *S.enterica* subsp. *houtenae* (IV), *S.enterica* subsp. *indica* (VI).

Η πλειονότητα των οροτύπων που παρουσιάζουν ενδιαφέρον για τον άνθρωπο ανήκουν στο υποείδος *S.enterica* subsp. *enterica*, π.χ. η *S.enterica* subsp. *enterica* ser. *typhimurium* και η *S.enterica* subsp. *enterica* ser. *enteritidis* είναι οι ορότυποι που επί το πλείστον εμπλέκονται με ανθρώπινα περιστατικά γαστρεντερίτιδας. Χάριν συντομίας στη παρούσα εργασία κατά την αναφορά τους οι ορότυποι θα αναφέρονται με τη μορφή γένους και είδους με κεφαλαίο όμως το πρώτο τους γράμμα και χωρίς πλάγια γραφή (π.χ. ορότυποι *Salmonella* Typhimurium και *Salmonella* Enteritidis), όπως συμβαίνει στη πλειονότητα των επιστημονικών αναφορών (Brenner και συν., 2000). Ακολουθεί

πίνακας με τον αριθμό των οροτύπων όπως κατανέμονται στα διάφορα είδη και υποείδη του γένους *Salmonella*.

Πίνακας 1. Αριθμός οροτύπων *Salmonella* ανά είδος και υποείδος (Poroff και συν., 2001) .

<i>Salmonella</i> είδη και υποείδη	Αριθμός οροτύπων
<i>Salmonella enterica</i>	2519
<i>S.enterica</i> subsp. <i>enterica</i>	1504
<i>S.enterica</i> subsp. <i>salamae</i>	502
<i>S.enterica</i> subsp. <i>arizonae</i>	95
<i>S.enterica</i> subsp. <i>diarizonae</i>	333
<i>S.enterica</i> subsp. <i>houtenae</i>	72
<i>S.enterica</i> subsp. <i>indica</i>	13
<i>Salmonella bongori</i>	22
Σ Υ Ν Ο Λ Ο	2541

ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ *SALMONELLA* SPP.

Οι σαλμονέλλες είναι Gram αρνητικά, ραβδόμορφα, μη σπορογόνα, και προαιρετικά αναερόβια βακτήρια. Έχουν την μορφή ευθείων ραβδών διαστάσεων 0,7-1,5 X 2-5 μm. Η ιδανική θερμοκρασία ανάπτυξης είναι οι 37°C σε απλά θρεπτικά υποστρώματα, δημιουργώντας μικρές αποικίες διαμέτρου 2-4 mm. Οι σαλμονέλλες μπορούν να αναπτυχθούν σε ένα μεγάλο εύρος pH 4,5-9,5, σε θερμοκρασίες 2-54°C αλλά και σε συνθήκες ενεργού ύδατος (a_w) χαμηλές έως και 0,93. Συγκέντρωση άλατος (NaCl) μεγαλύτερη του 3-4% συνήθως αναστέλλει την ανάπτυξη του μικροοργανισμού, όμως η αύξηση της θερμοκρασίας ανάπτυξης προκαλεί και αύξηση της ανεκτικότητας σε άλας. Συγκέντρωση αλάτων όμως μεγαλύτερη του 8% είναι πάντα βακτηριοκτόνος για τις σαλμονέλλες (Jay και συν., 2005). Εκτός συγκεκριμένων οροτύπων (*Salmonella Gallinarum*, *Salmonella Pullorum*) οι σαλμονέλλες είναι κινητές φέροντας περίτριχες βλεφαρίδες και χάνουν την ικανότητα κίνησης μόνο σε δυνατές φυσικοχημικές στρεσογόνες επιδράσεις, όπως ψύξη ή υψηλές θερμοκρασίες.

ΒΙΟΧΗΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ *SALMONELLA* SPP.

Οι σαλμονέλλες καταβολίζουν τη γλυκόζη και άλλους υδατάνθρακες με ταυτόχρονη παραγωγή οξέος και αερίου. Είναι οξειδάση-αρνητικές και καταλάση-θετικές,

αναπτύσσονται σε παρουσία κιτρικού άλατος ως μόνη πηγή άνθρακα, παράγουν υδρόθειο, αποκαρβοξυλιώνουν τη λυσίνη και την ορνιθίνη, και δεν υδρολύουν την ουρία. Πολλές από αυτές τις ιδιότητες αποτελούν τη βάση της βιοχημικής αναγνώρισης των σαλμονελλών.

Πίνακας 2: Βιολογικοί χαρακτήρες *Salmonella* spp. (Quinn και συν., 1994).

Βιολογικοί χαρακτήρες	Αποτέλεσμα
Παραγωγή ινδόλης	-
Δοκιμασία ερυθρού του μεθυλίου	+
Δοκιμασία Voges-Proskauer	-
Ανάπτυξη παρουσία κιτρικών ως μόνη πηγή άνθρακα	+
Παραγωγή οξειδάσης	-
Παραγωγή καταλάσης	+
Παραγωγή ουρεάσης	-
Απαμίνωση φαινυλαανίνης	-
Παραγωγή υδρόθειου	+
Αποκαρβοξυλίωση λυσίνης	+
Αποκαρβοξυλίωση ορνιθίνης	+
Κινητικότητα (36°C)	+
Παραγωγή οξέος από διάσπαση λακτόζης	-
Παραγωγή οξέος από διάσπαση γλυκόζης	-

ΟΡΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ *SALMONELLA* SPP.

Οι σαλμονέλλες έχουν τρία βασικά αντιγόνα, το σωματικό αντιγόνο O, το οποίο αποτελεί το εξωτερικό τμήμα λιποπολυσακχαριδίων (LPS) της εξωτερικής μεμβράνης του βακτηρίου, το βλεφαριδικό αντιγόνο H, και το αντιγόνο ελύτρου Vi το οποίο συναντάται στους οροτύπους *S.Typhi*, *S.Paratyphi* και *S.Dublin*.

Η αντιγονική ειδικότητα καθορίζεται από τη σύνθεση του αντιγόνου O. Το αντιγόνο O είναι ένα πολυμερές υποομάδων (subunits) οι οποίες αποτελούνται από 4-6 σάκχαρα. Η ποικιλομορφία του αντιγόνου O οφείλεται στις παραλλαγές των σακχάρων των υποομάδων, των δεσμών μεταξύ των σακχάρων αλλά και των δεσμών μεταξύ των ίδιων των υποομάδων. Διάφορες μεταλλάξεις οι οποίες επιδρούν στα λιποπολυσακχαρίδια μπορεί να οδηγήσουν σε εμφάνιση νέων O αντιγόνων. Τα αντιγόνα O ορίζονται με

αριθμούς και όλοι οι ορότυποι του γένους *Salmonella* διαχωρίζονται σε αντιγονικές ομάδες (serogroups) με βάση τα αντιγόνα O που φέρουν και εκφράζονται στην επιφάνειά τους (ένα ή και περισσότερα). Για την ονομασία της αντιγονικής ομάδας χρησιμοποιείται συνήθως ο αριθμός του βασικού αντιγόνου O που φέρουν τα μέλη της ομάδας, ενώ για αρκετές από αυτές μπορεί να χρησιμοποιηθεί και παλαιότερη ονομασία που έφερε γράμμα, π.χ. η αντιγονική ομάδα 4 είναι η παλαιότερη B, η 9 είναι η παλαιότερη D1 κτλ. Σε πολλούς οροτύπους σαλμονέλλας τα βλεφαριδικά αντιγόνα H μπορεί να εναλλάσσονται μεταξύ δύο τύπων (Φάση 1-κινητή και Φάση 2-μη κινητή), δημιουργώντας εναλλακτικούς τύπους έκφρασης του βλεφαριδικού αντιγόνου.

Με βάση τα παραπάνω η ονοματολογία των σαλμονελλών με βάση την αντιγονική τους σύσταση μπορεί να ακολουθήσει την εξής μορφή:

Υποείδος [κενό] Αντιγόνα O [:] Αντιγόνο H Φάσης 1 [:] Αντιγόνο H Φάσης 2

Π.χ. I 4,5,12:i:1,2 (*S. enterica* ser. Typhimurium ή *Salmonella* Typhimurium)

Αναφέρονται μερικά παραδείγματα της ορολογικής σύστασης συχνών οροτύπων σαλμονελλών.

Πίνακας 3. Παραδείγματα οροτύπων *Salmonella* spp.

Ορότυπος	Αντιγονική Ομάδα (Παλαιότερη Ονομασία)	Σωματικά Αντιγόνα (O)	Βλεφαριδικά Αντιγόνα (H)	
			Φάση 1	Φάση 2
S. Paratyphi	2 (A)	<u>1</u> ,2,12	a	(1,5)
S. Typhimurium	4 (B)	<u>1</u> ,4,5,12	i	1,2
S. Typhi	9 (D1)	9,12, (Vi)	c	1,2
S. Enteritidis	9 (D1)	<u>1</u> ,9,12	g,m	(1,7)
S. Gallinarum	9 (D1)	<u>1</u> ,9,12	-	-

ΑΝΟΣΟΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ *SALMONELLA* SPP.

Η μόλυνση με σαλμονέλλα συνήθως λαμβάνει χώρα με τη κατανάλωση μολυσμένης τροφής και νερού. Συνθήκες που ελαττώνουν το HCl του στομάχου και αυξάνουν το

γαστρικό pH μειώνουν τη μολύνουσα δόση, αποδεικνύοντας ότι η γαστρική οξύτητα αποτελεί τον σημαντικό αρχικό φραγμό προστασίας από λοίμωξη. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον είναι ότι σαλμονέλλες επιδεικνύουν μία προσαρμοστικότητα σε όξινο περιβάλλον, επιτρέποντας πιθανώς την επιβίωση κάποιων εξ αυτών στο περιβάλλον του στομάχου (Garcia-del Portillo και συν., 1993). Μετά την είσοδο στο λεπτό έντερο, οι σαλμονέλλες πρέπει να διασχίσουν ένα στρώμα εντερικής βλέννας πριν φτάσουν στα κύτταρα του εντερικού επιθηλίου. Οι σαλμονέλλες εκφράζουν πολλές περίτριχες βλεφαρίδες που συμβάλλουν στην ικανότητά τους να προσκολληθούν στα επιθηλιακά κύτταρα.

Μικροσκοπικές μελέτες απέδειξαν ότι οι σαλμονέλλες εισβάλλουν στα επιθηλιακά κύτταρα με έναν ειδικό μηχανισμό ενδοκύτωσης (Francis και συν., 1992). Σύντομα μετά τη προσκόλλησή τους στα επιθηλιακά κύτταρα, πραγματοποιούνται σημαντικές κυτοσκελετικές αλλαγές στο κύτταρο-ξενιστή, διαταράσσοντας την φυσιολογική επιθηλιακή δομή και προκαλώντας τον σχηματισμό μεμβρανικών «πτυχών» οι οποίες και εγκλείουν τα βακτήρια σε μεγάλα κυστίδια. Για την επίτευξη αυτού του μηχανισμού ενδοκύτωσης απαιτείται η συντονισμένη σύνθεση πολλαπλών βακτηριακών πρωτεϊνών και είναι μορφολογικά και λειτουργικά διαφορετικός από τον κλασικό μηχανισμό ενδοκύτωσης άλλων παθογόνων (Galan και συν., 1996).

Σε ποντίκια οι σαλμονέλλες φαίνεται να προτιμούν την προσκόλλησή τους και την είσοδο τους στα Μ κύτταρα, ειδικευμένα επιθηλιακά κύτταρα τα οποία προσλαμβάνουν εντερικά αντιγόνα μέσω πινοκύτωσης και τα μεταφέρουν σε λεμφοκύτταρα στις πλάκες του Peyer (Brandtzaeg και συν., 1989). Αντιθέτως στο εντερικό επιθήλιο των βοοειδών, οι σαλμονέλλες δεν φαίνεται να προτιμούν την αλληλεπίδραση με τα Μ κύτταρα, και επομένως απαιτείται ειδική μελέτη περί της εισβολής των σαλμονελλών στο εντερικό επιθήλιο σε κάθε ζωικό οργανισμό χωριστά. Πρόσφατες μελέτες αποδεικνύουν ότι σαλμονέλλες μπορούν επίσης να διαπεράσουν το εντερικό επιθήλιο με φαγοκύτωση σε μεταναστευτικά CD18-θετικά φαγοκύτταρα (Vazquez-Torres και συν., 1999).

Επιπρόσθετα της εισβολής στο εντερικό επιθήλιο, οι ορότυποι της σαλμονέλλας που σχετίζονται με συμπτώματα εντερίτιδας επιφέρουν μία εκκριτική ανταπόκριση στο εντερικό επιθήλιο και ξεκινούν την μετανάστευση ουδετερόφιλων στον εντερικό αυλό (Galyon και συν., 1997). Η προσέλκυση ουδετερόφιλων, στην επιφάνεια του επιθηλίου απαιτεί την πρωτεϊνοσύνθεση βακτηρίων και επιθηλιακών κυττάρων και σχετίζεται με τη παραγωγή διαφόρων κυτοκινών. Ειδικότερα, η παραγωγή ιντερλευκίνης-8 από τα επιθηλιακά κύτταρα είναι ιδιαίτερα σημαντική για την προσέλκυση ουδετερόφιλων από τον υποβλεννογόνιο χώρο.

Μετά το πέρασμα των σαλμονελλών από το εντερικό επιθήλιο, αυτές καλούνται να αντιμετωπίσουν άλλη μία άμυνα ανοσίας, τα υποβλεννογόνια μακροφάγα. Οι ορότυποι των σαλμονελλών οι οποίοι προκαλούν συστηματική λοίμωξη, εισέρχονται στα μακροφάγα και ενεργοποιούν μηχανισμούς τοξικότητας οι οποίοι επιτρέπουν την αποφυγή των μικροβιοκτόνων μηχανισμών των φαγοκυττάρων, επιτρέποντας την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό τους σε ενδοκυττάριο περιβάλλον (Alpuche-Aranda και συν., 1994). Η μετανάστευση των μολυσμένων φαγοκυττάρων σε άλλα όργανα του

δικτυοενδοθηλιακού συστήματος προφανώς συμβάλλει στη διασπορά του μικροοργανισμού εντός του ξενιστή.

ΣΑΛΜΟΝΕΛΛΩΣΗ ΣΕ ΖΩΑ ΚΑΙ ΑΝΘΡΩΠΟ

Οι σαλμονέλλες, πλην της *S.Typhi* και των *S.Paratyphi A, B, και C*, είναι υπεύθυνες για πρόκληση εντεροκολίτιδας ή γαστρεντερίτιδας στον άνθρωπο αλλά και στα ζώα. Το μεγαλύτερο ποσοστό των περιστατικών γαστρεντερίτιδας από σαλμονέλλα παγκοσμίως οφείλεται στους οροτύπους *S.Enteritidis* και *S.Typhimurium*, με τη δεύτερη διαρκώς αυξανόμενη. Ο χρόνος επώασης είναι συνήθως 12-36 ώρες, με τα συμπτώματα να διαρκούν δύο έως επτά ημέρες και να περιλαμβάνουν εμετό, διάρροια, πυρετό, κοιλιακό άλγος, κεφαλαλγία. Η μολύνουσα δόση είναι πολύ μεγάλη, της τάξης του 10^3 με 10^6 cfu, με το μηχανισμό πρόκλησης της νόσου να μην είναι πλήρως γνωστός. Όπως προαναφέρθηκε, η είσοδος των σαλμονελλών στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου απελευθερώνει την ιντερλευκίνη-8 η οποία προσελκύει πολυμορφοπύρηνα ουδετερόφιλα. Η αποκοκκίωση αυτών και η απελευθέρωση τοξικών ουσιών μπορεί να προκαλέσει βλάβη στον εντερικό βλεννογόνο και τελικά τη φλεγμονώδη διάρροια.

Η *S.Typhi* προκαλεί τον τυφοειδή πυρετό. Ο χρόνος επώασης είναι από τρεις έως εξήντα ημέρες, με τη νόσο να διαρκεί τέσσερις έως οκτώ εβδομάδες και να χαρακτηρίζεται από πυρετό, διάρροια ή δυσκοιλιότητα, κοιλιακό άλγος, σπληνομεγαλία, εντερική αιμορραγία, διάτρηση του εντέρου. Η απαιτούμενη μολυσματική δόση είναι μικρή και το μικρόβιο αποβάλλεται από τα κόπρανα επί δύο εβδομάδες μετά τη μόλυνση. Η αποβολή συνεχίζεται μετά την ανάρρωση μέχρι έξι μήνες μετά τη μόλυνση. Από τους φορείς αυτούς προκαλούνται επιδημίες.

Οι *S.Paratyphi A, B, και C* προκαλούν τον παράτυφο ο οποίος προσομοιάζει με τον τυφοειδή πυρετό.

Μετά την εκδήλωση σαλμονελλώσεων τόσο στον άνθρωπο όσο και σε ζώα, πολλοί από τους πάσχοντες καθίστανται χρόνιοι υγιείς μικροβιοφορείς οι οποίοι και αποβάλλουν για μεγάλο χρονικό διάστημα τη σαλμονέλλα με τα κόπρανά τους. Χαρακτηριστικό είναι ότι το ποσοστό των κτηνοτροφικών εκμεταλλεύσεων που φέρουν ζώα-υγιείς φορείς σαλμονελλών ανέρχεται στο 28% για τις βοοτροφικές και στο 35% για τις χοιροτροφικές μονάδες (USDA, 1997; Futagawa-Saito και συν., 2008). Το γεγονός αυτό παίζει σημαντικότατο ρόλο στην μετάδοση της σαλμονέλλας μεταξύ των διαφόρων ειδών και τη μόλυνση του περιβάλλοντος, του νερού, αλλά και των παραγόμενων τροφίμων. Επίσης δικαιολογεί σε μεγάλο βαθμό την παγκόσμια εξάπλωση των σαλμονελλώσεων και τη δυσκολία που παρατηρείται στον έλεγχο αυτών, παρά την μεγάλη απαιτούμενη μολυσματική δόση για πρόκληση νόσου.

Οι περιπτώσεις σαλμονέλλωσης μπορούν να αντιμετωπιστούν με αμπικιλίνη, γενταμικίνη, σιπροφλοξασίνη και τριμεθοπρίμη/σουλφαμεθοξαζόλη.

ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ – ΣΙΤΙΟΓΕΝΕΙΣ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ

Η παρουσία σαλμονελλών στον άνθρωπο θεωρείται πάντοτε παθογόνος, και δεν μπορούν επ' ουδενί να θεωρηθούν μέλη της φυσιολογικής χλωρίδας του εντέρου. Κάποιες σαλμονέλλες απαντούν αποκλειστικά στον άνθρωπο, όπως οι *S.Typhi*, *S.Paratyphi A* και *S.Dublin*. Υπάρχουν και σαλμονέλλες που απαντούν αποκλειστικά σε ζώα, η συντριπτική όμως πλειοψηφία των σαλμονελλών δεν είναι απόλυτα προσαρμοσμένες σε συγκεκριμένο ξενιστή, απαντώντας σε πλήθος ζώων και στον άνθρωπο πχ. *S.Enteritidis*, *S.Typhimurium* κτλ. Επίσης πολλά είδη σαλμονελλών μέσω των κοπράνων μολύνουν το έδαφος, το νερό και τους βοσκοτόπους, με δυνατότητα επιβίωσης στο περιβάλλον συνήθως μέχρι και 20 ημέρες.

Η μετάδοση των σαλμονελλών γίνεται από τη πρωκτοστοματική οδό και οι λοιμώξεις που προκαλούνται στον άνθρωπο είναι αποτέλεσμα κατανάλωσης τροφίμων ή νερού μολυσμένου από κόπρανα ζώων ή ανθρώπου.

Οι πηγές μόλυνσης είναι:

- Νερό
- Γάλα και γαλακτοκομικά προϊόντα
- Οστρακοειδή
- Αυγά φρέσκα, σκόνη ή κατεψυγμένα
- Κρέας και προϊόντα κρέατος
- Κακάο και σοκολάτα
- Σαλάτες
- Κατοικίδια ζώα (σκύλοι, γάτες, χελώνες).

Οι οριακές συνθήκες ανάπτυξης της σαλμονέλλας είναι οι εξής:

- Ελάχιστη ενεργότητα ύδατος $a_w = 0,94$
- Ελάχιστο pH = 4,2 και μέγιστο pH = 9,5
- Μέγιστη συγκέντρωση άλατος (NaCl) = 6,5%

- Ελάχιστη Θερμοκρασία = 7°C και μέγιστη θερμοκρασία = 47°C.

Από τις οριακές συνθήκες ανάπτυξης είναι εύκολα κατανοητό ότι οι σαλμονέλλες είναι θερμοευαίσθητες, οπότε η κατάλληλη θερμική επεξεργασία μπορεί να τις εξουδετερώσει (Dvalue στους 70°C συνήθως γύρω στο 1 λεπτό), από την άλλη όμως η ψύξη δεν τις εξουδετερώνει, καθώς αργή ανάπτυξη παρατηρείται ακόμα και σε θερμοκρασία 5°C (Matches και Liston., 1968).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Β΄

LISTERIA SPP.

ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ ΕΜΦΑΝΙΣΗΣ *LISTERIA* SPP.

Το γένος *Listeria* ονομάστηκε έτσι προς τιμήν του Άγγλου χειρουργού Joseph Lister (1827-1912), πρωτοπόρου στην χειρουργική αντισηψία, χωρίς όμως να εμπλέκεται με την ανακάλυψή του. Η πρώτη απομόνωση και περιγραφή του μικροοργανισμού πραγματοποιήθηκε το 1924 από τον Murray και τους συνεργάτες του στο Πανεπιστήμιο του Cambridge, κατά τη διάρκεια μίας επιδημίας που έπληξε τα πειραματόζωα του εργαστηρίου (κουνέλια και ινδόχοιρους). Η πρώτη ονομασία η οποία δόθηκε ήταν *Bacterium monocytogenes*, καθώς τυπικό σύμπτωμα της νόσου που προκαλούσε ήταν η μονοκυττάρωση (αύξηση των μονοκυττάρων στο αίμα). Σχεδόν παράλληλα, το 1925, απομονώθηκε από τον Pirie στη Νότιο Αφρική ένας ανάλογος μικροοργανισμός από γερβίλλους και τον οποίο ονόμασε *Listerella hepatolytica*, καθώς προκαλούσε ηπατικές βλάβες σε πειραματόζωα.

Διαπιστώθηκε, λοιπόν, ότι *Bacterium monocytogenes* και *Listerella hepatolytica* είναι ο ίδιος οργανισμός και δόθηκε το όνομα *Listerella monocytogenes* το οποίο και χρησιμοποιήθηκε για τα επόμενα δώδεκα χρόνια. Το 1939 έγινε αντιληπτό ότι το όνομα *Listerella* είχε δοθεί ήδη από το 1906 από τον Jahn σε μία ομάδα μυξομυκήτων και έτσι μετά από πρόταση του Pirie το 1940 το όνομα άλλαξε σε *Listeria monocytogenes*.

Εντούτοις, το παλαιότερο γνωστό στέλεχος *L.monocytogenes* είχε απομονωθεί από τους Dumont και Cotoni το 1921, συντηρήθηκε στο Ινστιτούτο Pasteur και ταυτοποιήθηκε πλήρως το 1940 από τον Patterson.

Οι αναφορές σχετικά με κάποιον μικροοργανισμό, ο οποίος προκαλούσε νοσηρές καταστάσεις παρόμοιες με αυτές που αποδίδονται σήμερα στη *L.monocytogenes* παρατηρούνται από το 1891. Η πρώτη αναφορά παθογόνου δράσης λιστέριας στον άνθρωπο έγινε στη Δανία το 1929 από τον Nyfeldt, ο οποίος παρατήρησε συμπτώματα μονοκυττάρωσης σε 13 ασθενείς. Ο Burns από το 1935 ανέφερε τη λιστέρια ως αίτιο κοκκιωματώδους σηψαιμίας σε νεογνά και θανατηφόρου μηνιγγίτιδας σε ενήλικες. Εντούτοις ο μικροοργανισμός δεν ήταν ιδιαίτερα γνωστός στον ευρύτερο επιστημονικό κόσμο μέχρι το 1961 οπότε εκδόθηκε το σύγγραμμα «Listeriosis» από τον Seeliger (Seeliger, 1961).

Τα φώτα της δημοσιότητας όμως στράφηκαν κυριολεκτικά στα είδη του γένους *Listeria* στο τέλος της δεκαετίας του '70 όταν μία σειρά από τροφιμογενείς επιδημίες παρουσίασαν πολύ μεγαλύτερη θνητότητα από τη συνηθισμένη. Η πρώτη εξ αυτών στη Βοστώνη το 1979 χαρακτηρίστηκε από θνητότητα 15% σε 23 περιστατικά, με πιθανότερο αίτιο τη κατανάλωση μολυσμένων λαχανικών στο συσσίτιο νοσηλευόμενων.

Το 1981 στον Καναδά η κατανάλωση μολυσμένης λαχανοσαλάτας οδήγησε στο θάνατο 37 έμβρυα ή νεογέννητα και επτά ενήλικες, με τη θνητότητα στα έμβρυα να ανέρχεται στο 27%. Αίτιο θεωρήθηκε η λίπανση των λαχανικών με ανώριμη κοπριά προβάτων νοσούντων με λιστερίωση, και η επί μακρόν διατήρηση αυτών υπό ψύξη. Την ίδια χρονιά, σε νοσοκομείο του Ώκλαντ της Νέας Ζηλανδίας, σημειώθηκαν 22 περιστατικά περιγεννητικής λιστερίωσης και πέντε θάνατοι εμβρύων, με πιθανό αίτιο τη κατανάλωση μολυσμένων οστρακόδερμων και ωμών ψαριών από τις μητέρες. Το 1983 νέα επιδημία λιστερίωσης στη Μασαχουσέτη των ΗΠΑ χαρακτηρίστηκε από θνητότητα 29% (14 θάνατοι σε σύνολο 49 ασθενών) και αποδόθηκε στην κατανάλωση αγελαδινού γάλακτος.

Η πιο γνωστή όμως επιδημία παγκοσμίως έλαβε χώρα το 1985 στο Λος Άντζελες με 142 περιστατικά λιστερίωσης, 65% των οποίων ήταν έγκυες γυναίκες. Οι θάνατοι ανήλθαν στους 48 με το ποσοστό θνητότητας να αγγίζει το 34%. Το αίτιο ήταν ένα είδος μεξικανικού μαλακού τυριού του οποίου το pH ήταν 6,6 και στο οποίο υπήρξε ανάμιξη απαστερίωτου γάλακτος με το παστεριωμένο κατά την παρασκευή του, με είδη του γένους *Listeria* να πολλαπλασιάζονται κατά τη συντήρησή του.

Σε μαλακό τυρί, και συγκεκριμένα στο τυρί Vacherin Mont d'Or, οφείλεται επίσης η πρώτη μεγάλη επιδημία λιστερίωσης στην Ευρώπη, η οποία έλαβε χώρα στην Ελβετία την περίοδο 1983-1987 με 122 περιστατικά και 31 θανάτους. Οι μεγαλύτερες όμως Ευρωπαϊκές επιδημίες οφείλονταν σε παρασκευάσματα κρέατος. Πιο συγκεκριμένα, στο Ηνωμένο Βασίλειο το 1990 και στη Γαλλία το 1992 προκλήθηκαν γύρω στα 300 περιστατικά σε κάθε χώρα από μολυσμένα προϊόντα χοίρειου κρέατος και ειδικότερα από χοιρινό πατέ και χοιρινή γλώσσα αντίστοιχα.

Η διαρκής αύξηση κρουσμάτων επιδημίας λιστερίωσης οδήγησε την Ευρωπαϊκή Ένωση στη χρηματοδότηση ενός συστήματος επιτήρησης το οποίο και κατέγραψε συνολικά 19 επιδημίες λιστερίωσης στις χώρες της Ευρώπης τη δεκαετία 1992-2002 (Πίνακας 1).

Πίνακας 4. Επιδημίες Λιστερίωσης, περίοδος 1992-2002 (de Valk και συν., 2005).

ΕΤΟΣ	ΧΩΡΑ	ΑΡΙΘ ΜΟΣ ΚΡΟΥ ΣΜΑΤ ΩΝ	ΤΡΟΠΟΣ ΜΕΤΑΔΟΣΗΣ	ΕΝΟΧΟΠΟΙΗΜ ΕΝΟ ΤΡΟΦΙΜΟ	ΠΙΘΑΝΗ ΔΙΕΘΝΗΣ ΕΜΠΛΟΚΗ
1992	ΓΑΛΛΙΑ	279	ΤΡΟΦΙΜΟΓΕΝΗΣ	ΧΟΙΡΙΝΗ ΓΛΩΣΣΑ ΣΕ ΓΕΛΗ	ΕΞΑΓΩΓΙΜΟ ΠΡΟΙΟΝ
1992	ΙΣΠΑΝΙΑ	24	ΤΡΟΦΙΜΟΓΕΝΗΣ	ΑΓΝΩΣΤΟ	
1992	ΝΟΡΒΗΓΙΑ	6	ΤΡΟΦΙΜΟΓΕΝΗΣ	ΤΕΜΑΧΙΣΜΕΝΟ ΚΡΥΟ ΚΡΕΑΣ	
1993	ΓΑΛΛΙΑ	38	ΤΡΟΦΙΜΟΓΕΝΗΣ	ΧΟΙΡΙΝΟ ΚΡΕΑΣ	ΕΞΑΓΩΓΙΜΟ ΠΡΟΙΟΝ
1993	ΙΤΑΛΙΑ	18	ΤΡΟΦΙΜΟΓΕΝΗΣ	ΣΑΛΑΤΑ ΡΥΖΙΟΥ	

1994-95	ΣΟΥΗΔΙΑ	9	ΤΡΟΦΙΜΟΓΕΝΗΣ	ΠΕΣΤΡΟΦΑ	
1995	ΓΑΛΛΙΑ	36	ΤΡΟΦΙΜΟΓΕΝΗΣ	ΤΥΡΙ (ΝΩΠΙΟ ΑΓΕΛΑΔΙΝΟ ΓΑΛΛΑ)	
1995	ΙΣΛΑΝΔΙΑ	5	ΑΓΝΩΣΤΟ	ΑΓΝΩΣΤΟ	
1996	ΔΑΝΙΑ	3	ΑΓΝΩΣΤΟ	ΑΓΝΩΣΤΟ	
1997	ΓΑΛΛΙΑ	14	ΤΡΟΦΙΜΟΓΕΝΗΣ	ΤΥΡΙ (ΝΩΠΙΟ ΑΓΕΛΑΔΙΝΟ ΓΑΛΛΑ)	ΕΞΑΓΩΓΙΜΟ ΠΡΟΙΟΝ
1997	ΦΙΝΛΑΝΔΙΑ	5	ΤΡΟΦΙΜΟΓΕΝΗΣ	ΠΕΣΤΡΟΦΑ	
1997	ΙΤΑΛΙΑ	1566	ΤΡΟΦΙΜΟΓΕΝΗΣ	ΣΑΛΑΤΑ ΚΑΛΑΜΠΟΚΙΟΥ	
1998-99	ΦΙΝΛΑΝΔΙΑ	25	ΤΡΟΦΙΜΟΓΕΝΗΣ	ΒΟΥΤΥΡΟ	
1999	ΑΓΓΛΙΑ ΚΑΙ ΟΥΑΛΙΑ	2	ΤΡΟΦΙΜΟΓΕΝΗΣ	ΤΥΡΙ ΤΥΡΟΣΑΛΑΤΑ ΣΑΝΤΟΥΙΤΣ	
1999	ΓΑΛΛΙΑ	3	ΤΡΟΦΙΜΟΓΕΝΗΣ	ΤΥΡΙ	ΠΙΘΑΝΕΣ ΠΕΡΙΠΤΩΣΕΙΣ ΣΤΗ ΓΕΡΜΑΝΙΑ
1999	ΓΑΛΛΙΑ	10	ΤΡΟΦΙΜΟΓΕΝΗΣ	ΧΟΙΡΙΝΟ ΚΡΕΑΣ	ΕΞΑΓΩΓΙΜΟ ΠΡΟΙΟΝ
1999-00	ΦΙΝΛΑΝΔΙΑ	10	ΤΡΟΦΙΜΟΓΕΝΗΣ	ΠΡΟΙΟΝΤΑ ΙΧΘΥΩΝ ΣΥΣΚΕΥΑΣΜΕΝΩΝ ΥΠΟ ΚΕΝΟ	ΕΞΑΓΩΓΙΜΟ ΠΡΟΙΟΝ
2000	ΓΑΛΛΙΑ	32	ΤΡΟΦΙΜΟΓΕΝΗΣ	ΧΟΙΡΙΝΗ ΓΛΩΣΣΑ ΣΕ ΓΕΛΗ	ΕΞΑΓΩΓΙΜΟ ΠΡΟΙΟΝ
2000	ΠΟΡΤΟΓΑΛΙΑ	1	ΤΡΟΦΙΜΟΓΕΝΗΣ	ΤΥΡΙ	
2000	ΙΣΠΑΝΙΑ	15	ΤΡΟΦΙΜΟΓΕΝΗΣ	ΑΓΝΩΣΤΟ	
2001	ΒΕΛΓΙΟ	3	ΤΡΟΦΙΜΟΓΕΝΗΣ	ΠΑΓΩΤΟ	ΠΕΡΙΣΤΑΤΙΚΑ ΒΕΛΓΩΝ ΠΟΥ ΔΙΕΓΝΩΣΚΙΚΑ Ν ΣΤΗ ΓΑΛΛΙΑ
2002	ΓΑΛΛΙΑ	11	ΤΡΟΦΙΜΟΓΕΝΗΣ	ΩΜΟ ΛΟΥΚΑΝΙΚΟ	ΕΞΑΓΩΓΙΜΟ ΠΡΟΙΟΝ

Τα στοιχεία που συλλέχθηκαν αποδεικνύουν μία σταδιακή μείωση των περιστατικών λιστερίωσης, κάτι το οποίο αποδίδεται στην ευαισθητοποίηση και δραστηριοποίηση του καταναλωτικού κοινού, της βιομηχανίας τροφίμων και των επιστημόνων, όσον αφορά την πρόληψη των τροφιμογενών νοσημάτων, και ιδιαίτερα της λιστερίωσης.

Εντούτοις, και παρά τα όποια μέτρα λαμβάνονται, τα περιστατικά λιστερίωσης δεν έπαψαν να εμφανίζονται. Στον Καναδά το 2008 υπήρξε μία μεγάλη έξαρση κρουσμάτων λιστερίωσης από προϊόντα κρέατος συγκεκριμένης βιομηχανίας με 57 νοσούντες και 27

θανόντες. Το Μάιο του 2009 στη Δανία οκτώ άτομα νόσησαν μετά από την κατανάλωση γεύματος εταιρίας catering με υπεύθυνο τρόφιμο το μοσχαρίσιο κρέας και δύο εξ αυτών κατέληξαν. Από τον Ιούνιο του 2009 παρατηρήθηκαν 14 κρούσματα λιστερίωσης με τέσσερις νεκρούς σε Γερμανία και Αυστρία, με υπεύθυνο τρόφιμο ένα εμπορικό μαλακό τυρί. Η ανάγκη διαρκούς επαγρύπνησης των εμπλεκόμενων μπροστά σε αυτή τη συνεχιζόμενη δημοσιοϋγειονομική απειλή είναι δεδομένη και αδιαμφισβήτητη.

ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ *LISTERIA* SPP.

Το γένος *Listeria* κατατάσσεται στον υποκλάδο των Clostridium μαζί με τα γένη Staphylococcus, Streptococcus, Lactobacillus και Bronchotrix. Η φυλογενετική αυτή θέση είναι σύμφωνη με τη χαμηλή περιεκτικότητα του γενώματος των Λιστεριών σε Γουανίνη-Κυτοσίνη (36-42%) (Zunabovic και συν. 2011).

Το γένος *Listeria* περιλαμβάνει έξι είδη: *L.grayi*, *L.innocua*, *L.ivanovii*, *L.monocytogenes*, *L.seeligeri* και *L.welshimeri*. Η *L.ivanovii* περιλαμβάνει δύο υποείδη: *L.ivanovii* subsp. *ivanovii* και *L.ivanovii* subsp. *londoniensis*. Η *L.murrayi*, η οποία κάποτε θεωρούνταν διαφορετικό είδος στο γένος *Listeria*, συμπεριλαμβάνεται πλέον στο είδος *L.grayi*.

Με βάση την ομολογία DNA/DNA και την αλληλουχία του 16S rRNA το γένος *Listeria* χωρίζεται σε δύο ομάδες: Η μία ομάδα αποτελείται από τη *L.monocytogenes* και τα κοντινά σε αυτή είδη *L.innocua*, *L.ivanovii*, *L.seeligeri* και *L.welshimeri*. Η δεύτερη ομάδα αποτελείται από το είδος *L.grayi*. Όλα τα είδη είναι ευρέως διαδεδομένα στη φύση, αλλά μόνο η *L.monocytogenes* θεωρείται σοβαρό ανθρώπινο και ζωικό παθογόνο. Έχουν αναφερθεί όμως σπανίως και περιπτώσεις νόσησης ανθρώπων από *L.seeligeri* και *L.ivanovii*. Εξάλλου, η *L.ivanovii* θεωρείται και αίτιο αποβολών σε πρόβατα.

ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ *LISTERIA* SPP.

Η λιστέρια είναι βακτήριο μήκους 0,5-2 μm και διαμέτρου 0,4-0,5 μm, με στρογγυλεμένα άκρα. Είναι Gram θετικό, αερόβιο ή μικροαερόφιλο, ασπορογόνο κοκκοειδές βακτήριο, το οποίο παράγει καταλάση αλλά όχι οξειδάση. Με το μικροσκόπιο οι λιστέριες συνήθως εμφανίζονται μονήρεις, είναι όμως δυνατόν να διαταχθούν σε μικρές αλυσίδες σχήματος V ή Y ή παράλληλες. Όταν όμως το παρασκεύασμα γίνεται από παλιές ή ρυτιδωμένες αποικίες, οι λιστέριες μπορεί να πάρουν τη μορφή νηματίων μήκους 6-20 μm και εμφανίζονται ως Gram αρνητικά βακτήρια, αδυνατώντας να συγκρατήσουν τη χρωστική του ιώδους της γεντιανής.

Η λιστέρια φέρει περίτριχες βλεφαρίδες στις οποίες οφείλεται η χαρακτηριστική κίνησή της. Η κίνηση είναι περιστροφική και τρομώδης (tumbling) στην αρχή, και κατόπιν προς μία κατεύθυνση, με μεσοδιαστήματα σχετικής ακινησίας. Η κινητικότητα της εκφράζεται καλύτερα σε θερμοκρασίες 20-25°C, όμως σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 37°C μειώνεται σημαντικά λόγω μειωμένης παραγωγής βλεφαρίδων, κάτι που φαίνεται ιδιαίτερα στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο με τον ιδιαίτερα μικρό αριθμό βλεφαρίδων. Η κίνηση αυτή μπορεί εύκολα να επιβεβαιωθεί ενοφθαλμίζοντας την λιστέρια σε σωληνάριο με κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα. Ανάπτυξη κατά μήκος της γραμμής ενοφθαλμισμού, η οποία εξαπλώνεται σε απόσταση 3-5 mm κάτω από την επιφάνεια του υλικού σε σχήμα ομπρέλας, είναι χαρακτηριστική των Λιστεριών.

Η λιστέρια πολλαπλασιάζεται σε ένα μεγάλο εύρος θερμοκρασιών (1-45°C), με άριστη ανάπτυξη στους 30-37°C. Δεν μπορεί όμως να επιζήσει μετά από θέρμανση σε 60°C για 30 λεπτά. Μπορεί να αναπτυχθεί σε τιμές pH από 5,6 έως 9,5, με άριστη ανάπτυξη σε ουδέτερο-ελαφρώς αλκαλικό περιβάλλον. Όλα τα στελέχη αναπτύσσονται σε συγκεντρώσεις NaCl έως 10%, ενώ ορισμένα μπορούν να επιβιώσουν σε συγκεντρώσεις μέχρι και 20%.

Όπως προαναφέρθηκε, το γένος *Listeria* ανήκει στα βακτηρίδια με μικρό αριθμό βάσεων G+C (36-42%) στο DNA του, με το συνολικό μήκος του DNA της *L.monocytogenes* (ορότυπος 1/2c) να είναι 3150 kb (Michel και Cossart, 1992). Εξωχρωμοσωμικό DNA βρέθηκε στο 28% των στελεχών της *L.monocytogenes* (Lebrun και συν., 1992), με τη πλειονότητα να αφορά τους οροτύπους 1 (35%) και 4 (15%). Παρατηρήθηκαν συχνότερα σε στελέχη προερχόμενα από τρόφιμα και περιβάλλον από ότι σε κλινικά στελέχη. Η δράση τους φαίνεται να συνδέεται με αντοχή στο κάδμιο, αντοχή σε αντιβιοτικά ή να είναι κρυπτικά. Το 1990 απομονώθηκε το πρώτο στέλεχος *L.monocytogenes* το οποίο περιείχε πλασμίδιο με 37 kb και έφερε γονίδια για αντοχή στη χλωραμφαινικόλη, ερυθρομυκίνη, στρεπτομυκίνη και τετρακυκλίνη, το οποίο είχε την ικανότητα να αυτομεταβιβάζεται σε άλλα στελέχη της *L.monocytogenes* (Royart-Salmeron και συν., 1990). Στην Ελλάδα παρόμοιο πολυανθεκτικό στέλεχος λιστέριας με πλασμίδιο παρόμοιου μεγέθους εμφανίστηκε το 1995 (Παπά και συν., 1996).

Το κυτταρικό τοίχωμα της λιστέριας μελετήθηκε εδώ και δεκαετίες (Fielder και Ruhland, 1987). Αποτελείται από πεπτιδογλυκάνη και από τειχοϊκά οξέα που είναι πολυμερή και συνδέονται σε ειδική θέση της πεπτιδογλυκάνης. Συνήθως συντίθενται από ροβιτόλη, ουδέτερα σάκχαρα, N-ακετυλοαμινοσάκχαρα και φώσφορο. Ένα τμήμα των αλύσεων των τειχοϊκών οξέων είναι ενσφηνωμένο στη στιβάδα της πεπτιδογλυκάνης ενώ το υπόλοιπο είναι εκτεθειμένο στην εξωτερική επιφάνεια του κυττάρου. Το κυτταρικό τοίχωμα επίσης περιέχει λιποτειχοϊκά οξέα των οποίων το ένα άκρο είναι συνδεδεμένο με την κυτταρική μεμβράνη. Αυτά τα μόρια προσομοιάζουν με τους πολυσακχαρίτες των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων, τόσο σε δομή όσο και σε λειτουργία (αναγνωρίζονται ως σωματικά αντιγόνα) και είναι τα μόνα πολυμερή με υδρόφοβες και υδρόφιλες περιοχές συγχρόνως. Στην επιφάνεια των κυττάρων της λιστέριας υπάρχουν επίσης και διάφορες άλλες πρωτεΐνες που επηρεάζονται σε μεγάλο βαθμό από τις συνθήκες ανάπτυξης. Το κυτταρικό τοίχωμα της λιστέριας έχει μικρή

σχετικά αντίσταση σε μηχανικούς παράγοντες. Η ανακίνηση π.χ. για χρόνο μεγαλύτερο των τεσσάρων ωρών με γυάλινα σφαιρίδια, επιφέρει σοβαρές βλάβες στο κυτταρικό τοίχωμα.

ΒΙΟΧΗΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ *LISTERIA* SPP.

Τα είδη του γένους *Listeria* παρουσιάζουν πλήθος παρόμοιων βιοχημικών ιδιοτήτων. Δίνουν θετικές τις δοκιμασίες του ερυθρού του μεθυλίου και Voques-Proskauer, αδυνατούν να υδρολύσουν την ζελατίνη και δεν παράγουν ινδόλη ή ουρεάση. Αντιθέτως υδρολύουν το ιππουρικό νάτριο, την εσκουλίνη, ανάγουν το κυανό του μεθυλενίου και παράγουν καταλάση, β-D-γαλακτοσιδάση και αλκαλική φωσφατάση. Επίσης οι λιστέρειες παράγουν οξύ χωρίς ταυτόχρονη παραγωγή αερίου, από μία μεγάλη ποικιλία σακχάρων (γλυκόζη, φρουκτόζη, μαννόζη, κτλ.). Κατά κύριο λόγο, βέβαια, η παραγωγή οξέος πραγματοποιείται από τη γλυκόζη, αερόβια και αναερόβια, με τη μεταβολική οδό των Embber-Meyerhof. Τελικά προϊόντα είναι το γαλακτικό οξύ (αναερόβια) και το πυροσταφυλικό οξύ, η ακετοΐνη κτλ. (αερόβια). Η παραγωγή αυτή οξέος γίνεται εντός 48 ωρών. Ο Πίνακας 2 περιλαμβάνει το πλήθος των παρόμοιων βιοχημικών ιδιοτήτων του γένους *Listeria* spp.

Πίνακας 5. Βιοχημικά χαρακτηριστικά παρόμοια σε όλο το γένος *Listeria* spp. (Seeliger και Jones, 1986).

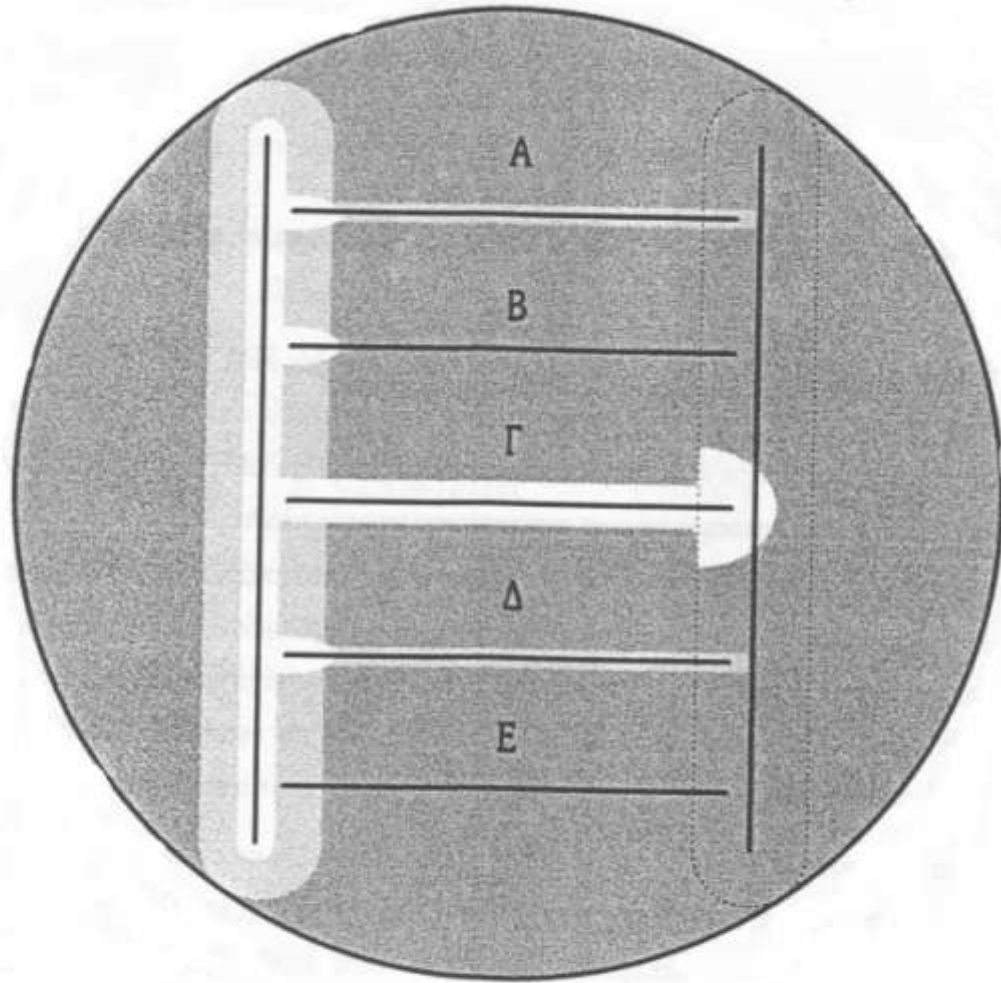
Βιοχημικές Ιδιότητες	<i>Listeria</i> spp.
Παραγωγή καταλάσης	+
Παραγωγή οξειδάσης	-
Παραγωγή β-D-γαλακτοσιδάσης	+
Δοκιμασία ερυθρού του μεθυλίου	+
Παραγωγή ακετυλομεθυλοκαρβινόλης	+
Παραγωγή ινδόλης	-
Παραγωγή υδρόθειου	-
Χρησιμοποίηση εξωγενούς αζώτου	-
Αναγωγή νιτρικών σε νιτρώδη	-
Υδρόλυση καζεΐνης	-
Υδρόλυση κυτταρίνης	-
Υδρόλυση τυροσίνης	-
Υδρόλυση ξανθίνης	-
Υδρόλυση ζελατίνης	-
Υδρόλυση ουρίας	-
Υδρόλυση ιππουρικού νατρίου	+
Υδρόλυση εσκουλίνης	+

Υπάρχει όμως και μία σειρά βιοχημικών ιδιοτήτων οι οποίες μπορούν να επιτρέψουν τη διαφοροποίηση των ειδών του γένους *Listeria*. Σημαντικότερη εξ αυτών αποτελεί η αιμολυτική ικανότητα. Όταν τα είδη του γένους *Listeria* αναπτύσσονται σε αιματούχο θρεπτικό υπόστρωμα (αίμα προβάτου, αλόγου, κουνελιού κτλ.) παράγουν ή δεν παράγουν ζώνες β-αιμόλυσης διάφορης έκτασης. Η *L.ivanovii* παράγει ευρύτατες, σαφώς οριζόμενες ζώνες αιμόλυσης, εν αντιθέσει με τη *L.monocytogenes* και τη *L.seeligeri* που προκαλούν ελαφρά αιμόλυση, καλυπτόμενη από την υπερκείμενη ανάπτυξη του βακτηρίου. Τα υπόλοιπα είδη *Listeria* δεν παρουσιάζουν καμία αιμόλυση.

Σημαντική τεχνική για τη διαφοροποίηση των ειδών *Listeria* με βάση την αιμολυτική ικανότητα αποτελεί η δοκιμή CAMP. Η δοκιμή εκτελείται σε αιματούχο άγαρ το οποίο περιέχει 5% v/v απινιδωμένο αίμα προβάτου, αλόγου, κόνικλου ή ανθρώπου. Στη δοκιμή χρησιμοποιούνται στελέχη *Staphylococcus aureus* και *Rhodococcus equi*. Η διάταξη φαίνεται στο παρακάτω σχήμα.

Staphylococcus aureus

Rhodococcus equi



Οι λευκές περιοχές υποδηλώνουν β-αιμόλυση

- A: *L. monocytogenes*, τυπική αιμόλυση
- B: *L. monocytogenes*, μη τυπική αιμόλυση
- Γ: *L. ivanovii*
- Δ: *L. seeligeri*
- E: *L. innocua*

Διάγραμμα Α. Δοκιμή CAMP (Prentice και Neaves, 1992).

Οι γραμμές ενοφθαλμισμού δεν πρέπει να εφάπτονται, αλλά να απέχουν λίγα mm. Απαραίτητο είναι επίσης να χρησιμοποιούνται στελέχη μάρτυρες. Ύστερα από επώαση 12-18 ωρών σε θερμοκρασία 37°C, τα στελέχη της *L. monocytogenes* και της *L. seeligeri* προκαλούν λεπτή ζώνη αιμόλυσης, διευρυνόμενη μέσα στην περιοχή διάχυσης της β-τοξίνης, η οποία παράγεται από τον *S. aureus*, ενώ εκείνα της *L. ivanovii* παρουσιάζουν ευρύτερη ζώνη αιμόλυσης, διευρυνόμενη έντονα (σε σχήμα μύκητα) κοντά στη γραμμή ανάπτυξης του *R. equi* (Seeliger και Jones, 1986).

Στον Πίνακα 6 περιλαμβάνονται βιοχημικά χαρακτηριστικά που χρησιμοποιούνται για τη διαφοροποίηση των ειδών του γένους *Listeria*.

Πίνακας 6. Βιοχημικά χαρακτηριστικά διαφοροποίησης των ειδών του γένους *Listeria* spp. (Seeliger και Jones, 1986).

	<i>L.monocytogenes</i>	<i>L.innocua</i>	<i>L.ivanovii</i>	<i>L.seeligeri</i>	<i>L.welshimeri</i>	<i>L.grayi grayi</i>	<i>L.grayi murrayi</i>
D-ξυλόζη	-	-	+	+	+	-	-
L-ραμνόζη	+	V	-	-	V	-	V
Μαννιτόλη	-	-	-	-	-	+	+
α-Μεθυλο-D-μαννοσίδη	+	+	-	-	+	?	?
β-Αιμόλυση	+ (1)	-	+ (2)	+	-	-	-
<i>S.aureus</i> (CAMP)	+	-	-	+	-	-	-
<i>R. equi</i> (CAMP)	-	-	+	-	-	-	-

(1): Μερικά στελέχη χωρίς αιμόλυση

(2): Ευρεία ή πολλαπλές ζώνες αιμόλυσης

V: *Varies* (ποικίλλει)

?: Δεν έχει καθορισθεί.

ΟΡΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ *LISTERIA* SPP.

Η αντιγονική σύσταση των ειδών του γένους *Listeria* απεικονίζεται στον Πίνακα 4 όπως καθιερώθηκε από τον Seeliger, επιτρέποντας τον διαχωρισμό των Λιστεριών σε οροτύπους. Όπως εύκολα μπορεί να παρατηρηθεί, πολλά από τα 15 σωματικά (O) και 5 βλεφαριδικά (H) αντιγόνα των Λιστεριών είναι κοινά στα είδη *L.monocytogenes*, *L.innocua*, *L.ivanovii*, *L.seeligeri* και *L.welshimeri*. Από αυτά μόνο το είδος *L.ivanovii* είναι δυνατόν να ταυτοποιηθεί με ασφάλεια με βάση τα σωματικά αντιγόνα ενώ με βάση τα βλεφαριδικά μόνο το είδος *L.grayi*. Η ορολογική βέβαια ταυτοποίηση των Λιστεριών δεν φαίνεται να έχει ιδιαίτερη αξία στη πλειονότητα των περιπτώσεων, καθώς το 90% των στελεχών τα οποία και απομονώνονται ανήκουν σε τρεις από τους 13 γνωστούς οροτύπους (1/2a, 1/2b και 4b) (Tarrero και συν., 1995). Αξίζει να σημειωθεί ότι η *L.monocytogenes* δεν μπορεί να διακριθεί ορολογικώς από τη *L.seeligeri*. Η μοριακή ταυτοποίηση των στελεχών της *L.monocytogenes* έχει επιτρέψει τον διαχωρισμό τους σε τρεις φυλογενετικές ομάδες. Η ομάδα I αποτελείται από τους οροτύπους 1/2b, 3b, 4b, 4d και 4e, η Ομάδα II αποτελείται από τους οροτύπους 1/2a, 1/2c, 3a, και 3c, και η Ομάδα III αποτελείται από τους λιγότερο συχνούς οροτύπους 4a και 4c.

Πέραν της χρήσης πολυδύναμων αντιορών (Difco) για την ορολογική ταυτοποίηση της *L.monocytogenes*, έχουν αναπτυχθεί διάφορες τεχνικές οι οποίες επιδιώκουν να αυξήσουν την ταχύτητα και την ευαισθησία της ορολογικής ταυτοποίησης αλλά και την επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων. Τέτοιες τεχνικές είναι η PFGE, αλλά και η χρήση μικροσυστοιχιών (microarrays) για τη γενωμική ανάλυση των απομονωθέντων στελεχών (Borucki και συν., 2003).

Πίνακας 7. Ορότυποι του γένους *Listeria* spp.

<i>Listeria</i> spp.	Ορότυπος	Σωματική Αντιγονική Δομή (O)										Βλεφαριδική Αντιγονική Δομή (H)					
		I	II	III*									A	B			
<i>L.monocytogenes</i>	1/2a	I	II	III*									A	B			
	1/2b	I	II	III*									A	B	C		
	1/2c	I	II	III*										B		D	
	3a		II	III*	I V								A	B			
	3b		II	III*	I V					XII*	XIII*		A	B	C		
	3c		II	III*	I V					XII*	XIII*			B		D	
	4a			III*		V*		VII		IX			A	B	C		
	4ab			III*		V	VI	VII		IX	X		A	B	C		
	4b			III*		V	VI						A	B	C		
	4c			III*		V		VII					A	B	C		
	4d			III*		V*	VI		VIII				A	B	C		
	4e			III*		V	VI		VIII*	IX*			A	B	C		
7			III*						XII	XIII		A	B	C			
<i>L.ivanovii</i>	5			III*		V*	VI		VIII*	X		A	B	C			
<i>L.innocua</i>	6a			III*		V	VI*	VII*	IX	X	XV	A	B	C			
	6b			III*		V*	VI*	VII*	IX	XIV	XI	A	B	C			
<i>L.grayi</i>				III*					XII	XIV						E	

*: Δεν είναι πάντοτε παρόν.

ΑΝΟΣΟΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ *LISTERIA* SPP.

Αν και η *L.monocytogenes* είναι η μοναδική του γένους που θεωρείται παθογόνος για τον άνθρωπο, εντούτοις έχουν αναφερθεί περιστατικά λιστερίωσης από *L.ivanovii* με πιο πρόσφατη την αναφορά γαστρεντερίτιδας και βακτηριαιμίας σε άνθρωπο στη Γαλλία (Guillet και συν., 2010). Όλα όμως τα στελέχη της *L.monocytogenes* είναι αυτά τα οποία θεωρούνται παθογόνα, παρά τις όποιες ποσοτικές διαφορές μπορούν να υπάρξουν όσον αφορά τη παθογονικότητά τους.

Αν και τα είδη του γένους *Listeria* υπάρχουν σε σημαντικό βαθμό στο περιβάλλον, ο άνθρωπος σπάνια υφίσταται λοίμωξη. Ιδιαίτερα σημαντικός τα τελευταία χρόνια φαίνεται να είναι ο ρόλος των τροφίμων σε επιδημίες λιστερίωσης, όπου ο βασικός μηχανισμός περιλαμβάνει την είσοδο της λιστέριας μέσω του γαστρεντερικού σωλήνα στην αιματική κυκλοφορία. Οι πλάκες του Peyer αποτελούν την κύρια πύλη εισόδου στα κύτταρα του εντέρου. Η λιστέρια τελικώς πολλαπλασιάζεται εντός των ηπατικών κυττάρων και για να απελευθερωθεί με τη λύση τους στην αιματική κυκλοφορία. Οι ιστοί στόχος είναι το ΚΝΣ και ο πλακούντας. Η είσοδος στα κύτταρα επιτυγχάνεται με μία πρωτεΐνη της μεμβράνης του βακτηριδίου, την ιντερναλίνη, η οποία κωδικοποιείται από το γονίδιο *inlA*.

Σημαντικότερο ρόλο στη παθογένεια της λιστέριας παίζει η ικανότητά της να παρασιτεί εντός των μακροφάγων. Αυτό επιτυγχάνεται με τη λειτουργία δύο ενζύμων της, της λιστεριολυσίνης (εξωτοξίνη με αιμολυτική δράση που κωδικοποιείται από το γονίδιο *hly*), αλλά και μιας φωσφολιπάσης C ειδικής της φωσφατιδυλινοσιτόλης η οποία και κωδικοποιείται από το γονίδιο *plcA*. Τα ένζυμα αυτά λύουν τη φαγοσωμική μεμβράνη ώστε το βακτήριο να εισέρχεται στο κυτταρόπλασμα του μακροφάγου όπου και πολλαπλασιάζεται με ιδιαίτερα ταχύτατους ρυθμούς (χρόνος διπλασιασμού τα 50 λεπτά). Μία ιδιαίτερα σημαντική ιδιότητα της λιστέριας αποτελεί η ικανότητά της να κινείται με ιδιαίτερα μεγάλη ταχύτητα (1 $\mu\text{m/s}$) εντός του κυτοπλάσματος με τη βοήθεια μίας «ουράς» μήκους έως και 5 μm την οποία και σχηματίζουν διαπλεκόμενα νημάτια ακτίνης. Η κίνηση προσομοιάζει κομήτη που διασχίζει τον ουρανό και επιτρέπει εντός 2,5 ωρών από την είσοδό της στο μακροφάγο να έρθει σε επαφή με τη κυτταροπλασματική μεμβράνη του κυττάρου σχηματίζοντας μία προεξοχή σαν ψευδοπόδιο, μήκους έως 40 μm . Το ψευδοπόδιο αυτό ερχόμενο σε επαφή με γειτονικό μακροφάγο προκαλεί τη φαγοκυττάρωσή του από το τελευταίο. Κατά αυτόν τον τρόπο (με χρήση μίας άλλης φωσφολιπάσης C ειδικής της φωσφατιδυλοχολίνης), η *Listeria* λύνοντας και τις δύο μεμβράνες, καταφέρνει και διασπείρεται από κύτταρο σε κύτταρο χωρίς να έρχεται σε επαφή με τον εξωκυττάριο χώρο και χωρίς να κινδυνεύσει από τα κυκλοφορούντα αντισώματα (Tilney και συν., 1993).

Σημαντικότερο ρόλο στην παθογένεια της λιστέριας παίζει η μολυσματική ικανότητα του οργανισμού. Αυτή εξαρτάται κατά κύριο λόγο από την αιμολυτική δράση που ασκεί, μέσω της παραγωγής και της έκκρισης αιμολυσινών. Υπάρχουν περισσότερες της

μίας αιμολυσίνες, αλλά αυτή που έχει ταυτοποιηθεί είναι η λιστεριολυσίνη που ενεργοποιείται από θειόλη. Βέβαια, όπως προαναφέρθηκε, η αιμολυτική ικανότητα της λιστέριας δεν σημαίνει αυτομάτως και παθογόνο δράση. Αντιθέτως, η έντονη αιμολυτική δράση της *L. ivanovii*, αλλά και η ικανότητα αιμόλυσης από τη *L. seeligeri*, οι οποίες σπανίως ενοχοποιούνται για περιστατικά λιστερίωσης, αποδεικνύουν ότι μεσολαμβάνουν και άλλοι παράγοντες παθογονικότητας.

Πράγματι, στη παθογόνο δράση της λιστέριας παίζουν ρόλο διάφορα συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος, όπως η πεπτιδογλυκάνη η οποία συνδέεται άμεσα με την αντίσταση της *L. monocytogenes* στη λυσοζύμη, αλλά και μία διαλυτή λιπάση η οποία συναντάται αποκλειστικά στα παθογόνα στελέχη της *L. monocytogenes*. Άλλοι επίσης παράγοντες ενοχοποιούνται για τη παθογόνο δράση της *L. monocytogenes*, όπως η καταλάση, ο MPA, η πρωτεΐνη υπερευαισθησίας καθυστερημένου τύπου και η πρωτεΐνη p60.

Σημαντικότατο όμως ρόλο στη παθογενετική ικανότητα του μικροοργανισμού παίζει και η δεκτικότητα του ξενιστή η οποία στο μεγαλύτερο βαθμό εξαρτάται κυρίως από την κυτταρική ανοσία. Οι περισσότερες περιπτώσεις λιστερίωσης αφορούν άτομα με ελαττωμένη κυτταρική ανοσία, όπως νεογνά, ηλικιωμένους, άτομα σε ανοσοκαταστολή λόγω άλλης νόσου ή χορήγησης φαρμακευτικής αγωγής (στεροειδή) ή σε κατάσταση εγκυμοσύνης. Η αντίσταση του οργανισμού εξαρτάται από την ικανότητα μεσολάβησης μακροφάγων ενεργοποιημένων από τα T-κύτταρα και εξαρτάται από τον αριθμό τους στο τόπο της λοίμωξης και τη λειτουργική τους δραστηριότητα, επομένως καταστάσεις ελαττωμένης κυτταρικής ανοσίας δρουν αρνητικά στην εξέλιξη της λοίμωξης. Κατά την εγκυμοσύνη, η μόλυνση του εμβρύου οδηγεί στην μη ανάπτυξη χημικής ή κυτταρικής ανοσίας από αυτό έναντι της λιστέριας, γεγονός που εξηγεί και την αυξημένη ευαισθησία του εμβρύου στη λοίμωξη (Issekutz και συν., 1984).

Τέλος, σημαντικότατο ρόλο στην παθογένεια της λιστέριας παίζει το ποσό ενοφθαλμίσματος. Η κατανάλωση τροφίμου με αριθμό μεγαλύτερο των 1000 παθογόνων λιστεριών ανά 1 gr ή 1 ml τροφίμου μπορεί να καταστεί επικίνδυνη για ένα υγιές άτομο, ενώ πολύ μικρότερος αριθμός μπορεί να προκαλέσει νόσο σε έγκυες και σε ανοσοκατασταλμένους (Ralovich, 1992).

ΛΙΣΤΕΡΙΩΣΗ ΣΤΑ ΖΩΑ

Αιτιολογικός παράγοντας της λιστερίωσης στα ζώα αποτελεί κατά κύριο λόγο η *L. monocytogenes*, ενώ λίγες περιπτώσεις έχουν αναφερθεί να είναι οφειλόμενες στις *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii* με τη τελευταία να έχει ενοχοποιηθεί για αποβολές σε πρόβατα.

Η λιστερίωση εκδηλώνεται κυρίως με συμπτώματα μηνιγγοεγκεφαλίτιδας, σηψαιμίας, μονοκυτάρρωσης και με αποβολές εμβρύων. Η εγκεφαλίτιδα αποτελεί την πιο συχνή

μορφή της νόσου, προκαλώντας παράλυση των μυών του προσώπου, σιελόρροια, και περπάτημα με κυκλική κίνηση (circling disease). Η λιστεριακή εγκεφαλίτιδα μπορεί να είναι οξεία στα αιγοπρόβατα, προκαλώντας άμεσο θάνατο, εντός 4-8 ωρών από την πρώτη εμφάνιση συμπτωμάτων, και λιγότερο οξεία στα βοοειδή τα οποία και ζουν 4-14 μέρες μετά τα πρώτα συμπτώματα.

Πύλη εισόδου αποτελεί κυρίως το πεπτικό και λιγότερο το αναπνευστικό σύστημα. Λύσεις συνεχείας του στοματικού ή του ρινικού βλεννογόνου και του επιπεφυκότα μπορούν να επιτρέψουν την είσοδο των λιστεριών και την πρόκληση της νευρικής μορφής μέσω της ανιούσας νευρικής οδού. Παράγοντες stress (η κακή διατροφή, το ψύχος, η εγκυμοσύνη, ο παρασιτισμός) μπορούν να αποτελέσουν προδιαθεσικούς παράγοντες. Επιζωοτίες λιστερίωσης συμβαίνουν συνήθως στους χειμερινούς μήνες, με κυριότερη αιτία την κατανάλωση κακώς διατηρημένης ενσιρωμένης τροφής.

Αξίζει να σημειωθεί ότι ένας μεγάλος αριθμός υγιών προβάτων και αγελάδων, αποβάλλουν τον μικροοργανισμό στα κόπρανα και στο γάλα, ιδιαίτερα κατά το τέλος της εγκυμοσύνης, αποτελώντας παράγοντα μόλυνσης άλλων ζώων.

ΛΙΣΤΕΡΙΩΣΗ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ

Η λιστερίωση αποτελεί νόσημα με χαμηλή νοσηρότητα, αλλά ιδιαίτερα υψηλή θνητότητα. Χαρακτηρίζεται από ποικιλία συμπτωμάτων που κυμαίνονται από μία εικόνα απλής γρίπης, έως μηνιγγοεγκεφαλίτιδας και σηψαιμίας.

Ιδιαίτερη ευπάθεια παρουσιάζουν συγκεκριμένες ομάδες ατόμων: έγκυες, ασθενείς σε ανοσοκαταστολή, αλκοολικοί και τοξικομανείς, διαβητικοί, νοσούντες από AIDS, ηλικιωμένοι κτλ. Τα ποσοστά λιστερίωσης σε υγιή άτομα είναι μεν λιγοστά, αλλά υπαρκτά (περίπου 0,7 ανά 100.000 άτομα ετησίως), με την απαιτούμενη μολυσματική δόση να είναι ιδιαίτερα μεγάλη, σχεδόν 10^7 μικροοργανισμοί. Αντίθετα στα ευπαθή άτομα η δόση που επαρκεί μπορεί να είναι μικρότερη των 1000 μικροοργανισμών.

Κύρια πύλη εισόδου στον άνθρωπο αποτελεί ο γαστρεντερικός σωλήνας. Ο χρόνος επώασης είναι κατά μέσο όρο τρεις εβδομάδες. Οι λιστέριες εισέρχονται στο πεπτικό σύστημα, παραλαμβάνονται από τα επιθηλιακά κύτταρα στις άκρες των λαχνών του ειλεού, εισχωρούν στο στρώμα των λαχνών και παραλαμβάνονται από τα μακροφάγα. Αυτή η κατάσταση μπορεί να συνοδεύεται από ήπια συμπτώματα διάρροιας, αδιαθεσίας και χαμηλό πυρετό. Ποσοστό 1-5% των υγιών ατόμων δύναται να αποβάλλει τις λιστέριες με τα κόπρανα.

Κατά τον Seeliger (1961) υπάρχουν διάφορες μορφές της νόσου:

- Λιστερίωση των νεογνών
- Λιστερίωση ΚΝΣ

- Δερματική μορφή Λιστερίωσης
- Σηψαιμική μορφή με φαρυγγίτιδα - μονοπυρήνωση
- Οφθαλμοαδενική μορφή Λιστερίωσης
- Τραχηλοαδενική μορφή Λιστερίωσης
- Σηπτική κοκκιωμάτωση και τυφοειδοπνευμονική μορφή
- Άλλες κλινικές εκδηλώσεις.

Τα περισσότερα των περιστατικών (περίπου το 1/3) αφορούν τις έγκυες γυναίκες, τα έμβρυα και τα νεογνά.

Στις έγκυες γυναίκες η λιστερίωση παρουσιάζεται κυρίως στο τελευταίο τρίμηνο της εγκυμοσύνης. Κατ' αυτήν, μπορεί να παρατηρηθεί ασυμπτωματική λοίμωξη της μητέρας με γέννηση προσβεβλημένου με λιστέρια νεογνού, ή μία βαριά νόσηση της μητέρας συνοδευόμενη από πρόωρο τοκετό νεκρού ή ασθενούς εμβρύου.

Στις περισσότερες όμως των περιπτώσεων η μητέρα εμφανίζει μία εμπύρετη νόσο όμοια με γριπώδη συνδρομή και συνοδευόμενη από διάρροια. Η νόσος συνήθως αυτοπεριορίζεται στη μητέρα, ωστόσο έχουν παρατηρηθεί συμπτώματα εγκεφαλίτιδας κατά την εγκυμοσύνη.

Το έμβρυο μολύνεται είτε μέσω του πλακούντα είτε κατά τον τοκετό. Με βάση τις αναφερθείσες περιπτώσεις η επίπτωση στο Ηνωμένο Βασίλειο είναι μία σε 30.000 γεννήσεις νεογνών (ζωντανών ή νεκρών).

Η λιστερίωση των νεογνών είναι από τις συχνότερες μορφές της νόσου. Καθώς η μόλυνση πραγματοποιείται κατά τη περιγεννητική περίοδο, τα νεογνά δεν εμφανίζουν κυτταρική - χυμική ανοσία. Η *L.monocytogenes* είναι από τα βακτήρια που μπορούν και διαπερνούν τον εμβρυοπλακουντικό φραγμό, προκαλώντας κατά τον Monnet (Monnet, 1975) δύο μορφές της νόσου:

- Μία πρώιμη που εμφανίζεται τις πρώτες τέσσερις μέρες ζωής και χαρακτηρίζεται από πνευμονία, διάρροια, σηψαιμία, νευρολογικά συμπτώματα, πετέχειες, μικροαποστήματα σε διάφορα όργανα και φαρυγγικά κοκκιώματα. Η θνητότητα των νεογνών σε αυτή τη βαρύτερη λοίμωξη μπορεί να φτάσει το 75%.
- Την όψιμη μορφή, που εμφανίζεται μετά την έβδομη ημέρα ζωής. Τα νεογνά ενδεχομένως φαίνονται υγιή κατά τη γέννηση, και η νόσος εκδηλώνεται συνήθως ως μηνιγγίτιδα ή σηψαιμία. Η πρόγνωση είναι πολύ καλύτερη από την πρώιμη μορφή, με το 75% των νεογνών να επιζούν.

Στις ΗΠΑ η νεογνική λιστερίωση θεωρείται ως το πέμπτο αίτιο νεογνικής μηνιγγίτιδας, αλλά με τη μεγαλύτερη θνητότητα. Στην Ελλάδα η μορφή είναι σπάνια, και αναφέρονται μία ή δύο περιπτώσεις κάθε δύο χρόνια.

Από τις υπόλοιπες μορφές λιστερίωσης άξιες αναφορές είναι: η προσβολή του ΚΝΣ που προκαλεί μηνιγγίτιδα και εγκεφαλίτιδα, η δερματική μορφή που προσβάλλει συνήθως κτηνιάτρους και άτομα που ασχολούνται με τα ζώα με ανάπτυξη όζων με βλατιδώδη - φλυκταινώδη μορφή και η σηψαιμική μορφή η οποία συνοδεύεται από πυρετό και σοβαρής μορφής φαρυγγίτιδα και συνήθως αυτοϊάται. Σπανιότερες εκδηλώσεις αποτελούν η πνευμονία, η οφθαλμική μορφή, η ηπατίτιδα, η περιτονίτιδα κτλ.

Γενικά η πορεία μιας λιστεριακής λοίμωξης μπορεί να είναι οξεία, υποξεία ή χρόνια με τις ασυμπτωματικές λοιμώξεις να θεωρούνται πολύ περισσότερες.

ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ *LISTERIA* SPP.

Η λιστέρια είναι ευρέως διαδεδομένη στο περιβάλλον. Έχει απομονωθεί από το έδαφος, το γλυκό και το αλμυρό νερό, τους υπονόμους, τη νεκρή βλάστηση, τις τροφές των ζώων, αλλά και από νωπά και μαγειρεμένα τρόφιμα (κρέας και παράγωγα κρέατος, γαλακτοκομικά προϊόντα, ψάρια, φρούτα και λαχανικά). Έχει παγκόσμια εξάπλωση, απαντάται όμως περισσότερο σε περιοχές με εύκρατο κλίμα. Η λιστερίωση του ανθρώπου παρατηρείται κατά κύριο λόγο το τέλος της άνοιξης και το καλοκαίρι, ενώ των ζώων κυρίως το χειμώνα, λόγω της διατροφής με μολυσμένη ενσιρωμένη τροφή.

Οι λιστέριες με ευκολία μπορούν και διαβιούν στο έδαφος. Η αποδομούμενη φυτική ύλη προσφέρει τις θρεπτικές ουσίες που απαιτούνται για την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό τους. Καθώς μπορούν να επιβιώνουν υπό δυσμενείς συνθήκες pH και σε χαμηλές θερμοκρασίες, είναι ευρύτατα διαδεδομένες στη φύση. Ιδιαίτερα παρατηρείται αυξημένη συγκέντρωση λιστεριών σε περιβαλλοντικά δείγματα κατά την αρχή της άνοιξης καθώς έχει προηγηθεί ψυχρός εμπλουτισμός, δηλαδή αύξηση του πληθυσμού τους σε σχέση με άλλα βακτήρια, λιγότερα ανθεκτικά στις χαμηλές θερμοκρασίες του χειμώνα.

Υγιή ζώα φιλοξενούν στο έντερο τους όλα τα είδη των λιστεριών (πλην της *L.murrayi*), ενώ στον άνθρωπο συναντάμε μόνο τις *L.monocytogenes*, *L.innocua* και *L.ivanovii*. Ασθενή και υγιή ζώα διασπείρουν τις λιστέριες στο περιβάλλον με τα κόπρανά τους. Συνεπώς, χρήση κοπριάς που δεν έχει υποστεί την απαιτούμενη ζύμωση είναι δυνατόν να μολύνει, με τη χρήση της ως λίπασμα, το περιβάλλον και έμμεσα ή άμεσα φυτά και τρόφιμα.

Παρά το γεγονός ότι οι λιστέριες είναι ευρέως διαδεδομένες στο περιβάλλον και ο άνθρωπος έρχεται αναπόφευκτα σε συχνή επαφή με αυτές, εντούτοις σπάνια νοσεί. Σε αυτό συντελούν διάφοροι παράγοντες (λοιμογόνος δύναμη του βακτηρίου, ευαισθησία του ξενιστή, μέγεθος ενοφθαλμίσματος κτλ). Τα τελευταία χρόνια έχει γίνει αποδεκτό ότι η λιστερίωση αποτελεί σιτιογενή νόσο, με τη κατανάλωση μολυσμένων τροφίμων να

αποτελεί την κύρια αιτία λιστερίωσης, η οποία πολλές φορές μπορεί να πάρει μορφή επιδημίας.

Τις τελευταίες δεκαετίες δεν υπάρχει αμφιβολία ότι οι ευπαθείς ομάδες αυξάνονται, αλλά και ότι οι σύγχρονες διατροφικές συνήθειες, με τη κατανάλωση τροφίμων με μακρά ημερομηνία λήξεως ή συσκευασμένων έτοιμων προς κατανάλωση τροφίμων, δημιουργούν ευνοϊκό περιβάλλον για την αύξηση των κρουσμάτων λιστερίωσης. Σε αυτό συμβάλλει ιδιαίτερα η ικανότητα των λιστεριών να πολλαπλασιάζονται σε θερμοκρασίες ψυγείου και η ιδιότητά τους να είναι ανθεκτικές σε συντηρητικά και σε αρκετά χαμηλό pH. Το πρόβλημα είναι ιδιαίτερα μεγάλο για αλυσίδες πολυκαταστημάτων οι οποίες διακινούν τέτοια τρόφιμα διαρκώς και σε μεγάλες ποσότητες. Βέβαια τα είδη λιστεριών τα οποία μπορεί να ευρεθούν στα τρόφιμα είναι πολλά, αυτό όμως που ενδιαφέρει ιδιαίτερα είναι η εύρεση *L.monocytogenes* η οποία και θεωρείται παθογόνος για τον άνθρωπο.

Τρόφιμα τα οποία είναι δυνατόν να είναι μολυσμένα με *L.monocytogenes* είναι το απαστερίωτο γάλα, διάφορα είδη μαλακών μη ωριμασμένων τυριών, το ωμό ή ανεπαρκώς μαγειρεμένο κρέας και ορισμένα κρεατοσκευάσματα, τα πουλερικά, τα ψάρια, αλλά και διάφορα λαχανικά. Μόνο κάποια τρόφιμα με φυσική οξύτητα, όπως τα καρότα, οι ντομάτες, τα μήλα και άλλα φρούτα με φυσική οξύτητα, είναι ανθεκτικά στις λιστέρειες.

Ιδιαίτερα όσον αφορά το κρέας και τα παράγωγά του, η ανάπτυξη της λιστέρειας εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τον τύπο του προϊόντος και το pH, με τις λιστέρειες να αναπτύσσονται εύκολα σε τιμές pH ίσες ή μεγαλύτερες του 6. Είδη του γένους *Listeria* spp. απομονώθηκαν από ωμό κρέας και τα παράγωγά του σε ποσοστό έως 30% (Gitter, 1976). Ιδιαίτερα στην Ελλάδα, σε διερεύνηση παρουσίας λιστέρειας σε σφάγια κοτόπουλου, τα ποσοστά έφτασαν στο 71,7% (*Listeria* spp.) και 38,5% (*L.monocytogenes*) (Πανούλης και συν. 1990). Παρόμοια ποσοστά ανευρέθηκαν σε εργασία των Παπά και συν. (1994) από 180 δείγματα ωμών κοτόπουλων σε νοσοκομεία της Θεσσαλονίκης (72% και 47% για *Listeria* spp. και *L.monocytogenes* αντίστοιχα). Ο αριθμός της *L.monocytogenes* βρέθηκε να αυξάνει κατά δύο δεκαδικούς λογάριθμους εντός δέκα ημερών συντήρησης των τροφίμων στο ψυγείο. Έτσι τρόφιμα με μακρά συντήρηση στο ψυγείο δύνανται να προκαλέσουν λιστερίωση μετά την κατανάλωσή τους. Ένα τρόφιμο που έχει προκαλέσει αρκετές επιδημίες λιστερίωσης είναι το πατέ, το οποίο είναι ένα έτοιμο προς κατανάλωση τρόφιμο που παρασκευάζεται από ωμό κρέας, και ιδιαίτερα από χοιρινό συκώτι, αλλά και ψάρι και λαχανικά.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Γ΄

ΚΙΜΑΣ (ΜΙΤΤΩΤΟΣ)

ΓΕΝΙΚΑ

Ο κιμάς (μιττωτός) σίγουρα δεν αποτελεί ένα πρόσφατο είδος επεξεργασίας του κρέατος. Η πρώτη χρήση του σε κρεατόπιτες τοποθετείται στην αρχαιότητα. Η παραγωγή βοδινού ταρτάρ, χρησιμοποιώντας ψιλοκομμένο νωπό βόειο κρέας αναμιγμένο με βότανα και μυρωδικά, χρονολογείται από τη Μεσαιωνική Ρωσία. Οι Τάταροι άλεθαν το κρέας και το κατανάλωναν ωμό.

Η πιο γνωστή χρήση κιμά αφορά τη παραγωγή μπιφτεκιών για τη παραγωγή χάμπουργκερ. Η έννοια του μπιφτεκιού θεωρείται ότι αναφέρεται για πρώτη φορά το 1834 στο μενού του εστιατορίου Delmonico της Νέας Υόρκης. Το μπιφτέκι τοποθετημένο σε ψωμί (χάμπουργκερ) αποδίδεται στους αδερφούς Charles και Frank Menches, εμπόρους στην έκθεση Erie County του 1885.

Ο κιμάς δεν είναι τίποτε περισσότερο από νωπό ή κατεψυγμένο κρέας βοοειδών, χοίρων ή αιγοπροβάτων το οποίο έχει αποστεωθεί, είναι απαλλαγμένο από τους τένοντες, τα μεγάλα αγγεία, τη περίσσεια λιπώδους ιστού και τις περιτονίες και έχει τεμαχιστεί στη μηχανή παραγωγής κιμά. Ανάλογα με τις τοπικές συνήθειες μπορεί να παραχθεί και από άλλα είδη ζώων, όπως θηράματα ή πουλερικά. Κατά κύριο λόγο όμως όταν αναφερόμαστε σε κιμά εννοούμε τον βοδινό ο οποίος και χρησιμοποιείται για τη παραγωγή μπιφτεκιών.

Για την παρασκευή κιμά μπορούν να χρησιμοποιηθούν όλες οι μυϊκές μάζες του σφάγιου, συνήθως όμως χρησιμοποιούνται τεμάχια λιγότερο εμπορεύσιμα ως νωπά. Αυτά αφορούν τη λάπα και το καπάκι στο μοσχαρίσιο, το στρογγυλό και το κιλότο στο χοιρινό, και το μπούτι ή τη σπάλα στο πρόβειο. Η παραγωγή κιμά σύμφωνα με τη κείμενη νομοθεσία πρέπει να γίνεται μπροστά στον καταναλωτή από κομμάτι κρέας που ο ίδιος επιλέγει. Ωστόσο η βιομηχανική παραγωγή κιμά επιτρέπεται σε δύο περιπτώσεις. Όταν πρόκειται εντός της ίδιας βιομηχανίας να χρησιμοποιηθεί για παραγωγή άλλων προϊόντων, όπως π.χ. μπιφτεκία ή όταν πρόκειται να πωληθεί στον καταναλωτή από σημεία αυτοεξυπηρέτησης.

Η κατανάλωση του κιμά και των προϊόντων του είναι παγκοσμίως ευρύτατη. Στις ΗΠΑ το 48% του καταναλώμενου βόειου κρέατος είναι με τη μορφή κιμά, με μία μέση ετήσια κατανάλωση στα 15 κιλά βόειου κιμά ανά άτομο. Μάλιστα οι Αμερικανοί καταναλώνουν κατά μέσο όρο τρία χάμπουργκερ την εβδομάδα. Χαρακτηριστικό είναι ότι η κατανάλωση του κιμά θεωρείται ότι συνδέεται αντιστρόφως ανάλογα με την οικονομική κατάσταση ενός ατόμου: Η κατανάλωση κιμά στους πολίτες με χαμηλό

εισόδημα είναι τουλάχιστον κατά 1,5 κιλό μεγαλύτερη από αυτή των πολιτών με μέσο/υψηλό εισόδημα. Το γεγονός αυτό συνδέεται κατά κύριο λόγο με την βιομηχανοποίηση της παραγωγής κιμά και τους κινδύνους που αυτή περικλείει, μειώνοντας σημαντικό το ποιοτικό και υγειονομικό επίπεδο αυτού του τροφίμου. Όπως αναφέρεται στο βιβλίο «Fast Food Nation» του Eric Schlosser: «Όποιος εισάγει σήμερα στη κουζίνα του ωμό βόειο κιμά, θα πρέπει να θεωρεί ότι έχει να κάνει με ένα βιολογικό κίνδυνο.»

ΚΙΜΑΣ ΚΑΙ ΕΞΑΡΣΕΙΣ ΚΡΟΥΣΜΑΤΩΝ ΤΡΟΦΙΜΟΓΕΝΩΝ ΝΟΣΗΜΑΤΩΝ

Ο κιμάς αποτελεί το πλέον ευπαθές τρόφιμο ζωικής προέλευσης. Αποτελεί ένα θαναμάσιο υπόστρωμα για την ανάπτυξη όλων των βακτηρίων και υπόκειται εξαιρετικά εύκολα σε επιμολύνσεις από τις οποίες, πρακτικά, είναι τελείως απροστάτευτος. Η βακτηριακή επιμόλυνση του κρέατος είναι, ως γνωστόν, κατά κύριο λόγο επιφανειακή. Η κιμαδοποίηση του κρέατος, εκθέτει και διασπείρει τα βακτήρια αυτά σε όλη τη μάζα του κρέατος ευνοώντας τον ταχύτατο πολλαπλασιασμό τους. Τα στοιχεία αυτά επιβάλλουν τη τήρηση άψογων συνθηκών υγιεινής, τη ψύξη και τη διάθεση του κιμά σε σύντομο χρονικό διάστημα από την παραγωγή του.

Κατά καιρούς έχουν παρατηρηθεί ανά τον κόσμο διάφορες εξάρσεις κρουσμάτων τροφιμογενών νοσημάτων, στις οποίες ως αιτιολογικός παράγοντας αναγνωρίστηκε η κατανάλωση κιμά .

- Στα τέλη Οκτωβρίου του 2007, έξαρση κρουσμάτων σαλμονέλλωσης από έναν ιδιαίτερα ανθεκτικό στα αντιβιοτικά ορότυπο *Salmonella* Newport παρατηρήθηκε στη πολιτεία της Καλιφόρνια, προκαλώντας 42 περιπτώσεις ασθενών. Για την έξαρση ενοχοποιήθηκε η κατανάλωση βόειου κιμά (Schneider και συν., 2011).
- Το ίδιο έτος, κατεψυγμένα ωμά μπιφτέκια από βόειο κιμά, της εταιρίας Topps Meats, προκάλεσαν την ασθένεια σε 37 ανθρώπους σε 9 πολιτείες των ΗΠΑ.
- Παλαιότερα, τον Ιανουάριο του 2002, 47 περιπτώσεις ασθενειών από τον ίδιο ορότυπο (*S. Newport*) παρατηρήθηκαν σε διάφορες πολιτείες των ΗΠΑ (Νέα Υόρκη, Μίσιγκαν, Πενσυλβανία, Οχάιο, Κονέκτικατ. Ενοχοποιήθηκε επίσης η κατανάλωση ωμού ή ατελώς ψημένου βόειου κιμά (CDC, 2002).
- Στην Ευρώπη, τον Οκτώβριο του 2005 παρατηρήθηκαν στη Νορβηγία τέσσερα κρούσματα γαστρεντερίτιδας από *Salmonella* Typhimurium DT104 με τους ασθενείς να δηλώνουν ότι κατανάλωσαν βόειο κιμά, και κατά τη προετοιμασία του γεύματός τους δοκίμασαν λίγο ωμό (Isakbaeva και συν., 2005).

Ιδιαίτερα εντυπωσιακές είναι οι αποσύρσεις κιμά οι οποίες πραγματοποιήθηκαν στις περιπτώσεις που αυτός κρίθηκε ύποπτος πρόκλησης τροφιμογενών νοσημάτων, αλλά και οι οικονομικές απώλειες που υπέστησαν οι εμπλεκόμενες εταιρίες.

- Η μεγαλύτερη ανάκληση κιμά πραγματοποιήθηκε το 2008 από την εταιρία Westland/Hallmark Meat Company της Καλιφόρνια. Συνολική ποσότητα 67.000 τόνων κιμά αποσύρθηκε όταν θεωρήθηκε ότι το κρέας μπορεί να προέρχονταν από ζώα νοσούντα από Σπογγιόμορφη Εγκεφαλοπάθεια (BSE) (USDA,2008).
- Το 2009 η εταιρία Beef Packers με έδρα επίσης τη Καλιφόρνια απέσυρε 364 τόνους βόειου κιμά πιθανώς σχετιζόμενου με κρούσματα σαλμονελλώσεων.
- Στη προαναφερόμενη έξαρση κρουσμάτων κολιβακίλλωσης από τη κατανάλωση μπιφτεκιών της εταιρίας Torpps Meats, η εν λόγω εταιρία υποχρεώθηκε στην απόσυρση 9.863 τόνων του προϊόντος, γεγονός που οδήγησε στη κατάρρευση και χρεωκοπία της εταιρίας (CNN, 2007).
- Στην Ελλάδα τον Αύγουστο του 2011 κατασχέθηκαν από την αρμόδια υπηρεσία (Ε.Φ.Ε.Τ) 2,5 τόνοι κατεψυγμένου κιμά από βόειο κρέας μετά την ανίχνευση *E.coli* O157.
- Τον ίδιο μήνα στις ΗΠΑ υπήρξε ανάκληση για τον ίδιο λόγο περίπου 28 τόνων βόειου κιμά από την εταιρία National Beef Packing Company.

Τα μεγέθη των παραπάνω ανακλήσεων και οι οικονομικές απώλειες που προκαλούν είναι εύκολα κατανοητές αν αναλογιστούμε ότι όλη η ελληνική κτηνοτροφία παράγει κατά μέσο όρο μόλις 59.000 τόνους βόειο κρέας ετησίως!

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ – ΣΚΟΠΟΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Α΄

ΣΚΟΠΟΣ - ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ

ΣΚΟΠΟΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Κατά το πειραματικό μέρος της παρούσας διπλωματικής εργασίας πραγματοποιήθηκε εργαστηριακή διερεύνηση δειγμάτων κιμά διαφόρων χαρακτηριστικών (νωπός - κατεψυγμένος, εισαγόμενος - εξαγόμενος, 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 παρουσίας *Listeria monocytogenes* και *Salmonella* spp.

Σκοπός αυτής της μελέτης αποτελεί:

- Η παρατήρηση των επικρατούντων μικροβιολογικών χαρακτηριστικών του κιμά εμπορίου, με έμφαση στη παρουσία *L.monocytogenes* και *Salmonella* spp.
- Ο συσχετισμός των εργαστηριακών αποτελεσμάτων με παράγοντες οι οποίοι μπορεί να επηρεάσουν τις τιμές τους (π.χ. ιδιαίτερα χαρακτηριστικά κιμά, τήρηση κανόνων υγιεινής, τύπος καταστήματος λιανικής πώλησης κτλ.).
- 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.
- Ο έλεγχος της διαγνωστικής αξίας κάποιων καινοτόμων μεθόδων στον έλεγχο συγκεκριμένων χαρακτηριστικών (VIDAS LMO2).

ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ

Η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε από καταστήματα λιανικής πώλησης κρέατος και κρεατοσκευασμάτων (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 (1-286) 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 κατάσταση 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), 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 κιμά, όπως έχουν οριστεί σύμφωνα με τις απαιτήσεις των αρχών HACCP και αναγράφονται στον Οδηγό Υγιεινής του Ε.Φ.Ε.Τ. (Οδηγός Νο 4) για τα κρεοπωλεία.

Πίνακας 8. Δελτίο Δειγματοληψίας

ΔΕΛΤΙΟ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ		
Ημερομηνία:	Νο Δείγματος:	
Στοιχεία Επιχείρησης:		
Στοιχεία Δείγματος		
Συνολική Ποσότηταgr		
Βόειος <input type="checkbox"/>	Χοίρειος <input type="checkbox"/>	Ανάμικτος <input type="checkbox"/>
Νωπός <input type="checkbox"/>	Κατεψυγμένος <input type="checkbox"/>	
Εγχώριος <input type="checkbox"/>	Εισαγόμενος <input type="checkbox"/>	
<u>Σχόλια-Παρατηρήσεις</u>		

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Β'

ΑΡΙΘΜΗΣΗ ΟΛΙΚΗΣ ΜΕΣΟΦΙΛΗΣ ΧΛΩΡΙΔΑΣ

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 από τις υγειονομικές υπηρεσίες όταν ο παραγόμενος κιμάς παράγεται λιανικά και διατηρείται για χρόνο μικρότερο των 24 ωρών. Ακολουθεί η αναλυτική περιγραφή της εφαρμοζόμενης μεθοδολογίας.

ΑΡΙΘΜΗΣΗ OMX ΚΑΤΑ ISO 4833

ΕΞΕΤΑΖΟΜΕΝΗ ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΑΡΧΙΚΗ ΑΡΑΙΩΣΗ

Ζυγίζονται σε σακούλα 25 gr δείγματος κιμά για να προστεθεί εν συνεχεία αραιωτικό όγκου 225 ml. Το αραιωτικό 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 αραιώση πρέπει να αφήνεται μέχρι 15 λεπτά, εάν είναι αναγκαίο, ώστε να καθιζάνουν τα μεγάλα σωματίδια.

ΕΠΟΜΕΝΕΣ ΑΡΑΙΩΣΕΙΣ

Ένα ml της αρχικής αραιώσης (10^{-1}), με όριο αβεβαιότητας της μέτρησης $\pm 5\%$, μεταφέρεται σε δοκιμαστικό σωλήνα ο οποίος περιέχει 9 ml PW, με όριο αβεβαιότητας της μέτρησης $\pm 5\%$, 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 και 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^{-5} - 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.

ΕΝΣΩΜΑΤΩΣΗ ΣΕ PCA ΚΑΙ ΕΠΩΑΣΗ

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 σιφόνιο 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 σιφόνιο.

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)

- Tryptone	5,0 g
- Dehydrated yeast extract	2,5 g
- Anhydrous glucose	1,0 g
- Agar	12 έως 18 g
- 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.

Αποστειρώνεται με υγρή αποστείρωση, στους 121°C επί 15 λεπτά

ΑΡΙΘΜΗΣΗ ΑΠΟΙΚΙΩΝ

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 g δείγματος (προκειμένου για στερεά), υπολογίζεται χρησιμοποιώντας την ακόλουθη εξίσωση:

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

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 $1 g$ 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 g .

ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΡΙΘΜΗΣΗΣ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΧΛΩΡΙΔΑΣ ΣΤΟΥΣ 30°C

Εξεταζόμενη ποσότητα, 25 g κιμά

σε 225 ml Peptone Water



Ενσωμάτωση 1 ml σε 15 ml PCA

Επώαση σε 30°C επί 72±3h



Αρίθμηση των αποικιών



Έκφραση των αποτελεσμάτων

Διάγραμμα Β. Αρίθμηση OMX στους 30°C.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Γ΄

ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ *SALMONELLA* SPP.

ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΗΣ *SALMONELLA* SPP. ΣΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ

Η ανίχνευση της παρουσίας της *Salmonella* spp. πραγματοποιήθηκε κατά το ISO 6579 όπως επιβάλλει ο Ευρωπαϊκός κανονισμός 2073/2005. Σύμφωνα με τον κανονισμό αυτόν απαιτείται η απουσία της *Salmonella* spp. τόσο σε κιμά που θα καταναλωθεί ωμός όσο και σε κιμά που θα καταναλωθεί μαγειρεμένος, για να θεωρηθεί κατάλληλος.

Ακολουθεί η περιγραφή της εφαρμοζόμενης τεχνικής

ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΗΣ *SALMONELLA* SPP. ΚΑΤΑ ISO 6579

ΕΞΕΤΑΖΟΜΕΝΗ ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ, ΑΡΧΙΚΗ ΑΡΑΙΩΣΗ ΚΑΙ ΜΗ ΕΚΛΕΚΤΙΚΟΣ ΠΡΟΕΜΠΛΟΥΤΙΣΜΟΣ.

Ζυγίζονται σε σακούλα 25 g δείγματος κιμά για να προστεθεί εν συνεχεία αραιωτικό όγκου 225 ml. Το προ-εμπλουτιστικό υλικό είναι το Buffered Peptone Water (BPW). Ακολουθεί η ομογενοποίηση σε ομογενοποιητή (stomacher). Μετά την ομογενοποίηση, η αραιώση πρέπει να αφήνεται μέχρι 15 λεπτά, εάν είναι αναγκαίο, ώστε να καθιζάνουν τα μεγάλα σωματίδια.

Buffered peptone water

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

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.

Η αρχική αραίωση επωάζεται στους 37°C επί 16-20 ώρες.

ΕΚΛΕΚΤΙΚΟΣ ΕΜΠΛΟΥΤΙΣΜΟΣ

Μεταφέρονται 0,1 ml της καλλιέργειας προ-εμπλουτισμού σε δοκιμαστικό σωλήνα με 10 ml ζωμού RV. Μεταφέρεται επίσης 1 ml σε σωλήνα με 10 ml ΜΚΤΤn.

Οι ενοφθαλμισμένοι ζωμοί επωάζονται, ως εξής:

Ο ζωμός RV στους 41,5±1°C επί 24 ώρες.

Ο ζωμός ΜΚΤΤn στους 37°C επί 24 ώρες.

Malachite green / magnesium chloride (modified Rappaport-Vassiliadis) medium

Βασικό υλικό:

- Peptone, enzymatic digest of animal tissue	4,0 g
- Peptone from soybeans	1,0 g
- Sodium chloride (NaCl)	8,0 g
- Dipotassium hydrogen phosphate trihydrate ($K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$)	0,4 g
- Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)	0,6 g
- Distilled water έως	1000 ml

Πρόσθετο υλικό 1:

- Magnesium chloride hexahydrate ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)	31,7 g
- Distilled water έως	100 ml

Πρόσθετο υλικό 2:

- Malachite green oxalate	0,4 g
- Distilled water έως	100 ml

Ολοκλήρωση του υποστρώματος

Διαλύουμε όλα τα υλικά του βασικού υποστρώματος στο νερό με ήπια θέρμανση (χωρίς βρασμό). Προσθέτουμε το πρόσθετο υλικό 1 και 10 ml από το πρόσθετο υλικό 2.

Ρυθμίζουμε το pH στο $5,2\pm 0,1$ και μοιράζουμε ανά 10 ml σε σωλήνες. Η αποστείρωση γίνεται στους $115\pm 1^\circ\text{C}$ για 15 λεπτά.

Muller-Kauffmann tetrathionate - novobiocin broth (MKTTn)

Βασικό υλικό:

- Meat extract	4,3 g
- Tryptone	8,6 g
- Sodium chloride (NaCl)	2,6 g
-Calcium carbonate (CaCO_3)	38,7 g
-Sodium thiosulfate pentahydrate ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3\cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	47,8 g
-Ox bile for bacteriological use	78 g
-Brilliant green	9,6 mg
-Water	1000 ml

Διαλύουμε τα συστατικά στο νερό με θέρμανση μέχρι βρασμού για 5 λεπτά και ρυθμίζουμε το pH στο $8,2\pm 0,2$. Το υλικό δεν αποστειρώνεται. Διατηρείται μέχρι 4 εβδομάδες στους $3\pm 2^\circ\text{C}$.

Πρόσθετο υλικό 1 (Iodine-iodide solution):

- Iodine	20,0 g
-Potassium iodide (KI)	25,0 g
-Water έως	100 ml

Διαλύουμε πλήρως το ιωδιούχο κάλιο σε 10 ml νερού, κατόπιν προσθέτουμε το ιώδιο και αραιώνουμε μέχρι 100 ml με αποστειρωμένο νερό. Δεν θερμαίνουμε.

Πρόσθετο υλικό 2 (Novobiocin solution):

- Novobiocin sodium salt	0,04 g
- Water	5 ml

Διαλύουμε την νοβοβιοκίνη στο νερό και αποστειρώνουμε με διήθηση με μικροβιοκρατείς ηθμούς.

Ολοκλήρωση του υποστρώματος:

- Βασικό υπόστρωμα	1000 ml
--------------------	---------

- Πρόσθετο υλικό 1	20 ml
- Πρόσθετο υλικό 2	5 ml

Το πλήρες υπόστρωμα πρέπει να χρησιμοποιηθεί την ημέρα της παρασκευής του.

ΣΠΟΡΑ ΣΕ ΣΤΕΡΕΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ

Από την καλλιέργεια κάθε ζωμού εμπλουτισμού (RV, ΜΚΤΤη), ποσότητα ενός μικροβιολογικού κρίκου σπείρεται στην επιφάνεια ενός τρυβλίου με BGA, έτσι ώστε να ληφθούν καλά απομονωμένες αποικίες. Η ποσότητα αυτή είναι δυνατόν να σπαρεί σε δύο διαδοχικά τρυβλία.

Η ίδια διαδικασία εφαρμόζεται και για το XLD.

Brilliant green / phenol red lactose-sucrose agar (BGA)

Βασικό υλικό:

- Meat extract powder	5,0 g
- Peptone, enzymatic digest of animal tissue	10,0 g
- Disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4)	1,0 g
- Sodium dihydrogen phosphate (NaH_2PO_4)	0,6 g
- Agar	15,0 g
- Distilled water	900 ml

Πρόσθετο υλικό 1:

- Lactose	10,0 g
- Sucrose	10,0 g
- Phenol red	0,09 g
- Distilled water	100 ml

Πρόσθετο υλικό 2:

- Brilliant green	0,5 g
-------------------	-------

-Distilled water έως 100 ml

Ολοκλήρωση του υποστρώματος:

Διαλύουμε όλα τα υλικά του βασικού υποστρώματος στο νερό και αποστειρώνουμε στους $121\pm 1^{\circ}\text{C}$ για 15 λεπτά.

Παρασκευάζουμε το πρόσθετο υλικό 1, διαλύοντας τα συστατικά σε αποστειρωμένο νερό. Θερμαίνουμε το διάλυμα σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 70°C για 20 λεπτά. Ψύχουμε το υλικό στους $55\pm 1^{\circ}\text{C}$ και το χρησιμοποιούμε αμέσως.

Παρασκευάζουμε το πρόσθετο υλικό 2 διαλύοντας το brilliant green στο νερό. Αφήνουμε το υλικό σε σκοτεινό μέρος τουλάχιστον για μία ημέρα προκειμένου να αυτοαποστειρωθεί.

Προσθέτουμε το πρόσθετο υλικό 1 και 1 ml από το πρόσθετο υλικό 2 στο άγαρ λίγο πριν την διανομή του υλικού στα τρυβλία. Το τελικό pH του διαλύματος πρέπει να είναι $7,0\pm 0,1$.

Xylose lysine desoxycholate agar (XLD Agar)

Βασικό υλικό:

- D(+)-Xylose	3,5 g
- L(-)-Lysine	5,0 g
- Sodium desoxycholate	2,5 g
- Yeast extract	3,0 g
- Saccharose	7,5 g
- Lactose	7,5 g
- Sodium chloride (NaCl)	5,0 g
- Sodium thiosulfate ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)	6,8 g
- Ferric ammonium citrate	0,8 g
- Agar	13,0g
- Distilled water	έως 900 ml

Πρόσθετο υλικό:

- Phenol red	0,4 g
--------------	-------

- Distilled water

έως 100 ml

Ολοκλήρωση του υποστρώματος

Διαλύουμε τα συστατικά του βασικού υποστρώματος και 20 ml του πρόσθετου υλικού, με θέρμανση μέχρι βρασμού. Το τελικό pH του διαλύματος πρέπει να είναι $7,4 \pm 0,1$. Το υλικό δεν αποστειρώνεται, και μετά την παρασκευή του το αφήνουμε να κρυώσει και το μοιράζουμε σε τρυβλία.

Όταν χρησιμοποιείται το υπόστρωμα BGA, συνιστάται η εφαρμογή της ακόλουθης μεθόδου σποράς: Χρησιμοποιείται ο ίδιος κρίκος για τα δύο τρυβλία. Λαμβάνεται ένα σταγονίδιο από το χείλος της επιφάνειας του υποστρώματος και ενοφθαλμίζονται τα δύο τρυβλία ώστε να ληφθούν μεμονωμένες αποικίες. Χρησιμοποιείται ολόκληρη η επιφάνεια των τρυβλίων. Οι γραμμές σποράς πρέπει να απέχουν μεταξύ τους 0,5 cm περίπου. Δεν πρέπει να αποστειρώνεται ο κρίκος μεταξύ της πρώτης και της δεύτερης σποράς, ή μεταξύ των δυο τρυβλίων. Όταν χρησιμοποιείται μεγάλο τρυβλίο, η σπορά γίνεται με τον ίδιο τρόπο, μόνο σε αυτό.

Τα τρυβλία με BGA και XLD αναστρέφονται, τοποθετούνται σε επωαστικό κλίβανο θερμοκρασίας 37°C επί 20-24 ώρες, και εξετάζονται για την παρουσία χαρακτηριστικών αποικιών σαλμονελλών. Οι αποικίες αυτές, όταν αναπτύσσονται σε υπόστρωμα BGA, προκαλούν αλλαγή του χρώματος του υποστρώματος από ροζ σε κόκκινο.

Στο υπόστρωμα BGA οι χαρακτηριστικές αποικίες των σαλμονελλών έχουν χρώμα κόκκινο ή είναι ελαφρώς ροζ-λευκές και αδιαφανείς, και το υπόστρωμα που τις περιβάλλει λαμπερό κόκκινο.

Στο υπόστρωμα XLD οι χαρακτηριστικές αποικίες των σαλμονελλών έχουν χρώμα κόκκινο ή ελαφρώς ροζ-λευκές και αδιαφανείς με μαύρο κέντρο.

Ωστόσο, το χρώμα είναι δυνατόν να διαφέρει σε κάποιο βαθμό μεταξύ διαφόρων στελεχών σαλμονελλών αλλά ακόμα και μεταξύ διαφόρων παρτίδων του ίδιου υποστρώματος. Συνεπώς, είναι απαραίτητη η βιοχημική και η ορολογική επιβεβαίωση ακόμα και των χαρακτηριστικών αποικιών σαλμονελλών.

ΑΝΑΣΠΟΡΑ ΓΙΑ ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ

Λαμβάνονται πέντε χαρακτηριστικές ή ύποπτες αποικίες από κάθε τρυβλίο κάθε εκλεκτικού υποστρώματος και ανασπείρονται στην επιφάνεια τρυβλίων με “στεγνωμένο” θρεπτικό άγαρ, κατά τρόπο ώστε να ληφθούν καλά απομονωμένες αποικίες.

Τα τρυβλία επωάζονται σε θερμοκρασία 37°C επί 18-24 ώρες.

Οι καθαρές καλλιέργειες που λαμβάνονται, χρησιμοποιούνται για βιοχημική και ορολογική επιβεβαίωση.

BIOΧΗΜΙΚΗ ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ *SALMONELLA* SPP.

Οι καθαρές καλλιέργειες σε θρεπτικό άγαρ, υποβάλλονται στις εξής δοκιμές:

- Καλλιέργεια σε TSI άγαρ.
- Δοκιμή διάσπασης της ουρίας.
- Δοκιμή αποκαρβοξυλίωσης της λυσίνης.
- Δοκιμή ανίχνευσης της β-γαλακτοσιδάσης.
- Δοκιμή παραγωγής ινδόλης.

Εάν η βιοχημική εικόνα μαρτυρεί την παρουσία σαλμονελλών στο δείγμα, ακολουθεί ορολογική επιβεβαίωση. Για την ταυτοποίηση των σαλμονελλών είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν συστοιχίες βιοχημικών δοκιμών ταυτοποίησης, οι οποίες διατίθενται στο εμπόριο (π.χ. API 20E kit του Οίκου bioMerieux).

Οι ανωτέρω δοκιμές πραγματοποιούνται ως εξής.

Καλλιέργεια σε TSI άγαρ

Με ακίδα ενοφθαλμισμού, σπείρεται η κεκλιμένη επιφάνεια του υποστρώματος και κεντάται ο πυθμένας. Ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία 37°C επί 24 ώρες. Οι μεταβολές στο υπόστρωμα ερμηνεύονται ως εξής:

<u>Πυθμένας</u>	<u>Αποτέλεσμα</u>
Κίτρινος	γλυκόζη - θετικό (ζύμωση της γλυκόζης)
Κόκκινος ή αμετάβλητος	γλυκόζη - αρνητικό (έλλειψη ζύμωσης της γλυκόζης)
Μαύρος	παραγωγή υδρόθειου
Φυσαλίδες ή ρωγμές	παραγωγή αερίου κατά τη ζύμωση της γλυκόζης
<u>Κεκλιμένη επιφάνεια</u>	<u>Αποτέλεσμα</u>
Κίτρινη	λακτόζη ή/και σουκρόζη - θετικό (ζύμωση της λακτόζης ή/και της σουκρόζης)
Κόκκινη ή αμετάβλητη	λακτόζη ή/και σουκρόζη - αρνητικό

(έλλειψη ζύμωσης της λακτόζης ή/και της σουκρόζης)

Οι χαρακτηριστικές καλλιέργειες της σαλμονέλλας δίνουν αλκαλική (κόκκινη) κεκλιμένη επιφάνεια με παραγωγή αερίου και όξινο (κίτρινο) πυθμένα, και στο 90% των περιπτώσεων, παραγωγή υδρόθειου, που δίνει μαύρο χρώμα στο υπόστρωμα.

Όταν σπανιότερα απομονώνεται σαλμονέλλα λακτόζη - θετική, η κεκλιμένη επιφάνεια του TSI είναι κίτρινη. Συνεπώς, η προκαταρκτική επιβεβαίωση των σαλμονελλών δεν πρέπει να βασίζεται μόνο στη δοκιμή του υποστρώματος TSI, δηλαδή το συγκεκριμένο στέλεχος δεν πρέπει να απορρίπτεται επειδή η κεκλιμένη επιφάνεια του TSI είναι κίτρινη, εφόσον τα υπόλοιπα αποτελέσματα στο TSI είναι συμβατά με σαλμονέλλα.

Δοκιμή διάσπασης της ουρίας

Σπείρεται η κεκλιμένη επιφάνεια του υποστρώματος.

Επιάζεται σε θερμοκρασία 37°C επί 24 ώρες και εξετάζεται κατά διαστήματα.

Εάν η αντίδραση είναι θετική, η διάσπαση της ουρίας ελευθερώνει αμμωνία, η οποία μεταβάλλει το χρώμα του δείκτη ερυθρού φαινόλης, αρχικά σε ροδόχρουν και στη συνέχεια σε κερασόχρουν. Συχνά η αντίδραση είναι ορατή μετά από 2-4 ώρες.

Δοκιμή αποκαρβοξυλίωσης της L-λυσίνης

Ενοφθαλμίζεται, αμέσως κάτω από την ελεύθερη επιφάνεια του υγρού υποστρώματος.

Επιάζεται σε θερμοκρασία 37°C επί 24 ώρες.

Ανάπτυξη ιώδους χρώματος μετά την επώαση, υποδηλώνει θετική αντίδραση.

Ανάπτυξη κίτρινου χρώματος, υποδηλώνει αρνητική αντίδραση.

Ανίχνευση της β-γαλακτοσιδάσης

Μεταφέρεται ποσότητα ενός κρίκου της ύποπτης αποικίας σε σωλήνα που περιέχει 0,25 ml φυσιολογικού ορού, και αναδεύεται ώστε να δημιουργηθεί εναιώρημα.

Προστίθεται μία σταγόνα τολουενίου (toluene) και ανακινείται ο σωλήνας.

Τοποθετείται ο σωλήνας σε υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 37°C επί αρκετά λεπτά.

Προστίθενται 0,25 ml του αντιδραστηρίου για την ανίχνευση της β-γαλακτοσιδάσης και ανακινείται.

Επανατοποθετείται ο σωλήνας στο υδατόλουτρο στους 37°C, επωάζεται επί 24 ώρες, και εξετάζεται κατά διαστήματα.

Κίτρινο χρώμα υποδηλώνει θετική αντίδραση. Συχνά, η αντίδραση είναι εμφανής μετά από 20 λεπτά.

Εάν χρησιμοποιούνται παρασκευασμένοι εμποτισμένοι χάρτινοι δίσκοι, ακολουθούνται οι οδηγίες του παρασκευαστή.

Δοκιμή παραγωγής ινδόλης

Ενοφθαλμίζεται με την ύποπτη αποικία σωλήνας που περιέχει 5 ml του υποστρώματος τρυπτόνης / τρυπτοφάνης. Επωάζεται σε θερμοκρασία 37°C επί 24 ώρες.

Μετά την επώαση, προστίθεται 1 ml αντιδραστηρίου Kovac's.

Ο σχηματισμός κόκκινου δακτυλίου υποδηλώνει θετική αντίδραση.

Ο σχηματισμός κίτρινου δακτυλίου υποδηλώνει αρνητική αντίδραση.

Nutrient agar

- Meat extract	3,0 g
- Peptone, enzymatic digest of animal tissue	5,0 g
- Agar	15,0 g
-Distilled water έως	1000 ml
- Sodium chloride (NaCl) (προαιρετικό)	5,0 g

Διαλύουμε τα συστατικά στο νερό και ρυθμίζουμε το pH στο 7,0±0,1. Η αποστείρωση γίνεται στους 121±1°C για 15 λεπτά και αφού κρυώσει το υλικό το μοιράζουμε σε τρυβλία.

Triple – sugar / iron agar

Βασικό υλικό:

- Meat extract	3,0 g
- Yeast extract	3,0 g

- Peptone, enzymatic digest of animal tissue	20,0 g
- Lactose	10,0 g
- Sucrose	10,0 g
- D(+)-Glucose	1,0 g
- Ferric citrate	0,3 g
- Sodium chloride (NaCl)	5,0 g
- Sodium thiosulfate (Na ₂ S ₂ O ₃)	0,3 g
- Phenol red	0,024 g
- Agar	12,0 g
- Distilled water	έως 1000 ml

Ολοκλήρωση του υποστρώματος

Διαλύουμε τα συστατικά του υποστρώματος με θέρμανση. Το τελικό pH του διαλύματος πρέπει να είναι $7,4 \pm 0,1$. Μοιράζουμε το υλικό σε σωλήνες ανά 10 ml και το αποστειρώνουμε στους 121°C για 10'. Αφήνουμε τους σωλήνες σε κεκλιμένη θέση να κρυώσουν, ώστε το agar να δημιουργεί σε κάθε σωλήνα μία επιφάνεια μήκους περίπου 2,5 cm.

L-Lysine decarboxylase medium

Βασικό υλικό

- L-Lysine monohydrochloride	5,0 g
- Yeast extract	3,0 g
- Bromocresol purple	0,015 g
- D(+)-Glucose	1,0 g
- Distilled water έως	1000 ml

Διαλύουμε τα συστατικά του βασικού υποστρώματος, με θέρμανση. Το pH του διαλύματος πρέπει να είναι 6,8. Μοιράζουμε ανά 5 ml σε σωληνάκια και το αποστειρώνουμε στους 121°C για 10 λεπτά.

Ερμηνεία των βιοχημικών δοκιμών

Οι σαλμονέλλες δίνουν τα ακόλουθα ποσοστά στις βιοχημικές δοκιμές.

Πίνακας 9. Βιοχημικές δοκιμές *Salmonella* spp. και ποσοστά εντόπισης

Δοκιμή ⁽¹⁾	Θετική ή αρνητική αντίδραση	Ποσοστό των ενοφθαλμίσεων σαλμονελλών που δίνουν την επικρατούσα αντίδραση (θετική ή αρνητική κατά περίπτωση) ⁽²⁾
TSI: Διάσπαση της γλυκόζης (παραγωγή οξέος)	+	100
TSI: Διάσπαση της γλυκόζης (παραγωγή αερίου)	+	91,9 ⁽³⁾
TSI: Διάσπαση της λακτόζης ή/και σουκρόζης	-	99,2
TSI: Παραγωγή υδροθείου	+	91,6
Διάσπαση της ουρίας	-	99
Αποκαρβοξυλίωση της λυσίνης	+	94,6 ⁽⁵⁾
Αντίδραση β-γαλακτοσιδάσης	-	98,5 ⁽⁴⁾
Αντίδραση παραγωγής ινδόλης	-	98,9

⁽¹⁾ Ewing W. H. and Ball M. M., *The biochemical reactions of members of the genus Salmonella*. National Communicable Disease Center, Atlanta, Georgia, USA (1986).

⁽²⁾ Τα ποσοστά δείχνουν μόνον ότι όλα τα στελέχη σαλμονελλών δεν δίνουν τις αντιδράσεις που σημειώνονται με + και -. Τα ποσοστά αυτά ποικίλλουν από χώρα σε χώρα και από προϊόν σε προϊόν.

⁽³⁾ Η *Salmonella* Typhi δεν παράγει αέριο.

⁽⁴⁾ Η *Salmonella* υπογένος III (Arizona) δίνει θετικές ή αρνητικές αντιδράσεις στη λακτόζη, αλλά δίνει πάντοτε θετική αντίδραση στη β-γαλακτοσιδάση. Η *Salmonella* υπογένος II δίνει αρνητικές αντιδράσεις στη λακτόζη, αλλά δίνει θετική αντίδραση στη β-γαλακτοσιδάση. Για τη μελέτη των στελεχών, ίσως είναι χρήσιμη η διεξαγωγή συμπληρωματικών βιοχημικών δοκιμών.

⁽⁵⁾ Η *Salmonella* Paratyphi A είναι αρνητική.

ΟΡΟΛΟΓΙΚΗ ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ SALMONELLA SPP.

Η ανίχνευση της παρουσίας των σαλμονελλών με αντιγόνα O-, Vi- και H-, πραγματοποιείται από καθαρές καλλιέργειες με οροσυγκόλληση σε πλάκα με κατάλληλους αντιορούς, και ύστερα από τον αποκλεισμό των αυτο-συγκολλούμενων στελεχών.

Αποκλεισμός των αυτο-συγκολλούμενων στελεχών

Τοποθετείται μία σταγόνα φυσιολογικού ορού σε καθαρή αντικειμενοφόρο πλάκα.

Στη σταγόνα αυτή εναιωρείται μέρος της αποικίας που πρόκειται να εξετασθεί.

Το πλακίδιο ανακινείται ήπια, επί 30-60 δευτερόλεπτα.

Παρατηρείται το αποτέλεσμα σε σκοτεινόχρωμο πεδίο, κατά προτίμηση με τη βοήθεια μεγεθυντικού φακού. Εάν τα βακτήρια έχουν συσσωματωθεί σε περισσότερο ή λιγότερο ευδιάκριτες μονάδες, το στέλεχος θεωρείται αυτο-συγκολλούμενο και δεν πρέπει να υποβληθεί σε δοκιμές συγκόλλησης, καθόσον η ανίχνευση των αντιγόνων είναι αδύνατη.

Εξέταση για αντιγόνα O-, Vi- και H-

Καθαρή μη αυτο-συγκολλούμενη αποικία, δοκιμάζεται όπως για τον αποκλεισμό των αυτό-συγκολλούμενων στελεχών, χρησιμοποιώντας πολυδύναμους και μονοδύναμους ορούς αντι-O, αντι-Vi, και αντι-H αντίστοιχα, αντί για φυσιολογικό ορό. Εάν υπάρξει συγκόλληση, η αντίδραση θεωρείται θετική.

Δοκιμή κινητικότητας

Ενοφθαλμίζεται ημίρρευστο θρεπτικό άγαρ με καθαρή μη αυτο-συγκολλούμενη αποικία.

Επωάζεται σε θερμοκρασία 37°C επί 24 ώρες.

ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΒΙΟΧΗΜΙΚΩΝ ΚΑΙ ΟΡΟΛΟΓΙΚΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΝ

Στελέχη που επιδεικνύουν χαρακτηριστικές βιοχημικές αντιδράσεις και θετικά αποτελέσματα στις ορολογικές αντιδράσεις, θεωρούνται ως σαλμονέλλες (*Salmonella* spp.).

Πιθανόν να είναι σαλμονέλλες στελέχη που:

- Επιδεικνύουν χαρακτηριστικές βιοχημικές αντιδράσεις, αλλά δεν δίνουν θετικά αποτελέσματα στις ορολογικές αντιδράσεις,
- Δεν επιδεικνύουν χαρακτηριστικές βιοχημικές αντιδράσεις, αλλά δίνουν θετικά αποτελέσματα στις ορολογικές αντιδράσεις,
- Αυτο-συγκολλούμενα στελέχη, που επιδεικνύουν χαρακτηριστικές βιοχημικές αντιδράσεις,

Στελέχη που δεν επιδεικνύουν χαρακτηριστικές βιοχημικές αντιδράσεις και δεν δίνουν θετικά αποτελέσματα στις ορολογικές αντιδράσεις, δεν θεωρούνται ως σαλμονέλλες.

Πίνακας 10. Ερμηνεία ορολογικών και βιοχημικών αντιδράσεων.

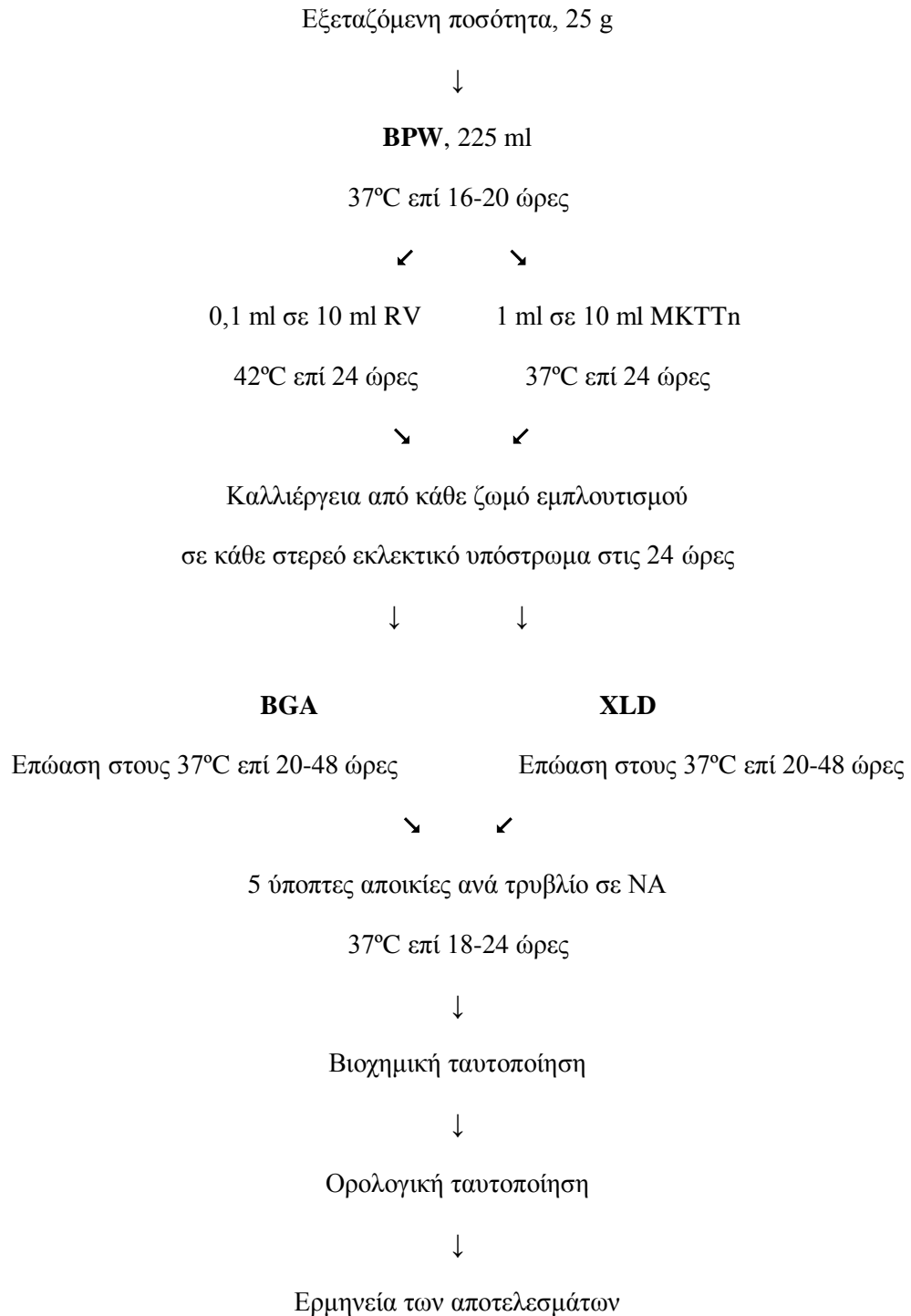
Βιοχημικές αντιδράσεις	Αυτο-συγκόλληση	Ορολογικές αντιδράσεις	Ερμηνεία
Χαρακτηριστικές	Όχι	O-, Vi- ή H- αντιγόνα θετικά	Στελέχη θεωρούμενα ως σαλμονέλλες
Χαρακτηριστικές	Όχι	Όλες οι αντιδράσεις αρνητικές	Πιθανόν να είναι σαλμονέλλες
Μη χαρακτηριστικές	Όχι	O-, Vi- ή H- αντιγόνα θετικά	Πιθανόν να είναι σαλμονέλλες
Μη χαρακτηριστικές	Όχι	Όλες οι αντιδράσεις αρνητικές	Δεν θεωρούνται ως σαλμονέλλες
Χαρακτηριστικές	Ναι	Δεν εξετάζεται	Πιθανόν να είναι σαλμονέλλες

ΟΡΙΣΤΙΚΗ ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ *SALMONELLA* SPP.

“Στελέχη θεωρούμενα ως σαλμονέλλες” ή τα “Πιθανόν να είναι σαλμονέλλες” πρέπει να αποστέλλονται για οριστική ταυτοποίηση σε ένα αναγνωρισμένο Κέντρο Αναφοράς Σαλμονελλών.

Τα αποστελλόμενα στελέχη πρέπει να συνοδεύονται από όλες τις πληροφορίες που σχετίζονται με αυτά (προέλευση, ιδιότητες κτλ).

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ ΣΑΛΜΟΝΕΛΛΩΝ



Διάγραμμα Γ. Ανίχνευση ειδών *Salmonella* spp.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Δ΄

ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ *LISTERIA MONOCYTOGENES*

ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΗΣ *LISTERIA MONOCYTOGENES* ΣΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ

Η ανίχνευση της παρουσίας *Listeria monocytogenes* σε τρόφιμα πρέπει να πραγματοποιείται εργαστηριακά σύμφωνα με τις τεχνικές του προτύπου ISO 11290 όπως επιβάλλει ο Ευρωπαϊκός κανονισμός 2073/2005 (με τον τροποποιητικό 1441/2007). Πρέπει όμως να αναφερθεί ότι η συγκεκριμένη νομοθεσία θεσπίζει συγκεκριμένα όρια μόνο για τα έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα. Ως εκ τούτου, δεν υπάρχουν νομικά απαιτήσεις ως προς τη *L.monocytogenes* όσον αφορά τον κιμά που πρόκειται να υποβληθεί σε θερμική επεξεργασία. Αυτό φυσικά δεν ισχύει για τον κιμά ο οποίος πρόκειται να καταναλωθεί ωμός, μία διατροφική συνήθεια ιδιαίτερα διαδεδομένη σε χώρες της Βόρειας Ευρώπης.

Κατά τη παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε εργαστηριακός έλεγχος για τη παρουσία *L.monocytogenes* σε ωμό κιμά ώστε να διαπιστωθεί η πιθανή παρουσία ενός ευρέως διαδεδομένου μικροοργανισμού, ώστε να εξαχθούν συμπεράσματα για την απαίτηση θερμικής επεξεργασίας του, για πιθανούς παράγοντες που μπορεί να συμβάλλουν στη παρουσία του, για τους πιθανούς κινδύνους που μπορεί να προκύψουν 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.

Παράλληλα πραγματοποιήθηκε έλεγχος της αποτελεσματικότητας μίας νέας διαρκώς αυξανόμενης στη χρήση τεχνικής ανίχνευσης του μικροοργανισμού με σύγκριση των αποτελεσμάτων της με αυτά των εφαρμοζόμενων τεχνικών του προτύπου ISO 11290. Η τεχνική VIDAS (bioMerieux) βασίζεται στη χρήση του ανοσοφθορισμού για τον έλεγχο παρουσίας αντιγόνου ενός μικροοργανισμού σε ένα δείγμα, σε ένα αυτοματοποιημένο ανοσοαναλυτή πολλαπλών παραμέτρων.

Ακολουθεί η περιγραφή των εφαρμοζόμενων τεχνικών.

ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ *LISTERIA MONOCYTOGENES* ΚΑΤΑ ISO 11290

ΕΞΕΤΑΖΟΜΕΝΗ ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ, ΑΡΧΙΚΗ ΑΡΑΙΩΣΗ ΚΑΙ ΠΡΟΕΜΠΛΟΥΤΙΣΜΟΣ

Για την παρασκευή της αρχικής αραιώσης, χρησιμοποιείται ο ζωμός ½ Fraser.

Ζωμός ½ Fraser

Βάση:

- Meat peptone	5,0 g
- Sodium chloride (NaCl)	20,0 g
- Disodium hydrogen phosphate dihydrate (Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O)	12,0 g
- Potassium dihydrogen phosphate (KH ₂ PO ₄)	1,35 g
- Tryptone	5,0 g
- Beef extract	5,0 g
- Yeast extract	5,0 g
- Aesculin	1,0 g
- Water	1000 ml

Διαλύουμε τα συστατικά στο νερό θερμαίνοντας ήπια. Ρυθμίζουμε το pH, ώστε μετά την αποστείρωση να είναι 7,2±0,2 στους 25°C και μοιράζουμε το υλικό μέσα σε γυάλινες φιάλες. Αποστειρώνουμε στους 121°C για 15'.

Διάλυμα Lithium chloride:

- Lithium chloride	3,0 g
- Water	10,0 ml

Διαλύουμε το lithium chloride στο νερό και αποστειρώνουμε με διήθηση με μικροβιοκρατείς ηθμούς.

Διάλυμα νατριούχου nalidixic acid:

- | | |
|---------------------------------|---------|
| - Sodium salt of nalidixic acid | 0,1 g |
| - Sodium hydroxide 0.05 M | 10,0 ml |

Διαλύουμε το nalidixic acid salt στο sodium hydroxide και αποστειρώνουμε με διήθηση με μικροβιοκρατείς ηθμούς.

Διάλυμα acriflavine hydrochloride:

- | | |
|-----------------------------|--------|
| - Acriflavine hydrochloride | 0,25 g |
| - Water | 100 ml |

Διαλύουμε την acriflavine hydrochloride στο νερό και αποστειρώνουμε με διήθηση με μικροβιοκρατείς ηθμούς.

Διάλυμα ammonium iron (III) citrate:

- | | |
|-------------------------------|--------|
| - Ammonium iron (III) citrate | 5,0 g |
| - Water | 100 ml |

Διαλύουμε το ammonium iron (III) citrate στο νερό και αποστειρώνουμε με διήθηση με μικροβιοκρατείς ηθμούς.

Ολοκληρωμένο υπόστρωμα:

- | | |
|---------------------------------|--------|
| - Βάση | 100 ml |
| - Lithium chloride solution | 1 ml |
| - Sodium salt of nalidixic acid | 0,1 ml |
| - Acriflavine hydrochloride | 0,5 ml |
| - Ammonium iron (III) citrate | 1 ml |

Αμέσως πριν την χρησιμοποίηση, προσθέτουμε τα τέσσερα διαλύματα σε 100 ml βάσης.

Γενικά, για την παρασκευή της αρχικής αραιώσης, προστίθενται 25 g εξεταζόμενης ποσότητας του δείγματος σε 225 ml υποστρώματος προ-εμπλουτισμού.

Η αρχική αραιώση επωάζεται στους $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ επί 24 ± 2 ώρες.

Κατά την επώαση του ζωμού $\frac{1}{2}$ Fraser, είναι δυνατόν να αναπτυχθεί μαύρος χρωματισμός.

ΕΚΛΕΚΤΙΚΟΣ ΕΜΠΛΟΥΤΙΣΜΟΣ

Μεταφέρονται 1 ml της καλλιέργειας προ-εμπλουτισμού (ανεξάρτητα χρώματος) σε δοκιμαστικό σωλήνα με 10 ml ζωμού Fraser.

Ζωμός Fraser

Το Fraser broth base διαφοροποιείται από το Half Fraser broth στο ότι η βάση περιέχει επιπλέον τα εξής (σε 1000 ml βάσης):

- | | |
|---------------------------------|--------|
| - Lithium chloride | 3,0 g |
| - Sodium salt of nalidixic acid | 0,02 g |

Ολοκληρωμένο υπόστρωμα

Σε κάθε 100 ml βάσης προσθέτουμε ποσότητα των διαλυμάτων:

- | | |
|--|--------|
| - Acriflavine hydrochloride solution | 1,0 ml |
| - Ammonium iron (III) citrate solution | 1,0 ml |

Μοιράζουμε 10 ml από το πλήρες υπόστρωμα σε αποστειρωμένους δοκιμαστικούς σωλήνες.

Ο ζωμός Fraser επωάζεται στους 37°C επί 48 ± 2 ώρες.

ΣΠΟΡΑ ΣΕ ΣΤΕΡΕΑ ΕΚΛΕΚΤΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ

Από την καλλιέργεια του ζωμού προ-εμπλουτισμού και ανεξάρτητα από το χρώμα του, ποσότητα ενός κρίκου σπείρεται στην επιφάνεια του πρώτου και του δεύτερου εκλεκτικού υποστρώματος (Oxford agar και ALOA agar), ώστε να ληφθούν καλά απομονωμένες αποικίες.

Από την καλλιέργεια του ζωμού εκλεκτικού εμπλουτισμού επαναλαμβάνεται η ίδια διαδικασία.

Oxford agar

Oxford agar βάση:

- Proteose peptone	23,0 g
- Starch	1,0 g
- Sodium chloride	5,0 g
- Agar	9,0-18,0 g
- Aesculin	1,0 g
- Ammonium iron (III) citrate	0,5 g
- Lithium chloride	15,0 g
- Water	1000 ml

Διαλύουμε τα συστατικά στο νερό θερμαίνοντας μέχρι βρασμού. Ρυθμίζουμε το pH ώστε μετά την αποστείρωση να είναι $7,0 \pm 0,2$ στους 25°C . Αποστειρώνουμε στους 121°C για 15'.

Πρόσθετο:

- Cycloheximide	400 mg
- Colistin sulfate	20 mg
- Acriflavine hydrochloride	5,0 mg
- Cefotetan	2,0 mg
- Fosfomycin	10,0 mg

- Ethanol	5,0 ml
- Water	5,0 ml

Παρασκευή πρόσθετου:

Αναμιγνύουμε την αιθανόλη με το νερό και στο μίγμα διαλύουμε τα υπόλοιπα συστατικά. Αποστειρώνουμε με διήθηση με μικροβιοκρατείς ηθμούς.

Ολοκλήρωση του υποστρώματος:

Ψύχουμε την Oxford agar βάση στους 47°C περίπου και σε 1.000 ml βάσης προσθέτουμε άσηπτα τα 5 ml του πρόσθετου. Μοιράζουμε σε τρυβλία.

ALOA agar

ALOA agar βάση:

- Meat Peptone	18,0 g
- Tryptone	6,0 g
- Yeast extract	10,0 g
- Sodium pyruvate	2,0 g
- Glucose	2,0 g
- Magnesium glycerophosphate	10,0 g
- Magnesium sulphate	0,5 g
- Sodium chloride	5,0 g
- Lithium chloride	10,0 g
- Disodium hydrogen phosphate anhydrous (Na ₂ HPO ₄)	2,5 g
- 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucopyranoside	0,05 g
- Agar, according to gelation-strength	12,0–18,0 g
- Water	930 ml

Διαλύουμε τα συστατικά στο νερό με θέρμανση μέχρι βρασμού και ρυθμίζουμε το pH ώστε μετά την αποστείρωση να είναι 7,2±0,2 στους 25°C. Αποστειρώνουμε στους 121°C για 15'.

Πρόσθετα υλικά:

Διάλυμα L- α -Phosphatidylinositol:

- L- α -Phosphatidylinositol (Sigma P 6636) 2 g
- Water 50 ml

Διαλύουμε την polymixin B sulfate στο νερό και αποστειρώνουμε στους 121°C για 15 λεπτά. Ψύχουμε στους 48-50°C.

Διάλυμα nalidixic acid:

- Nalidixic acid 0,02 g
- Water 5 ml

Διαλύουμε το nalidixic acid στο νερό και αποστειρώνουμε με διήθηση με μικροβιοκρατείς ηθμούς.

Διάλυμα ceftazidime:

- Ceftazimide 0,02 g
- Water 5 ml

Διαλύουμε την ceftazimide στο νερό και αποστειρώνουμε με διήθηση με μικροβιοκρατείς ηθμούς.

Διάλυμα polymyxin B:

- Polymyxin B 76.700 U
- Water 5 ml

Διαλύουμε την polymixin B στο νερό και αποστειρώνουμε με διήθηση με μικροβιοκρατείς ηθμούς.

Διάλυμα cycloheximide:

- Cycloheximide 0,05 g
- Water 2,5 ml

-Ethanol 2,5 ml

Διαλύουμε το cycloheximide στο μίγμα, αιθανόλη/νερό και αποστειρώνουμε με διήθηση με μικροβιοκρατείς ηθμούς.

Διάλυμα amphotericin B:

- Amphotericin B 0,01 g

- HCl 1 M 2,5 ml

- Dimethylformamide 7,5 ml

Διαλύουμε την amphotericin B στο μίγμα HCl/dimethylformamide και αποστειρώνουμε με διήθηση με μικροβιοκρατείς ηθμούς.

Σύνθεση:

- Βάση 930 ml

- L- α -Phosphatidylinositol 50 ml

- Nalidixic acid solution 5 ml

- Ceftazimide solution 5 ml

- Polymyxin B solution 5 ml

- Cycloheximide 5 ml

Ψύχουμε την βάση στους 47°C και προσθέτουμε άσηπτα τα διαλύματα. Μοιράζουμε σε τρυβλία.

Τα τρυβλία αναστρέφονται και τοποθετούνται σε επωαστικό κλίβανο θερμοκρασίας 37°C.

Μετά από επώαση 24 ωρών, ή και 48 ωρών (εάν η ανάπτυξη είναι μικρή, ή εάν δεν αναπτύχθηκαν αποικίες μετά από επώαση 24 ωρών), τα τρυβλία εξετάζονται για την παρουσία χαρακτηριστικών αποικιών λιστεριών:

Στο OXFORD agar: Οι χαρακτηριστικές αποικίες λιστεριών που αναπτύσσονται ύστερα από περίοδο επώασης 24 ωρών είναι μικρές (διαμέτρου 1 mm), φαιές, περιβαλλόμενες από μαύρη άλω. Μετά από επώαση 48 ωρών καθίστανται πιο σκούρες, πιθανόν με πρασινωπό επίχρισμα, διαμέτρου 2 mm περίπου, περιβαλλόμενες από μαύρη άλω και με καθίζηση του κέντρου τους.

Στο ALOA agar: Μετά από επώαση 24 ωρών, οι λιστέριες αναπτύσσουν μικρές ή πολύ μικρές αποικίες, χρώματος κυανοπράσινου, διαμέτρου 1,5-2 mm, και ειδικά η *L.monocytogenes* πάντα περιβάλλεται από αδιαφανή άλω, δίνοντας έτσι τη δυνατότητα διαφοροποίησής της. Αν δεν αναπτυχθούν τυπικές αποικίες εντός 24 ωρών, η επώαση συνεχίζεται για άλλες 18-24 ώρες και τα τρυβλία επανεξετάζονται.

ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ ΤΩΝ *LISTERIA* SPP.

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

Οι επιλεγμένες αποικίες σπείρονται στην επιφάνεια τρυβλίων με θρεπτικό άγαρ (TSYEA) το οποίο προηγουμένως είχε “στεγνώσει”, κατά τρόπο ώστε να ληφθούν καλά απομονωμένες αποικίες.

Tryptone soya yeast extract agar

- Tryptone soya broth. Περιέχει:	30,0 g
-Tryptone	17,0 g
- Soya peptone	3,0 g
- Sodium chloride	5,0 g
- Dipotassium phosphate (K_2HPO_4)	2,5 g
- Glucose	2,5 g
- Yeast extract	6,0 g
- Agar	15,0 g
- Water	1000 ml

Διαλύουμε τα συστατικά του υποστρώματος με θέρμανση μέχρι βρασμού. Το τελικό pH μετά την αποστείρωση πρέπει να είναι $7,3\pm 0,2$ στους $25^\circ C$. Αποστειρώνουμε στους $121^\circ C$ για 15'. Μετά την παρασκευή του, το αφήνουμε να κρυσώσει και το μοιράζουμε σε τρυβλία.

Τα ενοφθαλμισμένα τρυβλία επωάζονται σε θερμοκρασία 37°C επί 18-24 ώρες.

Οι χαρακτηριστικές αποικίες έχουν διάμετρο 1-2 mm, είναι κυρτές, άχρωμες και αδιαφανείς, με καλοσηματισμένα άκρα. Εάν μία αποικία δεν είναι καλά απομονωμένη, ανασπείρεται σε TSYEA.

Για την επιβεβαίωση και τη βιοχημική ταυτοποίηση, πρέπει να χρησιμοποιούνται καθαρές καλλιέργειες.

Εάν είναι αναγκαίο, είναι δυνατόν να εφαρμοσθεί η τεχνική του πλάγιου φωτισμού κατά Henry (παράρτημα Γ). Για να εφαρμοσθεί, είναι σημαντικό, το πάχος του θρεπτικού υποστρώματος να είναι λεπτό.

Αντίδραση καταλάσης

Λαμβάνεται μία μεμονωμένη αποικία από αυτές που αναπτύχθηκαν στα στερεά υποστρώματα και αραιώνεται σε μία σταγόνα διαλύματος υπεροξειδίου του υδρογόνου, πάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα. Η άμεση παραγωγή φυσαλίδων, είναι δείκτης θετικής αντίδρασης.

Χρώση κατά Gram

Η χρώση εκτελείται σε μία μεμονωμένη αποικία που αναπτύχθηκε στα στερεά υποστρώματα. Οι λιστέρειες είναι λεπτά Gram (+) βακτήρια, μικρού μήκους.

ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ ΤΗΣ *LISTERIA MONOCYTOGENES*

Δοκιμή αιμόλυσης

Εάν τα μορφολογικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά και η αντίδραση καταλάσης είναι ενδεικτικά των λιστεριών, ενοφθαλμίζεται στερεό αιματούχο υπόστρωμα με αίμα προβάτου, για την εξέταση της αιμολυτικής αντίδρασης.

Sheep blood agar

- Liver digest	2,5 g
- Yeast extract	5,0 g
- Sodium chloride	5,0 g

- Agar	9,0-18,0 g
- Water	1000 ml

Διαλύουμε τα συστατικά στο νερό μέχρι βρασμού και ρυθμίζουμε το pH ώστε μετά την αποστείρωση να είναι $7,2 \pm 0,2$ στους 25°C . Η αποστείρωση γίνεται στους 121°C για 15'.

Η ολοκλήρωση του υποστρώματος γίνεται προσθέτοντας σε 100 ml βάσης 5-7 ml απινιδωμένου αίματος προβάτου.

Η επιφάνεια του υποστρώματος στεγνώνεται καλά πριν από τη χρήση. Λαμβάνεται μία μεμονωμένη αποικία, που αναπτύχθηκε στα στερεά εκλεκτικά υποστρώματα και ενοφθαλμίζεται το υπόστρωμα, κεντώντας με ακίδα ενοφθαλμισμού. Ταυτόχρονα, ενοφθαλμίζονται θετικές (*L.monocytogenes*) και αρνητικές (*L.innocua*) καλλιέργειες - μάρτυρες.

Οι καλλιέργειες επωάζονται στους 37°C επί 24 ± 2 ώρες και εξετάζονται. Η *L.monocytogenes* επιδεικνύει στενές, καθαρές, φωτεινές ζώνες β-αιμόλυσης (η αιμόλυση γίνεται ορατή ευκολότερα, απομακρύνοντας την καλλιέργεια που αναπτύχθηκε στην επιφάνεια του υποστρώματος, γύρω από το σημείο ενοφθαλμισμού). Η *L.innocua* δεν προκαλεί αιμόλυση γύρω από το σημείο της νύξης. Η *L.seeligeri* προκαλεί αδύναμη ζώνη αιμόλυσης. Η *L.ivanovii* συνήθως προκαλεί ευρείες, καθαρά περιγεγραμμένες ζώνες β-αιμόλυσης. Τα υποστρώματα εξετάζονται υπό ισχυρό φωτισμό, και συγκρίνονται με τους μάρτυρες.

Η αιμολυτική αντίδραση είναι επίσης δυνατόν να εξετασθεί με τη χρήση ερυθρών αιμοσφαιρίων προβάτου. Η αποικία εναιωρείται σε 150 μl TSYEB και επωάζεται στους 37°C επί 2 ώρες. Προστίθενται 150 μl εναιωρήματος ερυθρών αιμοσφαιρίων προβάτου σε φυσιολογικό ορό σε αναλογία 2‰ (v/v). Επωάζεται στους 37°C επί 15 έως 60 λεπτά, ψύχεται στους $3 \pm 2^{\circ}\text{C}$ επί 2 ώρες και εξετάζεται για την ύπαρξη ή όχι αιμόλυσης. Εάν το αποτέλεσμα της αντίδρασης δεν είναι σαφές, η καλλιέργεια αφήνεται στους $3 \pm 2^{\circ}\text{C}$ μέχρι και επί 24 ώρες.

Δοκιμή CAMP

Η εφαρμογή της δοκιμής CAMP δεν είναι αναγκαία εφόσον χρησιμοποιείται API *Listeria*. Καθένα από τα στελέχη των *Staphylococcus aureus* και *Rhodococcus equi* ενοφθαλμίζονται σε μονές παράλληλες γραμμές σε στερεό αιματούχο υπόστρωμα με αίμα προβάτου, όπως φαίνεται στο παράρτημα Β'. Η γραμμή ενοφθαλμισμού πρέπει να είναι λεπτή και σταθερή, γεγονός που είναι δυνατόν να επιτευχθεί χρησιμοποιώντας κεκαμμένη ακίδα ενοφθαλμισμού ή κρίκο, κάθετα προς το υπόστρωμα.

Τα εξεταζόμενα στελέχη ενοφθαλμίζονται με όμοιο τρόπο και σε γραμμές ενοφθαλμισμού κάθετες ως προς αυτές των *S.aureus* και *R.equi*, των οποίων τα άκρα

απέχουν από αυτές 1-2 mm (παράρτημα Β'). Στο ίδιο τρυβλίο είναι δυνατόν να δοκιμασθούν αρκετά στελέχη.

Ταυτόχρονα, ενοφθαλμίζονται στελέχη μάρτυρες, δηλαδή στελέχη *L.monocytogenes*, *L.innocua* και *L.ivanovii*. Εάν χρησιμοποιείται αιματούχο άγαρ, επωάζονται στους 37°C επί 18-24 ώρες.

Διεύρυνση της ζώνης β-αιμόλυσης στις περιοχές γειτνίασης των καλλιεργειών των λιστεριών με αυτές των *S.aureus* και *R.equi*, υποδηλώνει θετική αντίδραση.

Η θετική αντίδραση με τον *R.equi* εμφανίζεται ως ευρεία περιοχή αιμόλυσης (5-10 mm), σχήματος “κεφαλής βέλους”. Εάν η αιμόλυση είναι ασθενής και εκτείνεται σε περιοχή μόνο 1 mm, η αντίδραση θεωρείται αρνητική.

Η θετική αντίδραση με τον *S.aureus* εμφανίζεται ως μικρή ζώνη αυξημένης αιμόλυσης, η οποία εκτείνεται μόνο μέχρι 2 mm από τη γραμμή ενοφθαλμισμού του δοκιμαζόμενου στελέχους, μέσα στην περιοχή ασθενούς αιμόλυσης που προκαλεί η καλλιέργεια του *S.aureus*. Ευρείες περιοχές αιμόλυσης στη γειτνίαση της *L.monocytogenes* και του *S.aureus*, δεν συμβαίνουν.

Συστοιχία βιοχημικών δοκιμών (API *Listeria* του Οίκου bioMerieux)

Χρησιμοποιείται σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Ερμηνεία των μορφολογικών, φυσιολογικών και βιοχημικών χαρακτηριστικών

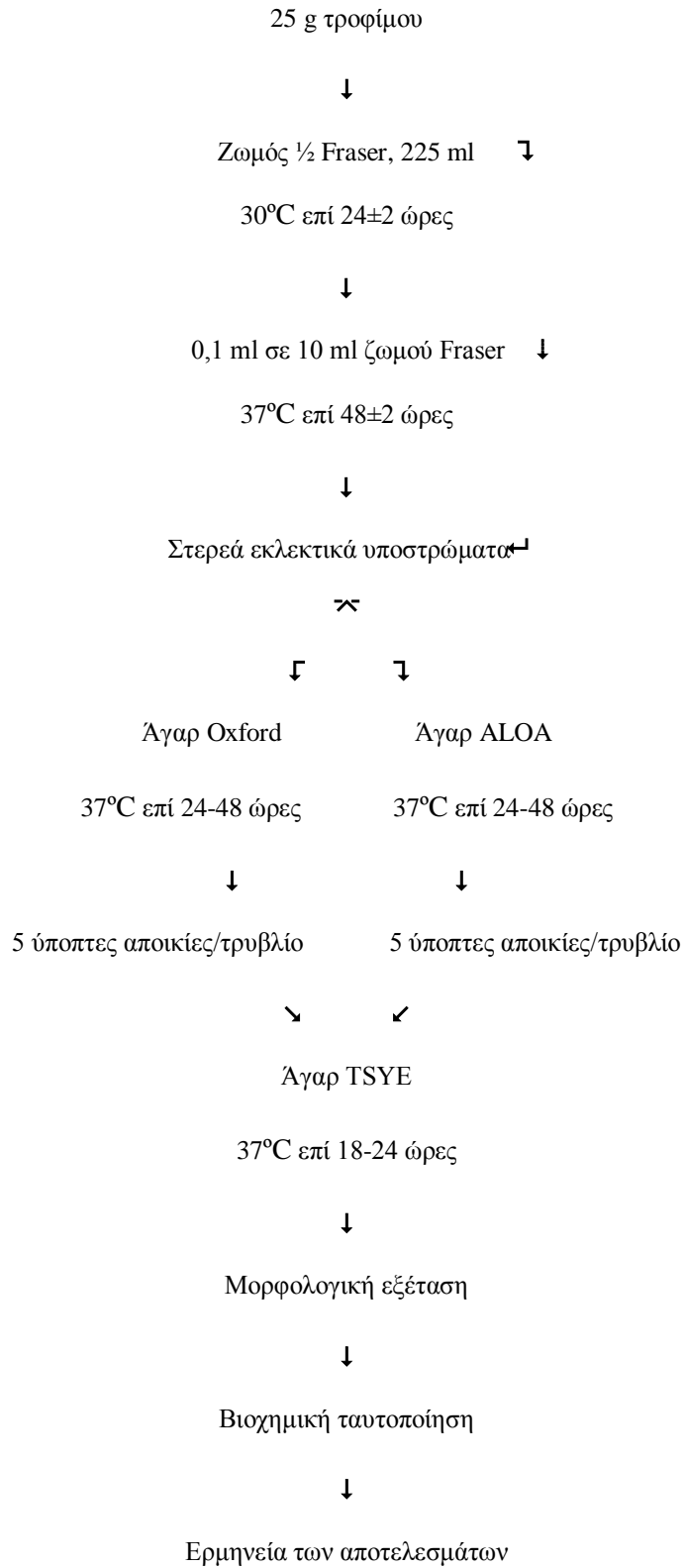
Τα είδη *Listeria* spp. είναι μικρά, Gram (+), καταλάση (+), κινητά βακτήρια.

Η *L.monocytogenes* διαφοροποιείται από τα άλλα είδη με βάση τα χαρακτηριστικά που έχουν ήδη αναφερθεί στον Πίνακα 3.

Οριστική επιβεβαίωση

Στελέχη θεωρούμενα ως *L.monocytogenes*, είναι δυνατόν να σταλούν για οριστική ταυτοποίηση σε ένα αναγνωρισμένο Κέντρο Αναφοράς Λιστεριών, για ορολογικό, και εάν είναι δυνατόν, για γενετική τυποποίηση (lysogenic typing).

ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΤΩΝ ΛΙΣΤΕΡΙΩΝ ΑΠΟ ΤΟ ΚΡΕΑΣ ΚΑΙ ΤΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΤΟΥ



Διάγραμμα Δ. Ανίχνευση ειδών *Listeria* spp.

ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΕ ΤΕΧΝΙΚΗ VIDAS

Η τεχνολογία VIDAS (του Οίκου bioMérieux) αποτελεί μία ευρέως διαδεδομένη τεχνική εντόπισης της παρουσίας συγκεκριμένων παθογόνων σε διάφορου τύπους δειγμάτων και ιδιαίτερα τροφίμων. Η ταχύτητα λήψης αποτελεσμάτων την καθιερώνει ως μία σημαντική τεχνική μιας πρώτης κατατοπιστικής ανίχνευσης (screening) ενός μεγάλου αριθμού δειγμάτων, μειώνοντας σημαντικά το φόρτο εργασίας στους ελέγχους που απαιτούνται κυρίως στη βιομηχανία τροφίμων.

Η τεχνολογία βασίζεται στη χρήση ειδικών ταινιών (strips) οι οποίες φέρουν στην επιφάνειά τους αντισώματα ειδικά για το υπό διερεύνηση παθογόνο. Το αντίστοιχο αντιγόνο, εφόσον περιέχεται στο δείγμα, συλλαμβάνεται μετά την επαφή του με την επιφάνεια της ταινίας. Ακολουθεί ο σχηματισμός μιας συστοιχίας sandwich με τη προσθήκη δεύτερου αντισώματος ειδικού για το αντιγόνο, το οποίο φέρει και ειδικό χρωμογόνο ένζυμο (αλκαλική φωσφατάση). Η προσθήκη ειδικού φθορίζοντος υποστρώματος οδηγεί, μετά την επίδραση της αλκαλικής φωσφατάσης, στην αλλαγή χρώματος η οποία και ανιχνεύεται σε μήκος κύματος 450 nm.

Τα δημοσιευμένα αποτελέσματα της επικύρωσης της τεχνικής για τη χρησιμοποίησή της στην ανίχνευση της *L.monocytogenes* έχουν ήδη επιβεβαιώσει την ικανοποιητική της ευαισθησία και ειδικότητα και την σχεδόν απόλυτη συμφωνία της μεθόδου με τις επικυρωμένες κατά ISO μεθόδους καλλιέργειας (Silberiaegel και συν., 2004).

Ακολουθεί η περιγραφή της εφαρμοζόμενης τεχνικής.

ΕΞΕΤΑΖΟΜΕΝΗ ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ, ΑΡΧΙΚΗ ΑΡΑΙΩΣΗ ΚΑΙ ΠΡΟΕΜΠΛΟΥΤΙΣΜΟΣ.

Για την παρασκευή της αρχικής αραιώσης, χρησιμοποιείται ο ζωμός ½ Fraser (βλ. σελ. 39).

Γενικά, για την παρασκευή της αρχικής αραιώσης, προστίθενται 25 g εξεταζόμενης ποσότητας του δείγματος σε 225 ml υποστρώματος προ-εμπλουτισμού.

Η αρχική αραιώση επωάζεται στους 30±1°C επί 24±2 ώρες.

Κατά την επώαση του ζωμού ½ Fraser, είναι δυνατόν να αναπτυχθεί μαύρος χρωματισμός.

ΕΚΛΕΚΤΙΚΟΣ ΕΜΠΛΟΥΤΙΣΜΟΣ

Μεταφέρονται 0,1 ml της καλλιέργειας προ-εμπλουτισμού (ανεξάρτητα χρώματος) σε δοκιμαστικό σωλήνα με 10 ml ζωμού Fraser (βλ. σελ.41).

Ο ζωμός Fraser επωάζεται στους 37°C επί 24±2 ώρες.

ΕΦΑΡΜΟΓΗ VIDAS

Ποσότητα ίση με 500 μl της καλλιέργειας εμπλουτισμού τοποθετείται εντός της ειδικής ταινίας του VIDAS LMO2. Ακολουθεί η τοποθέτηση της ταινίας στον αυτοματοποιημένο ανοσοαναλυτή, ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή. Μετά από χρονικό διάστημα 70 λεπτών ο αναλυτής δίνει δύο τιμές φθορισμού: Μία τιμή φθορισμού υποβάθρου (T_u) και τη τιμή φθορισμού δείγματος (T_δ). Ένα δείγμα θεωρείται θετικό όταν ισχύει ότι $T_u/T_\delta \geq 0,05$, όπου $T = T_u/T_\delta$. Τα θετικά δείγματα υποβάλλονται σε επιβεβαίωση με τεχνικές αναφοράς (π.χ. καλλιέργεια κατά ISO).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ε΄

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Κατά το πειραματικό μέρος της παρούσας διπλωματικής εργασίας πραγματοποιήθηκε εργαστηριακή διερεύνηση 60 (εξήντα) δειγμάτων κιμά διαφόρων χαρακτηριστικών (βόειος – χοιρινός, νωπός - κατεψυγμένος, εισαγόμενος - εξαγόμενος, κτλ.) τα οποία συλλέχθηκαν από 30 (τριάντα) καταστήματα λιανικής πώλησης του προϊόντος (16 κρεοπωλεία, 14 σούπερ μάρκετ) εντός της πόλης της Λάρισας. Ο έλεγχος αφορούσε την καταμέτρηση της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας και στην ανίχνευση παρουσίας *Listeria monocytogenes* και *Salmonella* spp. Ο πίνακας 11 περιλαμβάνει τα συνολικά χαρακτηριστικά των δειγμάτων, ενώ στο πίνακα 12 καταγράφονται αναλυτικά τα στοιχεία των δειγμάτων.

Πίνακας 11. Συγκεντρωτικά στοιχεία δειγμάτων κιμά.

ΚΡΕΟΠΩΛΕΙΑ (N=16)	ΒΟΕΙΟΣ	ΕΛΛΗΝΙΚΟΣ	ΝΩΠΟΣ	15
			ΚΑΤΕΨΥΓΜΕΝΟΣ	0
		ΕΙΣΑΓΟΜΕΝΟΣ	ΝΩΠΟΣ	2
			ΚΑΤΕΨΥΓΜΕΝΟΣ	0
	ΧΟΙΡΙΝΟΣ	ΕΛΛΗΝΙΚΟΣ	ΝΩΠΟΣ	12
			ΚΑΤΕΨΥΓΜΕΝΟΣ	0
		ΕΙΣΑΓΟΜΕΝΟΣ	ΝΩΠΟΣ	0
			ΚΑΤΕΨΥΓΜΕΝΟΣ	0
ΣΟΥΠΕΡ ΜΑΡΚΕΤ (N=14)	ΒΟΕΙΟΣ	ΕΛΛΗΝΙΚΟΣ	ΝΩΠΟΣ	10
			ΚΑΤΕΨΥΓΜΕΝΟΣ	0
		ΕΙΣΑΓΟΜΕΝΟΣ	ΝΩΠΟΣ	2
			ΚΑΤΕΨΥΓΜΕΝΟΣ	3
	ΧΟΙΡΙΝΟΣ	ΕΛΛΗΝΙΚΟΣ	ΝΩΠΟΣ	13
			ΚΑΤΕΨΥΓΜΕΝΟΣ	0
		ΕΙΣΑΓΟΜΕΝΟΣ	ΝΩΠΟΣ	0
			ΚΑΤΕΨΥΓΜΕΝΟΣ	3
			ΣΥΝΟΛΟ	60

Πίνακας 12. Αναλυτικά στοιχεία δειγμάτων κιμά.

ΔΕΙΓΜΑ	ΤΥΠΟΣ ΚΙΜΑ	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ	ΣΥΝΤΗΡΗΣΗ	ΚΑΤΑΣΤΗΜΑ
Δ1	ΜΟΣΧΑΡΙΣΙΟΣ	ΕΙΣΑΓΟΜΕΝΟΣ	ΝΩΠΟΣ	ΚΡΕΟΠΩΛΕΙΟ 1
Δ2	ΜΟΣΧΑΡΙΣΙΟΣ	ΕΛΛΗΝΙΚΟΣ	ΝΩΠΟΣ	ΚΡΕΟΠΩΛΕΙΟ 1
Δ3	ΜΟΣΧΑΡΙΣΙΟΣ	ΕΛΛΗΝΙΚΟΣ	ΝΩΠΟΣ	ΚΡΕΟΠΩΛΕΙΟ 2
Δ4	ΧΟΙΡΙΝΟΣ	ΕΛΛΗΝΙΚΟΣ	ΝΩΠΟΣ	ΚΡΕΟΠΩΛΕΙΟ 3
Δ5	ΜΟΣΧΑΡΙΣΙΟΣ	ΕΛΛΗΝΙΚΟΣ	ΝΩΠΟΣ	ΚΡΕΟΠΩΛΕΙΟ 3
Δ6	ΜΟΣΧΑΡΙΣΙΟΣ	ΕΛΛΗΝΙΚΟΣ	ΝΩΠΟΣ	ΚΡΕΟΠΩΛΕΙΟ 4
Δ7	ΧΟΙΡΙΝΟΣ	ΕΛΛΗΝΙΚΟΣ	ΝΩΠΟΣ	ΚΡΕΟΠΩΛΕΙΟ 4
Δ8	ΜΟΣΧΑΡΙΣΙΟΣ	ΕΛΛΗΝΙΚΟΣ	ΝΩΠΟΣ	ΚΡΕΟΠΩΛΕΙΟ 5
Δ9	ΜΟΣΧΑΡΙΣΙΟΣ	ΕΛΛΗΝΙΚΟΣ	ΝΩΠΟΣ	ΚΡΕΟΠΩΛΕΙΟ 6
Δ10	ΜΟΣΧΑΡΙΣΙΟΣ	ΕΛΛΗΝΙΚΟΣ	ΝΩΠΟΣ	ΚΡΕΟΠΩΛΕΙΟ 7
Δ11	ΧΟΙΡΙΝΟΣ	ΕΛΛΗΝΙΚΟΣ	ΝΩΠΟΣ	ΚΡΕΟΠΩΛΕΙΟ 6
Δ12	ΧΟΙΡΙΝΟΣ	ΕΛΛΗΝΙΚΟΣ	ΝΩΠΟΣ	ΚΡΕΟΠΩΛΕΙΟ 7
Δ13	ΧΟΙΡΙΝΟΣ	ΕΛΛΗΝΙΚΟΣ	ΝΩΠΟΣ	ΚΡΕΟΠΩΛΕΙΟ 8
Δ14	ΜΟΣΧΑΡΙΣΙΟΣ	ΕΛΛΗΝΙΚΟΣ	ΝΩΠΟΣ	ΚΡΕΟΠΩΛΕΙΟ 8
Δ15	ΜΟΣΧΑΡΙΣΙΟΣ	ΕΛΛΗΝΙΚΟΣ	ΝΩΠΟΣ	ΚΡΕΟΠΩΛΕΙΟ 9
Δ16	ΧΟΙΡΙΝΟΣ	ΕΛΛΗΝΙΚΟΣ	ΝΩΠΟΣ	ΚΡΕΟΠΩΛΕΙΟ 10
Δ17	ΜΟΣΧΑΡΙΣΙΟΣ	ΕΛΛΗΝΙΚΟΣ	ΝΩΠΟΣ	ΚΡΕΟΠΩΛΕΙΟ 10
Δ18	ΧΟΙΡΙΝΟΣ	ΕΛΛΗΝΙΚΟΣ	ΝΩΠΟΣ	ΚΡΕΟΠΩΛΕΙΟ 11
Δ19	ΜΟΣΧΑΡΙΣΙΟΣ	ΕΙΣΑΓΟΜΕΝΟΣ	ΝΩΠΟΣ	ΚΡΕΟΠΩΛΕΙΟ 11
Δ20	ΜΟΣΧΑΡΙΣΙΟΣ	ΕΛΛΗΝΙΚΟΣ	ΝΩΠΟΣ	ΚΡΕΟΠΩΛΕΙΟ 12
Δ21	ΧΟΙΡΙΝΟΣ	ΕΛΛΗΝΙΚΟΣ	ΝΩΠΟΣ	ΚΡΕΟΠΩΛΕΙΟ 12
Δ22	ΧΟΙΡΙΝΟΣ	ΕΛΛΗΝΙΚΟΣ	ΝΩΠΟΣ	ΣΟΥΠΕΡ ΜΑΡΚΕΤ 1
Δ23	ΜΟΣΧΑΡΙΣΙΟΣ	ΕΛΛΗΝΙΚΟΣ	ΝΩΠΟΣ	ΣΟΥΠΕΡ ΜΑΡΚΕΤ 1
Δ24	ΜΟΣΧΑΡΙΣΙΟΣ	ΕΛΛΗΝΙΚΟΣ	ΝΩΠΟΣ	ΣΟΥΠΕΡ ΜΑΡΚΕΤ 2
Δ25	ΧΟΙΡΙΝΟΣ	ΕΛΛΗΝΙΚΟΣ	ΝΩΠΟΣ	ΣΟΥΠΕΡ ΜΑΡΚΕΤ 2
Δ26	ΧΟΙΡΙΝΟΣ	ΕΛΛΗΝΙΚΟΣ	ΝΩΠΟΣ	ΣΟΥΠΕΡ ΜΑΡΚΕΤ 3
Δ27	ΧΟΙΡΙΝΟΣ	ΕΛΛΗΝΙΚΟΣ	ΝΩΠΟΣ	ΣΟΥΠΕΡ ΜΑΡΚΕΤ 4
Δ28	ΜΟΣΧΑΡΙΣΙΟΣ	ΕΛΛΗΝΙΚΟΣ	ΝΩΠΟΣ	ΣΟΥΠΕΡ ΜΑΡΚΕΤ 3
Δ29	ΧΟΙΡΙΝΟΣ	ΕΛΛΗΝΙΚΟΣ	ΝΩΠΟΣ	ΣΟΥΠΕΡ ΜΑΡΚΕΤ 4
Δ30	ΧΟΙΡΙΝΟΣ	ΕΛΛΗΝΙΚΟΣ	ΝΩΠΟΣ	ΣΟΥΠΕΡ ΜΑΡΚΕΤ 5
Δ31	ΜΟΣΧΑΡΙΣΙΟΣ	ΕΛΛΗΝΙΚΟΣ	ΝΩΠΟΣ	ΣΟΥΠΕΡ ΜΑΡΚΕΤ 5
Δ32	ΜΟΣΧΑΡΙΣΙΟΣ	ΕΛΛΗΝΙΚΟΣ	ΝΩΠΟΣ	ΣΟΥΠΕΡ ΜΑΡΚΕΤ 6
Δ33	ΧΟΙΡΙΝΟΣ	ΕΛΛΗΝΙΚΟΣ	ΝΩΠΟΣ	ΚΡΕΟΠΩΛΕΙΟ 13

Δ34	ΧΟΙΡΙΝΟΣ	ΕΛΛΗΝΙΚΟΣ	ΝΩΠΟΣ	ΚΡΕΟΠΩΛΕΙΟ 14
Δ35	ΜΟΣΧΑΡΙΣΙΟΣ	ΕΛΛΗΝΙΚΟΣ	ΝΩΠΟΣ	ΚΡΕΟΠΩΛΕΙΟ 13
Δ36	ΜΟΣΧΑΡΙΣΙΟΣ	ΕΛΛΗΝΙΚΟΣ	ΝΩΠΟΣ	ΚΡΕΟΠΩΛΕΙΟ 14
Δ37	ΜΟΣΧΑΡΙΣΙΟΣ	ΕΛΛΗΝΙΚΟΣ	ΝΩΠΟΣ	ΚΡΕΟΠΩΛΕΙΟ 15
Δ38	ΜΟΣΧΑΡΙΣΙΟΣ	ΕΛΛΗΝΙΚΟΣ	ΝΩΠΟΣ	ΚΡΕΟΠΩΛΕΙΟ 16
Δ39	ΧΟΙΡΙΝΟΣ	ΕΛΛΗΝΙΚΟΣ	ΝΩΠΟΣ	ΚΡΕΟΠΩΛΕΙΟ 15
Δ40	ΧΟΙΡΙΝΟΣ	ΕΛΛΗΝΙΚΟΣ	ΝΩΠΟΣ	ΚΡΕΟΠΩΛΕΙΟ 16
Δ41	ΧΟΙΡΙΝΟΣ	ΓΕΡΜΑΝΙΑ	ΚΑΤΕΨΥΓΜΕΝΟΣ	ΣΟΥΠΕΡ ΜΑΡΚΕΤ 7_1
Δ42	ΧΟΙΡΙΝΟΣ	ΓΕΡΜΑΝΙΑ	ΚΑΤΕΨΥΓΜΕΝΟΣ	ΣΟΥΠΕΡ ΜΑΡΚΕΤ 7_2
Δ43	ΧΟΙΡΙΝΟΣ	ΓΕΡΜΑΝΙΑ	ΚΑΤΕΨΥΓΜΕΝΟΣ	ΣΟΥΠΕΡ ΜΑΡΚΕΤ 7_3
Δ44	ΜΟΣΧΑΡΙΣΙΟΣ	ΓΕΡΜΑΝΙΑ	ΚΑΤΕΨΥΓΜΕΝΟΣ	ΣΟΥΠΕΡ ΜΑΡΚΕΤ 7_1
Δ45	ΜΟΣΧΑΡΙΣΙΟΣ	ΓΕΡΜΑΝΙΑ	ΚΑΤΕΨΥΓΜΕΝΟΣ	ΣΟΥΠΕΡ ΜΑΡΚΕΤ 7_2
Δ46	ΜΟΣΧΑΡΙΣΙΟΣ	ΓΕΡΜΑΝΙΑ	ΚΑΤΕΨΥΓΜΕΝΟΣ	ΣΟΥΠΕΡ ΜΑΡΚΕΤ 7_3
Δ47	ΧΟΙΡΙΝΟΣ	ΕΛΛΗΝΙΚΟΣ	ΝΩΠΟΣ	ΣΟΥΠΕΡ ΜΑΡΚΕΤ 8
Δ48	ΧΟΙΡΙΝΟΣ	ΕΛΛΗΝΙΚΟΣ	ΝΩΠΟΣ	ΣΟΥΠΕΡ ΜΑΡΚΕΤ 9
Δ49	ΜΟΣΧΑΡΙΣΙΟΣ	ΕΛΛΗΝΙΚΟΣ	ΝΩΠΟΣ	ΣΟΥΠΕΡ ΜΑΡΚΕΤ 8
Δ50	ΜΟΣΧΑΡΙΣΙΟΣ	ΕΛΛΗΝΙΚΟΣ	ΝΩΠΟΣ	ΣΟΥΠΕΡ ΜΑΡΚΕΤ 9
Δ51	ΧΟΙΡΙΝΟΣ	ΕΛΛΗΝΙΚΟΣ	ΝΩΠΟΣ	ΣΟΥΠΕΡ ΜΑΡΚΕΤ 10
Δ52	ΧΟΙΡΙΝΟΣ	ΕΛΛΗΝΙΚΟΣ	ΝΩΠΟΣ	ΣΟΥΠΕΡ ΜΑΡΚΕΤ 11
Δ53	ΜΟΣΧΑΡΙΣΙΟΣ	ΟΛΛΑΝΔΙΑΣ	ΝΩΠΟΣ	ΣΟΥΠΕΡ ΜΑΡΚΕΤ 10
Δ54	ΜΟΣΧΑΡΙΣΙΟΣ	ΟΛΛΑΝΔΙΑΣ	ΝΩΠΟΣ	ΣΟΥΠΕΡ ΜΑΡΚΕΤ 11
Δ55	ΜΟΣΧΑΡΙΣΙΟΣ	ΕΛΛΗΝΙΚΟΣ	ΝΩΠΟΣ	ΣΟΥΠΕΡ ΜΑΡΚΕΤ 12
Δ56	ΧΟΙΡΙΝΟΣ	ΕΛΛΗΝΙΚΟΣ	ΝΩΠΟΣ	ΣΟΥΠΕΡ ΜΑΡΚΕΤ 12
Δ57	ΧΟΙΡΙΝΟΣ	ΕΛΛΗΝΙΚΟΣ	ΝΩΠΟΣ	ΣΟΥΠΕΡ ΜΑΡΚΕΤ 13
Δ58	ΜΟΣΧΑΡΙΣΙΟΣ	ΕΛΛΗΝΙΚΟΣ	ΝΩΠΟΣ	ΣΟΥΠΕΡ ΜΑΡΚΕΤ 13
Δ59	ΜΟΣΧΑΡΙΣΙΟΣ	ΕΛΛΗΝΙΚΟΣ	ΝΩΠΟΣ	ΣΟΥΠΕΡ ΜΑΡΚΕΤ 14
Δ60	ΧΟΙΡΙΝΟΣ	ΕΛΛΗΝΙΚΟΣ	ΝΩΠΟΣ	ΣΟΥΠΕΡ ΜΑΡΚΕΤ 14

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΟΜΧ

Η μέτρηση των αερόβιων αποικιών αποτελεί κατά τους Ευρωπαϊκούς Κανονισμούς (2073/2005 και 1441/2007) ένα κριτήριο υγιεινής το οποίο δεν οδηγεί σε απόρριψη του τροφίμου παρά προτείνει τη λήψη μέτρων, σε περίπτωση μη κανονικών αποτελεσμάτων.

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.

Για τον εξορθολογισμό του κόστους της μελέτης, αποφασίστηκε ο έλεγχος ενός υποδείγματος ανά δείγμα κιμά, και όχι πέντε όπως απαιτούν οι Ευρωπαϊκοί κανονισμοί. 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 12 περιλαμβάνει τα αποτελέσματα των 60 δειγμάτων κιμά οργανωμένα κατά τα κυριότερα χαρακτηριστικά τους.

Στον πίνακα 13 περιλαμβάνονται όλα τα δείγματα και οι ακριβείς μετρήσεις των τρυβλίων ανά αραιώση καθώς και οι υπολογιζόμενες μετρήσεις OMX.

Πίνακας 13. Συγκεντρωτικά αποτελέσματα μέτρησης OMX. (((όχι σε περισσότερες από 2 σελίδες)))

ΚΡΕΟΠΩΛΕΙΑ (N=16)	ΒΟΕΙΟΣ	ΕΛΛΗΝΙΚΟΣ	ΝΩΠΟΣ	15	ΚΑΛΗ ΠΟΙΟΤΗΤΑ	5
					ΜΕΤΡΙΑ ΠΟΙΟΤΗΤΑ	6
					ΚΑΚΗ ΠΟΙΟΤΗΤΑ	4
			ΚΑΤΕΨΥΓΜΕΝΟΣ	0		
		ΕΙΣΑΓΟΜΕΝΟΣ	ΝΩΠΟΣ	2	ΚΑΛΗ ΠΟΙΟΤΗΤΑ	0
					ΜΕΤΡΙΑ ΠΟΙΟΤΗΤΑ	1
	ΚΑΚΗ ΠΟΙΟΤΗΤΑ				1	
		ΚΑΤΕΨΥΓΜΕΝΟΣ	0			
	ΧΟΙΡΙΝΟΣ	ΕΛΛΗΝΙΚΟΣ	ΝΩΠΟΣ	12	ΚΑΛΗ ΠΟΙΟΤΗΤΑ	2
					ΜΕΤΡΙΑ ΠΟΙΟΤΗΤΑ	5
					ΚΑΚΗ ΠΟΙΟΤΗΤΑ	5
			ΚΑΤΕΨΥΓΜΕΝΟΣ	0		
	ΕΙΣΑΓΟΜΕΝΟΣ	ΝΩΠΟΣ	0			

			ΚΑΤΕΨΥΓΜΕΝΟΣ	0		
ΣΟΥΠΕΡ ΜΑΡΚΕΤ (N=14)	ΒΟΕΙΟΣ	ΕΛΛΗΝΙΚΟΣ	ΝΩΠΙΟΣ	10	ΚΑΛΗ ΠΟΙΟΤΗΤΑ	1
					ΜΕΤΡΙΑ ΠΟΙΟΤΗΤΑ	2
					ΚΑΚΗ ΠΟΙΟΤΗΤΑ	7
			ΚΑΤΕΨΥΓΜΕΝΟΣ	0		
		ΕΙΣΑΓΟΜΕΝΟΣ	ΝΩΠΙΟΣ	2	ΚΑΛΗ ΠΟΙΟΤΗΤΑ	0
					ΜΕΤΡΙΑ ΠΟΙΟΤΗΤΑ	0
	ΚΑΚΗ ΠΟΙΟΤΗΤΑ				2	
		ΚΑΤΕΨΥΓΜΕΝΟΣ	3	ΚΑΛΗ ΠΟΙΟΤΗΤΑ	0	
				ΜΕΤΡΙΑ ΠΟΙΟΤΗΤΑ	0	
				ΚΑΚΗ ΠΟΙΟΤΗΤΑ	3	
	ΧΟΙΡΙΝΟΣ	ΕΛΛΗΝΙΚΟΣ	ΝΩΠΙΟΣ	13	ΚΑΛΗ ΠΟΙΟΤΗΤΑ	1
					ΜΕΤΡΙΑ ΠΟΙΟΤΗΤΑ	4
					ΚΑΚΗ ΠΟΙΟΤΗΤΑ	8
			ΚΑΤΕΨΥΓΜΕΝΟΣ	0		
ΕΙΣΑΓΟΜΕΝΟΣ		ΝΩΠΙΟΣ	0			
				ΚΑΛΗ ΠΟΙΟΤΗΤΑ	3	
	ΜΕΤΡΙΑ ΠΟΙΟΤΗΤΑ			0		
	ΚΑΤΕΨΥΓΜΕΝΟΣ	3	ΚΑΚΗ ΠΟΙΟΤΗΤΑ	0		
ΣΥΝΟΛΟ						60

Πίνακας 14. Αναλυτικά αποτελέσματα OMX.

ΔΕΙΓΜΑ	Αραίωση 10 ⁻⁶	Αραίωση 10 ⁻⁶	Αραίωση 10 ⁻⁵	Αραίωση 10 ⁻⁵	Αραίωση 10 ⁻⁴	Αραίωση 10 ⁻⁴	Αραίωση 10 ⁻³	Αραίωση 10 ⁻³	OMX (cfu/gr)
Δ1	4	5	37	43	412	392			4 X 10 ⁶
Δ2			8	5	41	35			4 X 10 ⁵
Δ3			6	2	51	31			4,1 X 10 ⁵
Δ4			9	11	58	31			5 X 10 ⁵
Δ5			12	10	118	96			1,1 X 10 ⁶
Δ6					82	26	152	149	1,9 X 10 ⁵
Δ7			11	12	123	103	843	944	1,1 X 10 ⁶
Δ8			9	12	90	125	720	647	1,1 X 10 ⁶
Δ9	13	17	162	141	1580	1354	8672	9253	1,5 X 10 ⁷
Δ10	15	21	176	223	743	2322			2 X 10 ⁷
Δ11	35	28	312	296	3864	3126	9880		3,1 X 10 ⁷
Δ12	17	15	181	165	1796	1583			1,7 X 10 ⁷
Δ13					17	8	75	105	9,3 X 10 ⁴
Δ14					9	19	138	157	1,5 X 10 ⁵
Δ15					8	11	86	98	9,2 X 10 ⁴
Δ16			8	10	91	80	1060	896	8,6 X 10 ⁵
Δ17			18	10	142	138	1472	1628	1,4 X 10 ⁶
Δ18	6	7	69	70	682	810	5044	211	6,9 X 10 ⁶
Δ19	22	23	219	220	2064	(-)	(-)	(-)	2,2 X 10 ⁷
Δ20			20	13	138	132	1212	1196	1,4 X 10 ⁶
Δ21	4	5	37	42	454	412	4832	4254	4 X 10 ⁶
Δ22	74	72	716	728					7,2 X 10 ⁷
Δ23			9	13	106	102			1,1 X 10 ⁶
Δ24	6	5	48	58	454	446			5,3 X 10 ⁶
Δ25	71	66	706	653					6,8 X 10 ⁷
Δ26	27	29	268	269	2484	3392			2,7 X 10 ⁷
Δ27			2	3	22	31			2,6 X 10 ⁵
Δ28	91	93	904	928	9132	9564			9,2 X 10 ⁷
Δ29			8	12	74	92			8,5 X 10 ⁵
Δ30	7	6	86	93					8,7 X 10 ⁶
Δ31	8	10	98	112					1 X 10 ⁷

Δ32			4	2	25	16			2,1 X 10 ⁵
Δ33	2	2	27	29	243	237			2,7 X 10 ⁶
Δ34	2	3	37	40					3,7 X 10 ⁶
Δ35	3	2	12	10	83	82			8,5 X 10 ⁵
Δ36			11	12	85	86			8,8 X 10 ⁵
Δ37	23	24	345	326					3,3 X 10 ⁷
Δ38	42	44	324	385					3,6 X 10 ⁷
Δ39	21	23	178	196					1,9 X 10 ⁷
Δ40	20	18	180	184					1,8 X 10 ⁷
Δ41		0	2	1	4	5			5,5 X 10 ⁴
Δ42		0	5	7	24	27			2,8 X 10 ⁵
Δ43			2	3	34	45			3,8 X 10 ⁵
Δ44	13	15	118	125					1,2 X 10 ⁷
Δ45	14	17	154	164					1,6 X 10 ⁷
Δ46	26	27	128	132					1,4 X 10 ⁷
Δ47	4	5	34	38	308	316			3,7 X 10 ⁶
Δ48	3	4	40	45	293	277			2,9 X 10 ⁶
Δ49	206	208	378	386	1840	1920			5,4 X 10 ⁷
Δ50	93	114	164	170	1287	1300			2,5 X 10 ⁷
Δ51	143	160							1,5 X 10 ⁸
Δ52	128	140							1,3 X 10 ⁸
Δ53	47	50	387	400					4 X 10 ⁷
Δ54	50	63	423	480					4,6 X 10 ⁷
Δ55	97	102	402	423					4,6 X 10 ⁷
Δ56	4	7	42	58					5,1 X 10 ⁶
Δ57	120	121							1,2 X 10 ⁸
Δ58	49	52	532	401					5 X 10 ⁷
Δ59			8	12	78	116			9,7 X 10 ⁵
Δ60			34	37	297	305			3,1 X 10 ⁶

Στο σύνολο των 60 δειγμάτων κιμά, μόλις τα 12 (20%) βρέθηκαν να είναι “καλής ποιότητας”. Δεκαοκτώ δείγματα (30%) βρέθηκαν να είναι «μέτριας ποιότητας» και τα υπόλοιπα 30 δείγματα (50%) βρέθηκαν να είναι «κακής ποιότητας». Επομένως, περισσότερα των δύο τρίτων βρέθηκαν εκτός των κανονικών ορίων ενώ τα μισά δείγματα θα θεωρούταν μη κανονικά χωρίς ανάγκη περαιτέρω ελέγχου άλλων υποδειγμάτων, αν οι απαιτήσεις του 1441/2007 εφαρμόζονταν σε κιμά λιανικής πωλήσεως ο οποίος δεν θα διατηρηθεί άνω των 24 ωρών.

Από τα αποτελέσματα παρατηρείται η μέτρηση της OMX να συσχετίζεται με το αν ο νωπός κιμάς προέρχεται από σούπερ μάρκετ ή κρεοπωλεία (Fisher exact test $P=0,045$) με αυτήν των δειγμάτων στα σούπερ μάρκετ να παρατηρείται ελαφρώς μεγαλύτερη των κρεοπωλείων.

Αντιθέτως δεν παρατηρείται συσχέτιση μεταξύ του τύπου του κιμά (χοιρινού ή μοσχαρίσιου) και της OMX (Fisher exact test $P=0,814$). Επίσης δεν παρουσιάστηκε συσχέτιση ανάμεσα στην OMX και την προέλευση (ελληνική και εισαγόμενη) των δειγμάτων κιμά (Fisher exact test $P=0,314$), πρέπει όμως εδώ να σημειωθεί ότι ήταν ιδιαίτερα δύσκολο να βρεθούν δείγματα εισαγόμενου κιμά ($n=10$) καθώς τα περισσότερα κρεοπωλεία-σούπερ μάρκετ δήλωσαν ότι δεν διαθέτουν παρά μόνο ελληνικό.

Κατεψυγμένος κιμάς βρέθηκε να διατίθεται μόνο από συγκεκριμένη αλυσίδα πολυεθνικού πολυκαταστήματος και ήταν εισαγόμενος από Γερμανία. Πραγματοποιήθηκαν τρεις δειγματοληψίες σε τρεις διαφορετικές ημερομηνίες (Δείγματα Δ41-Δ46, πίνακας 12), με τα αποτελέσματα να είναι όμοια: Ο χοιρινός κατεψυγμένος κιμάς παρουσίασε ανάπτυξη OMX εντός των προβλεπόμενων ορίων, ενώ αντίθετα ο μοσχαρίσιος κατεψυγμένος και στις τρεις περιπτώσεις παρουσίασε αποτελέσματα «κακής ποιότητας». Αξίζει να τονιστεί ότι σε αυτό τον τύπο κιμά, τα κριτήρια υγιεινής του ΕΚ 1441/2007 τίθενται σε ισχύ, επομένως είναι απαραίτητη στη προκειμένη περίπτωση η λήψη των προτεινόμενων μέτρων του κανονισμού.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΝΑΖΗΤΗΣΗΣ *SALMONELLA* SPP.

Η αναζήτηση *Salmonella* spp. πραγματοποιήθηκε σε όλα τα δείγματα σύμφωνα με τις απαιτήσεις του προτύπου ISO 6579, χρησιμοποιώντας τα προβλεπόμενα υλικά εμπλουτισμού και καλλιέργειας. Σε κανένα δείγμα δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη *Salmonella* spp.

Σε αρκετές περιπτώσεις παρατηρήθηκε ανάπτυξη αποικιών, με εικόνα παρόμοια αυτής της αναμενόμενης στη περίπτωση που ήταν *Salmonella*: Ιδιαίτερα η παρουσία αποικιών χρώματος κόκκινου ή ελαφρώς ροζ-λευκές και αδιαφανών με μαύρο κέντρο μπορεί να παρατηρηθεί στο υπόστρωμα XLD κατά την ανάπτυξη μικροοργανισμών των ειδών *Proteus* και *Pseudomonas* και να δημιουργήσει υποψία παρουσίας σαλμονελλών. Η επιβεβαίωση απαιτεί την εφαρμογή των απαραίτητων βιοχημικών δοκιμών.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΝΑΖΗΤΗΣΗΣ *LISTERIA MONOCYTOGENES*

Για τον εντοπισμό ειδών *Listeria* spp. και πιο συγκεκριμένα της *Listeria monocytogenes* εφαρμόστηκαν τόσο οι διαδικασίες του προτύπου ISO όσο και η τεχνική VIDAS με την χρήση των ειδικών strips LMO2 (bioMerieux).

Σε 22 (36,7%) από τα εξεταζόμενα δείγματα παρατηρήθηκε η ανάπτυξη ειδών *Listeria* spp. Σε 14 εξ αυτών επιβεβαιώθηκε βιοχημικά η παρουσία *Listeria monocytogenes*. Τα ποσοστά για το βόειο και το χοιρινό κιμά είναι 37,5% (12/32) *Listeria* spp., 25% (8/32) *Listeria monocytogenes*, και 35,7% (10/28) *Listeria* spp., 21,4% (6/28) *Listeria monocytogenes* αντίστοιχα. Στα υπόλοιπα 8 αναγνωρίστηκαν μόνο μη παθογόνα είδη *Listeria*: σε 6 περιπτώσεις *L.innocua* και σε 2 περιπτώσεις *L.welshimeri*.

Αξίζει να σημειωθεί η ακρίβεια των αποτελεσμάτων της τεχνικής VIDAS: η τεχνική αναγνώρισε τη παρουσία *L.monocytogenes* σε όλες τις περιπτώσεις όπου αυτή αναγνωρίστηκε κατά την εφαρμογή του προτύπου ISO 11290 ενώ σε άλλη μία αναγνώρισε τη παρουσία της, χωρίς όμως να επιβεβαιώνεται κατά την εφαρμογή του ISO,κατά το οποίο αναγνωρίστηκε η παρουσία μόνο *L. welshimeri*.

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων επέδειξε τα εξής χαρακτηριστικά: Δεν παρατηρήθηκε καμία συσχέτιση ανάμεσα στη «ποιότητα» του εξεταζόμενου κιμά και της παρουσίας η μη ειδών *Listeria* spp. (Fisher exact test $P=0.826$). Το ίδιο ανεξάρτητη παρατηρείται η παρουσία των ειδών *Listeria* spp. τόσο μεταξύ σούπερ μάρκετ-κρεοπωλείων ($\chi^2=0,039$ $df=1$ $P=0.844$) όσο και όσον αφορά το είδος του κιμά (βόειος, χοιρινός) ($\chi^2=0,021$ $df=1$ $P=0,886$) αλλά και τις συνθήκες διατήρησής του (Fisher's exact test $P=0,345$). Φαίνεται λοιπόν ότι η παρουσία των ειδών *Listeria* spp. στον ωμό κιμά είναι άσχετη των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών που μπορεί να προσδώσουν στο παραγόμενο κιμά η προέλευσή του, το είδος του ζώου ή ακόμη και οι συνθήκες συντήρησής του.

Ιδιαίτερα ενδιαφέροντα αποτελέσματα προκύπτουν αν περιορίσουμε την ανάλυσή μας στην ανεύρεση αποκλειστικά *L.monocytogenes*. Δεν φαίνεται να υπάρχει συσχέτιση ανάμεσα στη παρουσία ή όχι της *L.monocytogenes* και στο τύπο του κιμά ($\chi^2=0,744$ $df=1$ $P=0,744$) όπως και με τη «ποιότητα» του κιμά (Fisher's exact test $P=0,558$). Αντίθετα, όσον αφορά τις περιπτώσεις νωπού κιμά που μπορεί αγοραστεί τόσο από κρεοπωλεία όσο και από σούπερ μάρκετ, παρατηρείται μία τάση τα θετικά δείγματα *L.monocytogenes* να προέρχονται στις περισσότερες περιπτώσεις από σούπερ μάρκετ ($\chi^2=2,575$ $df=1$ $P=0,109$).

Στον πίνακα 15 περιλαμβάνονται αναλυτικά τα αποτελέσματα ανίχνευσης *Listeria* spp. για όλα τα δείγματα.

Πίνακας 15. Αναλυτικά αποτελέσματα ανίχνευσης *Listeria* spp.

ΔΕΙΓΜΑ	Tδ	Tυ	T	VIDAS LMO2 RESULT	API LIS CODE	API LIS RESULT
Δ1	-3	129	0	NEG		
Δ2	-4	131	0	NEG		
Δ3	-2	128	0	NEG		
Δ4	-4	131	0	NEG	7510	<i>L.innocua</i>
Δ5	-3	129	0	NEG		
Δ6	9	129	0	NEG	6711	<i>L.welshimeri</i>
Δ7	-2	126	0	NEG		
Δ8	-3	127	0	NEG	7510	<i>L.innocua</i>
Δ9	1	127	0	NEG		
Δ10	-4	130	0	NEG		
Δ11	58	127	0,01	NEG		
Δ12	61	130	0,01	NEG		
Δ13	83	131	0,02	NEG		
Δ14	199	130	0,05	POSITIVE	6710	<i>L.monocytogenes</i>
Δ15	215	127	0,06	POSITIVE	6710	<i>L.monocytogenes</i>
Δ16	6	125	0	NEG		
Δ17	-3	126	0	NEG		
Δ18	335	135	0,1	POSITIVE	6710	<i>L.monocytogenes</i>
Δ19	2051	137	0,61	POSITIVE	6710	<i>L.monocytogenes</i>
Δ20	3	149	0	NEG		
Δ21	1	141	0	NEG		
Δ22	708	138	0,2	POSITIVE	7711	<i>L.welshimeri</i>
Δ23	1	139	0	NEG		
Δ24	3809	136	1,1	POSITIVE	6510	<i>L.monocytogenes</i>
Δ25	1069	137	0,31	POSITIVE	2510	<i>L.monocytogenes</i>
Δ26	170	141	0,04	NEG		
Δ27	244	141	0,07	POSITIVE	6510	<i>L.monocytogenes</i>
Δ28	35	140	0,01	NEG		
Δ29	1345	142	0,39	POSITIVE	2510	<i>L.monocytogenes</i>
Δ30	3	140	0	NEG		
Δ31	-2	141	0	NEG		
Δ32	135	141	0	NEG		
Δ33	9	136	0	NEG	7510	<i>L.innocua</i>
Δ34	2	138	0	NEG	7510	<i>L.innocua</i>

Δ35	-1	138	0	NEG	7510	<i>L.innocua</i>
Δ36	2	139	0	NEG	7510	<i>L.innocua</i>
Δ37	4	151	0	NEG		
Δ38	1	121	0	NEG		
Δ39	3	162	0	NEG		
Δ40	2	139	0	NEG		
Δ41	-2	111	0	NEG		
Δ42	2	121	0	NEG		
Δ43	2	149	0	NEG		
Δ44	243	141	0,07	POSITIVE	6510	<i>L.monocytogenes</i>
Δ45	240	140	0,07	POSITIVE	6510	<i>L.monocytogenes</i>
Δ46	2	139	0	NEG		
Δ47	10154	78	2,88	POSITIVE	6510	<i>L.monocytogenes</i>
Δ48	11700	78	3,21	POSITIVE	6510	<i>L.monocytogenes</i>
Δ49	0	81		NEGATIVE		
Δ50	-1	82		NEGATIVE		
Δ51	1	95	0	NEG		
Δ52	2	121	0	NEG		
Δ53	524	89	0,14	POSITIVE	6510	<i>L.monocytogenes</i>
Δ54	443	84	0,11	POSITIVE	6510	<i>L.monocytogenes</i>
Δ55	-1	144	0	NEG		
Δ56	-3	155	0	NEG		
Δ57	1	131	0	NEG		
Δ58	3	111	0	NEG		
Δ59	4	151	0	NEG		
Δ60	-1	133	0	NEG		

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΣΤ'

ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

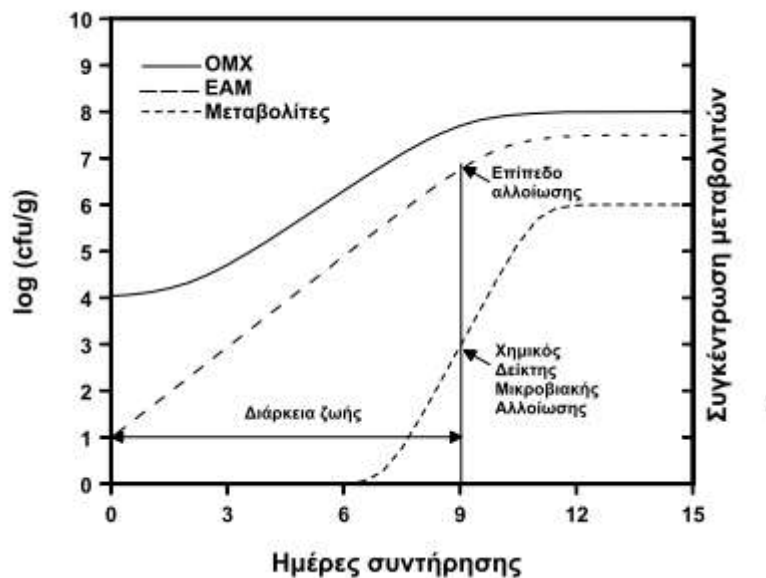
ΠΕΡΙ OMX

Η μικροβιακή κατάσταση του κρέατος, όπως υποδεικνύεται από τη μέτρηση της OMX, δεν αποτελεί κριτήριο ασφάλειας για ένα τρόφιμο αλλά ένα ενδεικτικό κριτήριο ποιότητας και υγιεινής. Αυτό συμβαίνει διότι η αλλοίωση δεν αποδίδεται σε όλους τους μικροοργανισμούς που αναπτύσσονται στο κρέας, αλλά σε ένα περιορισμένο μικροβιακό πληθυσμό ο οποίος και είναι γνωστός ως Εφήμεροι Αλλοιογόνοι Μικροοργανισμοί (ΕΑΜ). Η επικράτηση αυτών των μικροοργανισμών δεν είναι σίγουρη και προκαθορισμένη αλλά μια σειρά παραγόντων κατά τη σφαγή των ζώων, την μεταφορά και συντήρηση του κρέατος θα επηρεάσουν την πορεία τους (Nychas και συν. 2008). Οι μικροοργανισμοί που επικρατούν είναι αυτοί που διαθέτουν στρατηγικές με τις οποίες μπορούν να προσαρμοστούν καλύτερα στο μικροπεριβάλλον του τροφίμου. Τα είδη παραγόντων που επηρεάζουν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών μπορούν να διαχωριστούν σε 5 κατηγορίες (Nychas και Skandamis, 2005) (Πίνακας 14).

Πίνακας 14. Παράγοντες που επηρεάζουν τη μικροβιακή ανάπτυξη στο κρέας.

Ενδογενείς	Δομή του κρέατος: a_w, pH, αντιμικροβιακοί παράγοντες, οξειδοαναγωγικό δυναμικό, σύσταση θρεπτικών συστατικών.
Παράγοντες κατά την επεξεργασία	Επηρεάζουν τη βασική μικροβιακή κοινότητα του τροφίμου
Εξωγενείς	Θερμοκρασία, σχετική υγρασία και σύσταση της ατμόσφαιρας κατά τη διανομή και συντήρηση.
Ενδογενείς βιοτικοί παράγοντες	Ανταγωνισμός και συνεργισμός μεταξύ των βακτηρίων.
Συνεργιστικοί παράγοντες	Παράγοντες που, αλληλεπιδρώντας, καταλήγουν σε φαινόμενα εντονότερα από ότι εάν δρούσαν ο καθένας από μόνος του.

Από αυτά τα στοιχεία γίνεται εύκολα κατανοητό ότι οι EAM αποτελούν ένα διαφορετικό όρο από αυτό της OMX. Ο πληθυσμός των EAM αρχικά μπορεί να αποτελούν ένα μικρό κομμάτι της OMX, λόγω όμως ευνοϊκότερων συνθηκών καταφέρνουν να επικρατήσουν με αποτέλεσμα να παράγουν τους μεταβολίτες που είναι υπεύθυνοι για την αλλοίωση ενός τροφίμου. Στο διάγραμμα Ε παρατηρούμε τη μεταβολή της OMX και των EAM στο κρέας κατά τη διάρκεια αλλοίωσης (Gram and Huss, 1996).



Διάγραμμα Ε. Αλλαγές στην OMX και στους EAM κατά την αλλοίωση του κρέατος (Gram and Huss, 1996).

Είναι πια γνωστό ότι ένα εύρος Gram (-) βακτηρίων που ανήκουν σε διάφορα γένη και ιδιαίτερα σε αυτά των *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Psychrobacter* και *Moraxella* (με επικρατέστερο το πρώτο), αποτελούν μέρος της αλλοιογόνου μικροχλωρίδας για το κρέας το οποίο και συντηρείται αερόβια σε θερμοκρασίες ψύξης. Ιδιαίτερα είδη *Pseudomonas* όπως το *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas lundensis* και *Pseudomonas fluorescens* είναι τα σημαντικότερα. Τα βακτήρια αυτά μπορούν και αναπτύσσονται ταχύτατα και εκτοπίζουν τους υπόλοιπους μικροοργανισμούς. Ανάπτυξη ψευδομονάδων σε επίπεδα των 10^7 - 10^8 CFU/gr έχει συνδεθεί με εμφάνιση γλίτσας και δυσοσμίας. Εκτός από τους παραπάνω μικροοργανισμούς, είδη της οικογένειας Enterobacteriaceae (π.χ. *Enterobacter*, *Serratia* κτλ) αποτελούν μέρος της χλωρίδας κρέατος που συντηρείται υπό ψύξη, ωστόσο, ο μικρός ρυθμός ανάπτυξης των εντεροβακτηρίων σε χαμηλές θερμοκρασίες αποτρέπει συνήθως την επικράτησή τους (Gill και Newton, 1977). Τα βακτήρια αυτά αν και δεν συμμετέχουν ιδιαίτερα στην αλλοίωση του κρέατος, αποτελούν δείκτες υγιεινής του προϊόντος (Nychas και Skandamis, 2005).

Από τα παραπάνω γίνεται εύκολα κατανοητό ότι η ανεύρεση υψηλών τιμών OMX στα δείγματα κιμά που εξετάσαμε, δεν αποτελεί απόδειξη επικίνδυνου για τη δημόσια υγεία τροφίμου, αποτελεί όμως σίγουρα μια ισχυρή ένδειξη από τη μία οριακής συντήρησης

του κρέατος μέχρι το σημείο που πλησιάζει το σημείο αλλοίωσης ενώ παράλληλα τίθενται και ζητήματα τήρησης των απαιτούμενων κανόνων υγιεινής από τους χειριστές. Σε παρόμοια μελέτη που πραγματοποιήθηκε στη Γερμανία, η ανεύρεση της OMX κυμάνθηκε σε τιμές από $2,7 \times 10^3$ - $9,3 \times 10^6$ CFU/gr (Klein και συν., 1998) σημαντικά χαμηλότερες από τις τιμές που ανευρέθηκαν στην παρούσα εργασία ($5,5 \times 10^4$ - $1,5 \times 10^8$ CFU/gr). Σε αρκετές περιπτώσεις, κατά τη περαιτέρω εξέταση των αποικιών που αναπτύχθηκαν σε διάφορα υποστρώματα (ιδιαίτερα στα PCA, BGA και XLD) χρησιμοποιώντας συστοιχίες βιοχημικών δοκιμών ταυτοποίησης, οι οποίες διατίθενται στο εμπόριο και ειδικότερα το kit API 20E του Οίκου bioMerieux, επιβεβαιώσαμε την ανάπτυξη διαφόρων ειδών *Pseudomonas* αλλά και είδη Enterobacteriaceae όπως τη *Morganella morganii* και τον *Proteus mirabilis* επιβεβαιώνοντας τα παραπάνω όσον αφορά την φύση των μικροοργανισμών της OMX.

Μη αναμενόμενο φαντάζει το εύρημα της ελαφρώς χειρότερης κατάστασης που παρατηρήθηκε στα δείγματα προερχόμενα από σούπερ μάρκετ τα οποία θεωρούνται ότι τηρούν τυπικότερα τα κριτήρια υγιεινής απ' ότι τα παραδοσιακά κρεοπωλεία. Φαίνεται όμως ότι υπεισέρχονται παράγοντες που ίσως δε λαμβάνουμε αρκετά υπόψη όπως ίσως το μεγαλύτερο φόρτο εργασίας των σούπερ μάρκετ που τα οδηγεί στη προμήθεια μεγαλύτερης ποσότητας κρέατος από ένα συνοικιακό κρεοπωλείο και αναπόφευκτα στη μεγαλύτερη σε αρκετές περιπτώσεις διάρκεια συντήρησης αυτού. Επίσης θα πρέπει να μελετηθεί περαιτέρω κατά πόσο και άλλοι παράγοντες που χαρακτηρίζουν τη λειτουργία των σούπερ μάρκετ σε σχέση με ένα μικρό κρεοπωλείο όπως η ολοήμερη και συνεχής λειτουργία αλλά και η εναλλαγή των υπαλλήλων εντός της ημέρας μπορεί να επηρεάζουν αρνητικά θέματα τήρησης των κανόνων υγιεινής. Βέβαια για το σημείο αυτό απαιτείται μία διεξοδική και εκτενής μελέτη για να εξαχθούν απόλυτα ασφαλή συμπεράσματα.

Το βέβαιο είναι ότι τα αποτελέσματα μέτρησης της OMX σε δείγματα κιμά στη παρούσα εργασία θέτει προβληματισμούς όσον αφορά τη ποιότητα του προϊόντος που φτάνει στον καταναλωτή και επιδεικνύει την ανάγκη για πραγματοποίηση περισσότερων και διεξοδικότερων ελέγχων των επιχειρήσεων από τις αρμόδιες υπηρεσίες.

ΠΕΡΙ *SALMONELLA* SPP.

Τα αποτελέσματα των εργαστηριακών ελέγχων όσον αφορά την παρουσία σαλμονελλών στα δείγματα που εξετάστηκαν ήταν ικανοποιητικά καθώς κανένα από τα δείγματα δε βρέθηκε θετικό. Η συχνότερη αιτία μόλυνσης του κρέατος με σαλμονέλλες θεωρείται η επιμόλυνσή του από εντερικό περιεχόμενο η επιφανειακό μικροβιακό φορτίο κατά τη σφαγή (εκδορά και εκσπλαγχνισμό) του ζώου και η διατήρηση αυτής της επιμόλυνσης καθ' όλη την διαδικασία που ακολουθείται εντός των σφαγείων. Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε στην Ιρλανδία το 2002, τα φορτία σε OMX και *Salmonella* spp. αναγνωρίστηκαν σε χοίρους και στα παραγόμενα σφάγια καθ'όλα τα στάδια

επεξεργασίας τους στο χώρο του σφαγίου (Bolton και συν., 2002). Ένα ποσοστό 27% των ζώων βρέθηκαν θετικά στη παρουσία *Salmonella* spp. κατά την άφιξή τους στο σφαγείο. Παρόμοια ποσοστά βρέθηκαν σε παρόμοιες μελέτες και σε άλλα κράτη: Στις Κάτω Χώρες 30% (Berends και συν., 1998), στην Ολλανδία 21% (Oosterom και συν., 1985), στις ΗΠΑ 29% (Epling και συν., 1993). Μετά όμως από τα στάδια επεξεργασίας του σφάγιου και ιδιαίτερα μετά την αποτρίχωση, το καψάλισμα, τη πλύση του σφάγιου με ζεστό νερό μετά τον εκσπλαγχισμό και την απαρχή της ψυκτικής αλυσίδας, το ποσοστό παρουσίας *Salmonella* εκμηδενίζεται. Είναι επομένως εύκολα κατανοητό ότι σημαντικότατο ρόλο για τη παρουσία σαλμονελλών στο κρέας παίζει το επίπεδο λειτουργίας των σφαγείων μιας περιοχής-χώρας. Χαρακτηριστικό είναι ότι σε ευρείας κλίμακας μελέτη που πραγματοποιήθηκε στις ΗΠΑ για τη παρουσία σαλμονελλών σε κιμά το ποσοστό ανίχνευσης κυμάνθηκε στο 4,2% με 4136 εξεταζόμενα δείγματα (Bosilevac και συν., 2009). Αντίθετα στην Αιθιοπία, όπου το επίπεδο τήρησης κανόνων υγιεινής κατά τη σφαγή του ζώου και τον περαιτέρω χειρισμό του κρέατος είναι χαμηλότερο, το ποσοστό αυτό σε παρόμοια μελέτη ανήλθε στο 14,7% (Ejeta και συν., 2004).

Ο νομός Λάρισας, βασικός εκπρόσωπος της κτηνοτροφικής δραστηριότητας στη χώρα μας, διαθέτει τρία σύγχρονα βιομηχανικά σφαγεία τα οποία διαθέτουν τον κατάλληλο υλικοτεχνικό εξοπλισμό για την απαραίτητη επεξεργασία του σφάγιου και ειδικότερα την απαιτούμενη πλύση αυτού μετά τη διαδικασία του εκσπλαγχισμού. Η συντριπτική πλειοψηφία των δειγμάτων κιμά που μελετήθηκαν στη παρούσα εργασία προέρχονταν από νωπό κιμά ελληνικής και ειδικότερα τοπικής προέλευσης που προφανώς προέρχονταν από σφαγή ζώων σε κάποιο από τα σφαγεία του νομού. Αν και το δείγμα μας δεν είναι αρκετά μεγάλο ώστε να εξαχθούν βέβαια συμπεράσματα, η παντελής απουσία *Salmonella* spp. στα δείγματα κιμά, αποτελεί μια ενθαρρυντική ένδειξη για τη σωστή λειτουργία των τοπικών σφαγείων, και καταδεικνύει τη σημασία τήρησης των κανόνων Ορθής Πρακτικής καθ' όλη τη πορεία του ζώου από το στάβλο έως το πιάτο του καταναλωτή (“From the Stable to the Table”) ιδιαίτερα όσον αφορά αυτό το σημαντικό για τη δημόσια υγεία παθογόνο.

ΠΕΡΙ *LISTERIA MONOCYTOGENES*

Τα είδη του γένους *Listeria* spp. και ιδιαίτερα η *Listeria monocytogenes*, όπως προαναφέρθηκε, αποτελούν μικροοργανισμούς ευρέως διαδεδομένους στο περιβάλλον και έχουν απομονωθεί από πλήθος τροφίμων τόσο ζωικής όσο και φυτικής προέλευσης, τα οποία και μολύνονται από το μικροοργανισμό κυρίως περιβαλλοντικά. Η *L.monocytogenes* έχει ενοχοποιηθεί για αρκετές εξάρσεις κρουσμάτων τα τελευταία χρόνια, κάτι το οποίο μπορεί να δικαιολογηθεί τόσο από τη ευρύτατη παρουσία της στο περιβάλλον και στα ωμά τρόφιμα όσο και από την ιδιαίτερη ικανότητά της να πολλαπλασιάζεται ακόμα και στις συνθήκες ψύξης των τροφίμων. Η ελάχιστη μολύνουσα δόση δεν έχει οριστεί για τη *L.monocytogenes*, διάφορες όμως μελέτες έχουν

συνδυάσει κρούσματα λιστερίωσης με αυξημένους αριθμούς παρουσίας του παθογόνου στο υπεύθυνο τρόφιμο (Hitchins, 1996; McLauchlin, 1996). Κάτι τέτοιο έμμεσα επιβεβαιώνεται από την πολύ μεγάλη κατανομή του παθογόνου στη φύση σε αντιδιαστολή με τη μικρή σχετικά συχνότητα των κρουσμάτων λιστερίωσης.

Κατά την παρούσα εργασία, δείγματα ωμού, νωπού και κατεψυγμένου κιμά, ελέγχθησαν για τη παρουσία *L.monocytogenes*. Τα ποσοστά παρουσίας όπως προαναφέρθηκε, ήταν ιδιαίτερα υψηλά: 25% (8/32) σε δείγματα βόειου και 21,4% (6/28) σε δείγματα χοιρινού κιμά. Τα ποσοστά αυτά έρχονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της πλειοψηφίας παρόμοιων και ευρύτερων μελετών: Τα αντίστοιχα ποσοστά ήταν 34,9% για βόειο και χοιρινό ωμό κρέας στην Ισπανία (Vitas και Garcia-Jalon, 2004), 20,6% σε χοιρινό ωμό κρέας στην Ιαπωνία (Inoue και συν., 2000), 19,8% στις ΗΠΑ (Duffy και συν., 2001).

Φαίνεται λοιπόν ότι σε μεγάλο βαθμό η παρουσία Λιστεριών στο ωμό κρέας λόγω της «πανταχού παρούσας» και ανθεκτικής στο περιβάλλον φύσης του μικροοργανισμού είναι σχεδόν αναπόφευκτη. Θα πρέπει όμως να τονιστεί ότι η *Listeria monocytogenes* δε θεωρείται τυπικά ένα παθογόνο ενδιαφέροντος για το ωμό κρέας και τα ωμά παρασκευάσματά του. Χαρακτηριστικό είναι ότι οι νομικές απαιτήσεις όσον αφορά τη παρουσία του παθογόνου περιορίζονται στα έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα αποκλειστικά. Αυτό συμβαίνει κυρίως λόγω της θερμικής επεξεργασίας η οποία απαιτείται πριν τη κατανάλωση του ωμού κρέατος και η οποία έχει απόλυτη λιστεριοκτόνο δράση αν είναι ικανοποιητική (65°C στο κέντρο μάζας του τροφίμου).

Από την άλλη η παρουσία της *L.monocytogenes* σε τόσο μεγάλο βαθμό επιβάλλει τη τήρηση αυστηρών κανόνων υγιεινής κατά το χειρισμό του ωμού κρέατος. Είναι ξεκάθαρο ότι εγκυμονεί ο κίνδυνος της διασταυρούμενης επιμόλυνσης ενός έτοιμου προς κατανάλωση τροφίμου από τα συχνά φορτισμένα με λιστέριες ωμά προϊόντα ζωικής προέλευσης αν δε τηρούνται αυστηροί κανόνες διαχωρισμού τους στα ψυγεία συντήρησης αλλά και αυστηροί κανόνες υγιεινής κατά το χειρισμό τους. Ακόμη μεγαλύτερης σημασίας είναι ο χειρισμός αυτός να είναι ο απαιτούμενος όσον αφορά τρόφιμα των οποίων η κατανάλωση προορίζεται για ευαίσθητες ομάδες ατόμων, όπως εγκυμονούσες, ανοσοκατασταλαμένους και ηλικιωμένους. Τέλος, τα μεγάλα ποσοστά παρουσίας *L.monocytogenes* καθιστούν σχεδόν απαγορευτική την υιοθέτηση διατροφικών συνηθειών που έχουν να κάνουν με τη κατανάλωση ωμού κιμά, συνήθεια η οποία παρατηρείται τοπικά ιδιαίτερα σε χώρες της Ευρώπης όπως στη Γαλλία και στη Γερμανία (ταρτάρ) και αν αυτή πρέπει να γίνει, πρέπει να έχει να κάνει με απόλυτα φρέσκο κρέας και από άτομα που δεν ανήκουν σε ευαίσθητες ομάδες κινδύνου. Αντιθέτως, είναι πασιφανές ότι απαιτείται η επαρκής θερμική επεξεργασία των προϊόντων κιμά, ώστε να μην προκύπτουν κίνδυνοι νόσησης ιδιαίτερα για άτομα που ανήκουν στις ομάδες υψηλού κινδύνου, από τη κατανάλωση ατελώς μαγειρεμένου τροφίμου. Επιπρόσθετα νέες τεχνικές που στηρίζονται στη χρήση φυσικών προϊόντων π.χ. αιθέριων ελαίων μπορούν να καθιερωθούν κατά τη συντήρηση υπό ψύξη του κιμά, ώστε να εμποδίζεται η ανάπτυξη των λιστεριών κατά τη συντήρηση (Solomakos και συν., 2008)

Κατά την παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε παράλληλα και ο έλεγχος της απόδοσης της τεχνικής VIDAS όσον αφορά τον έλεγχο τροφίμων για τη παρουσία *L.monocytogenes*. Τα αποτελέσματα ήταν ιδιαίτερα ενθαρρυντικά: Μόλις ένα δείγμα ήταν αυτό στο οποίο η τεχνική VIDAS αναγνώρισε θετικό αποτέλεσμα το οποίο δεν επιβεβαιώθηκε από την εφαρμογή του προτύπου ISO. Αυτό θα μπορούσε να οφείλεται είτε στη σημαντική ανάπτυξη της υπόλοιπης μικροβιακής χλωρίδας οδηγώντας σε ψευδώς αρνητικό αποτέλεσμα στην εφαρμογή του κατά ISO προτύπου, είτε σε ένα ψευδώς θετικό αποτέλεσμα της τεχνικής VIDAS. Σε όλα τα υπόλοιπα δείγματα αναγνωρίστηκαν σωστά τόσο τα 14 θετικά σε *L.monocytogenes* όσο και τα υπόλοιπα 35 αρνητικά. Τα αποτελέσματα μας συμφωνούν με άλλες παρόμοιες μελέτες οι οποίες διερεύνησαν την αξιοπιστία της τεχνικής VIDAS LMO2 (Meyer και συν., 2011) και επιδεικνύουν την καταλληλότητα της χρήσης της ως ένα γρήγορο screening-out εργαλείο ρουτίνας για τα αρνητικά δείγματα *Listeria*, καθώς η τεχνική μπορεί να δώσει αποτελέσματα σε 48 ώρες, σε αντίθεση με το πρότυπο ISO το οποίο απαιτεί το λιγότερο πέντε ημέρες.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Παρά τη σημαντική επιστημονική και τεχνολογική πρόοδο που έχει λάβει χώρα τις τελευταίες δεκαετίες όσον αφορά την βελτίωση των συνθηκών υγιεινής κατά την επεξεργασία και συντήρηση των τροφίμων, τα τροφιμογενή νοσήματα παραμένουν ένα σημαντικό παγκόσμιο πρόβλημα που προκαλεί σημαντικές απώλειες σε ανθρώπινες ζωές αλλά και οικονομικές απώλειες και δυσφήμιση των εταιρειών. Ο κινδύος και τα προϊόντα του κατέχουν περίοπτη θέση στη λίστα των υπεύθυνων για κρούσματα τροφιμογενών νοσημάτων ενώ οι σαλμονελλώσεις και οι λιστεριώσεις, οι πρώτες λόγω της συχνότητάς εμφάνισής τους και οι δεύτερες λόγω της σοβαρότητας των συμπτωμάτων τους και μεγάλης θνητότητας, συνεχίζουν να αποτελούν σημαντικό κομμάτι του προβλήματος.

Κατά τη παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε ανασκόπηση των σημαντικών ιστορικών στιγμών αναγνώρισης αυτών των παθογόνων ως σημαντικών παραγόντων νόσησης του ανθρώπου, των βασικών φυσιολογικών, ανοσολογικών και επιδημιολογικών χαρακτηριστικών τους, αλλά και των πρόσφατων εξάρσεων κρουσμάτων για τις οποίες θεωρήθηκαν υπεύθυνοι. Έγινε έτσι κατανοητή η ανάγκη διαρκούς επαγρύπνησης και διερεύνησης της παρουσίας τους σε πλήθος τροφίμων, πόσο δε στον ευαίσθητο στις επιμολύνσεις κινδύος και τα προϊόντα του.

Κατά το πειραματικό μέρος παρουσιάστηκαν λεπτομερώς τα κύρια πρωτόκολλα ανίχνευσης των μικροοργανισμών που απαιτούνται από τους ευρωπαϊκούς κανονισμούς, και πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας αυτά, αλλά και σύγχρονες τεχνικές όπως η τεχνική VIDAS του Οίκου bioMérieux, και ο έλεγχος δειγμάτων κινδύος διαφόρων χαρακτηριστικών από καταστήματα λιανικής πώλησής του (σούπερ μάρκετ και κρεοπωλεία) ώστε να αναγνωριστεί η υπάρχουσα κατάσταση και πιθανοί παράγοντες

που την αιτιολογούν. Διαπιστώθηκε η εύρεση ιδιαίτερα αυξημένων τιμών OMX, με τάση αυτή να παρατηρείται σε μεγαλύτερο βαθμό σε κιμά αγοράς από σούπερ-μάρκετ. Το εύρημα αυτό θεωρείται ότι οφείλεται κατά κύριο λόγο στην μεγάλη σε διάρκεια συντήρηση του τροφίμου και κατά δεύτερο λόγο στην ελλιπή τήρηση κανόνων υγιεινής. Δε βρέθηκε να σχετίζεται με συγκεκριμένα χαρακτηριστικά του κιμά (αν είναι βόειος ή χοιρινός, ελληνικός ή εισαγόμενος κτλ.) επιδεικνύοντας πιθανότερα τα περιβαλλοντικά αίτια του ευρήματος. Ενθαρρυντική από την άλλη ήταν η παντελής απουσία *Salmonella* spp. επιδεικνύοντας σωστό χειρισμό του κρέατος ιδιαίτερα κατά την κατεργασία του στο σφαγείο, όπου και θεωρείται ότι συνήθως πραγματοποιείται η κύρια επιμόλυνσή του με σαλμονέλλες. Τέλος, επιβεβαιώθηκε η γνωστή από τη βιβλιογραφία συχνή παρουσία λιστεριών στο ωμό κρέας, κάτι που επιβάλλει συγκεκριμένους κανόνες χειρισμού και θερμικής επεξεργασίας του τροφίμου, ιδιαίτερα όταν προορίζεται προς κατανάλωση από άτομα των συγκεκριμένων ομάδων κινδύνου.

Εν κατακλείδι, η παρούσα εργασία προέβαλλε τη σημαντικότητα που έχει η οργάνωση τακτικών και συστηματικών προγραμμάτων εργαστηριακής και υγειονομικής επιτήρησης των τροφίμων και των καταστημάτων λιανικής πώλησής τους, από τις αρμόδιες υπηρεσίες και ιδιαίτερα όσον αφορά ευαίσθητα τρόφιμα, όπως το κρέας και τα προϊόντα του. Είναι επιτακτική ανάγκη να υπάρχει διαρκής ροή δεδομένων όσον αφορά την υπάρχουσα κατάσταση ώστε από τις αρμόδιες Αρχές να μπορούν να ληφθούν τα απαραίτητα μέτρα προς αποφυγή δυσάρεστων για τη δημόσια υγεία επιπτώσεων από τη μη τήρηση των υγειονομικών νομικών και κανονιστικών απαιτήσεων.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Πανούλης, Χ., Αμπραχίμ, Α., Θεοδωρίδης, Α., Γενηγιώργης, Κ., Καραϊωάννογλου, Π. “Διερεύνηση της παρουσίας των *Listeria spp.* σε σφάγια πτηνών κατά τα διάφορα στάδια της προετοιμασίας τους καθώς και σε έτοιμα σφάγια του εμπορίου”. 5^ο Πανελλήνιο Κτηνιατρικό Συνέδριο, Θεσσαλονίκη 22-25 Νοεμβρίου 1990. Περίληψη Πρακτικών Συνεδρίου σελ. 236-237.

Παπά, Α., Κανσουζίδου, Α., Καραμπαξόγλου, Δ., Δανηλίδης, ΒΔ. “Διασπορά της λιστέριας σε κοτόπουλα που καταναλώνονται σε Νοσοκομεία της Θεσσαλονίκης”. Δελτ Ελλην Μικροβιολ Εταιρ 1994; 39: 529-535.

Alpuche-Aranda, C.M., Racoosin, E.L., Swanson, J.A. and Miller, S.I. “*Salmonella stimulate macrophage macropinocytosis and persist within spacious phagosomes*”. J Exp Med. 1994;179(2):601-608.

Behravesh, C.B., Jones, T.F., Vugia, D.J., Long, C., Marcus, R., Smith, K., Thomas, S., Zansky, S., Fullerton, K.E., Henao, O.L., Scallan, E. and Group, F.W. “*Deaths Associated With Bacterial Pathogens Transmitted Commonly Through Food: Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet), 1996–2005*”. J Infect Dis. 2011;204(2):263-267.

Berends, B.R., Van Knapen, F., Mossel, D.A.A., Burt S.A. and Snijders, J.M.A. “*Impact on human health of Salmonella spp. on pork in the Netherlands and the anticipated effects of some currently proposed control strategies*”. Int. J. of Food Microbiology. 1998; 44, 219-229.

Bolton, D.J., Pearce, R.A., Sheridan J.J., Blair I.S., McDowell D.A. and Harrington D. “*Washing and chilling as critical control points in pork slaughter hazard analysis and critical control point (HACCP) systems*”. J Appl Microbiol. 2002;92:893-902.

Borucki, M.K., Krug, M.J., Muraoka, W.T. and Call, D.R. “*Discrimination among Listeria monocytogenes isolates using a mixed genome DNA microarray*”. Vet Microbiol. 2003;92(4):351-362.

Bosilevac, J.M., Guerini M.N., Kalchayanand N. and Koohmaraie M. “*Prevalence and characterization of salmonellae in commercial ground beef in the United States*”. Appl Environ Microbiol. 2009;75(7):1892-900.

Brandtzaeg, P. “*Overview of the mucosal immune system*”. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 1989;146:13–25.

Brenner, F.W., Villar, R.G., Angulo, F.J., Tauxe, R. and Swaminathan, B. “*Salmonella nomenclature*”. J Clin Microbiol. 2000;38(7):2465-7.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). “*Listeriosis: General Information*” 2011.

<http://www.cdc.gov/nczved/divisions/dfbmd/diseases/listeriosis/>

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). “*Outbreak of multidrug-resistant Salmonella newport-United States, January-April 2002*”. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2002;51(25):545-548.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). “*Salmonella Outbreaks*”. <http://www.cdc.gov/salmonella/outbreaks.html>

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). “*Salmonellosis – Outbreak Investigation, October 2006*”. http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/salmonellosis_2006/outbreak_notice.htm

CNN. “*21.7 million pounds of beef recalled, 29 September 2007*”. http://articles.cnn.com/2007-09-29/us/meat.recall_1_topps-meat-ground-beef-usda-mark?_s=PM:US

Data Food Networking (DEFNA). “*Red Meat consumption in Greece*”. <http://www.nut.uoa.gr/dafnesoftware/Main.aspx?type=trends>

de Valk, H., Jacquet, C., Goulet, V., Vaillant, V., Perra, A., Simon, F., Desenclos, J.C. and Martin, P. “*Surveillance of Listeria infections in Europe*”. *Euro Surveill.* 2005;10(10):251-255.

Doorduyn, Y., Hofhuis, A., de Jager, C., van der Zwaluw, W., Notermans, D. and van Pelt, W. “*Salmonella Typhimurium outbreaks in the Netherlands in 2008*”. *Euro Surveill.* 2008;13(44):pii: 19026.

Duffy, E.A., Belk, K.E., Sofos, J. N., Bellinger, G.R., Pape, A. and Smith G.C. “*Extent of microbial contamination in United States pork retail products*”. *J. Food Prot.* 2001;64:172–178.

Epling, L.K., Carpenter, J.A. and Blakenship, L.C. “*Prevalence of Campylobacter spp. & Salmonella spp. on pork carcasses and the reduction effected by spraying with lactic acid*”. *J Food Prot.* 1993;56(6):536–537.

Ejeta, G., Molla, B., Alemayehu, D. and Muckle, C.A. “*Salmonella serotypes isolated from minced meat beef, mutton and pork in Addis Ababa, Ethiopia*”. *Revue de Medecine Veterinaire.* 2004;155:547-551

Fiedler, F., and Ruhland, G.J. “*Structure of Listeria monocytogenes cell walls*”. *Bull. Inst. Pasteur.* 1987;85:287–300.

Francis, C.L., Starnbach, M.N. and Falkow, S. “*Morphological and cytoskeletal changes in epithelial cells occur immediately upon interaction with Salmonella typhimurium grown under low-oxygen conditions*”. *Mol Microbiol.* 1992;6(21):3077-3087.

Futagawa-Saito, K., Hiratsuka, S., Kamibeppu, M., Hirosawa, T., Oyabu, K. and Fukuyasu, T. “*Salmonella in healthy pigs: prevalence, serotype diversity and antimicrobial resistance observed during 1998-1999 and 2004-2005 in Japan*”. *Epidemiol Infect.* 2008;136(8):1118-23.

- Galan, J.E.** “Molecular genetic bases of *Salmonella* entry into host cells”. *Mol Microbiol.* 1996;20(2):263-271.
- Galyov, E.E., Wood, M.W., Rosqvist, R., Mullan, P.B., Watson, P.R., Hedges, S. and Wallis, T.S.** “A secreted effector protein of *Salmonella dublin* is translocated into eukaryotic cells and mediates inflammation and fluid secretion in infected ileal mucosa”. *Mol Microbiol.* 1997;25(5):903-912.
- Garcia-del Portillo, F., Foster, J.W. and Finlay, B.B.** “Role of acid tolerance response genes in *Salmonella typhimurium* virulence”. *Infect.Immun.*1993;61:4489–4492.
- Gill, C. O. and Newton, K. G..** “The development of aerobic spoilage flora on meat stored at chill temperatures”. *Meat Sci.* 1977;33:1284-1286.
- Gitter, M.** “*Listeria monocytogenes* in "oven-ready" poultry”. *Vet Rec.* 1976;99(17):336.
- Gram, L. and Huss, H.H.** “Microbiological spoilage of fish and fish products”. *Int J Food Microbiol.* 1996;33:121-137.
- Guillet, C., Join-Lambert, O., Le Monnier, A., Leclercq, A., Mechai, F., Mamzer-Bruneel, M.F., Bielecka, M.K., Scortti, M., Disson, O., Berche, P., Vazquez-Boland, J., Lortholary, O. and Lecuit, M.** “Human listeriosis caused by *Listeria ivanovii*”. *Emerg Infect Dis.* 2010 Jan;16(1):136-138.
- Hitchins, A.D.** “Assessment of alimentary exposure to *Listeria monocytogenes*”. *Int. J. Food Microbiol.* 1996;30:71– 85.
- Inoue, S., Nakama, A., Arai, Y., Kokubo, Y., Maruyama, T., Saito, A., Yoshida, T., Terao, M., Yamamoto, S. and Kumagai, S.** “Prevalence and contamination levels of *Listeria monocytogenes* in retail foods in Japan”. *Int. J. Food Microbiol.* 2000;59:73–77.
- Isakbaeva, E., Lindstedt, B.A., Schimmer, B., Vardund, T., Stavnes, T.L., Hauge, K., Gondrosen, B., Blystad, H., Klovstad, H., Aavitsland, P., Nygard, K. and Kapperud, G.** “*Salmonella Typhimurium* DT104 outbreak linked to imported minced beef, Norway, October-November 2005”. *Euro Surveill.* 2005;10(11):E051110 051111.
- Issekutz, T.B., Evans, J. and Bortolussi, R.** “The immune response of human neonates to *Listeria monocytogenes* infection”. *Clin Invest Med.* 1984;7(4):281-286.
- Jain, S., Bidol, S.A., Austin, J.L., Berl, E., Elson, F., Lemaile-Williams, M., Deasy, M., 3rd, Moll, M.E., Rea, V., Vojdani, J.D., Yu, P.A., Hoekstra, R.M., Braden, C.R. and Lynch, M.F.** “Multistate outbreak of *Salmonella Typhimurium* and Saintpaul infections associated with unpasteurized orange juice-United States, 2005”. *Clin Infect Dis.* 2009;48(8):1065-1071.

- Jay, M.J., Loessner, M.J. and Golden, D.A.** “*Modern Food Microbiology*”. 7 ed. United State: Springer Science & Business media, Inc. 2005; 619-650.
- Klein, G., Pack, A. and Reuter G.** “*Antibiotic resistance of Enterococci and Ocurrance of Vancomycin-Resistant Enterococci in Raw Minced Beef and Pork in Germany*”. *Appl Environ Microbiol.* 1998;64(5):1825-30.
- Lebrun, M., Loulergue, J., Chaslus-Dancla, E. and Audurier, A.** “*Plasmids in Listeria monocytogenes in relation to cadmium resistance*”. *Appl Environ Microbiol.* 1992;58(9):3183-3186.
- Matches, J.R. and Liston, J.** “*Low Temperature Growth of Salmonella*”. *J Food Sci.* 1968;33(6):641-645.
- McLauchlin, J.** “*The relationship between Listeria and Listeriosis*”. *Food Control* 1996;7:187–193.
- Meyer, C., Fredriksson-Ahomaa, M., Sperner, B. and Martlbauer, E.** “*Detection of Listeria monocytogenes in pork and beef using the VIDAS(R) LMO2 automated enzyme linked immunoassay method*”. *Meat Sci.* 2011;88(3):594-6.
- Michel, E. and Cossart, P.** “*Physical map of the Listeria monocytogenes chromosome*”. *J Bacteriol.* 1992;174(22):7098-7103.
- Monnet, P.** “*Listeriosis in a neonatal unit*”. In: M Woodbine, Editor, *Problems of listeriosis*, Leicester University Press, Sutton Bonington. 1975;188.
- Nychas, G.J.E., and Skandamis, P.N.** “*Fresh meat spoilage and modified atmosphere packaging*”. In: *Improving the Safety of Fresh Meat*, ed. Sofos J.N. 2005;pp. 461-502.
- Nychas, G.J.E., Skandamis, P.N., Tassou C.C. and Koutsoumanis K.P.** “*Meat spoilage during distribution*”. *Meat Sci.* 2008;78:77-89.
- Oldach, D.W., Richard, R.E., Borza, E.N. and Benitez, R.M.** “*A mysterious death*”. *New Engl J Med.* 1998;338(24):1764-9.
- Oosterom, J., Dekker, R., de Wilde, G.J.A., van Kempen-de Troye, F. and Engels, G.B.** “*Prevalence of Campylobacter jejuni and Salmonella during pig slaughtering*”. *Vet Quart.* 1985;7:31-34.
- Papa, A., Alexiou-Daniel, S., Danielidis, B.D. and Antoniadis, A.** “*Multiresistant strain of Listeria monocytogenes in Greece*”. *Clin Microbiol Infect.* 1996 Aug;2(1):64-65.
- Popoff, M.Y.** “*Antigenic Formulas of the Salmonella Serovars*”. 8th ed. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*, Institute Pasteur, Paris, France. 2001.

Poyart-Salmeron, C., Carlier, C., Trieu-Cuot, P., Courtieu, A.L. and Courvalin, P. “Transferable plasmid-mediated antibiotic resistance in *Listeria monocytogenes*”. Lancet. 1990 Jun 16;335(8703):1422-1426.

Prentice, G.A. and Neaves, P. “*The identification of Listeria species*”. Identification Methods in Applied and Environmental Microbiology. Blackwell Scientific Publ. 1992.

Quinn P.J., Carter M.E., Markey B.K. and Carter G.R. “*Enterobacteriaceae*”. In: Clinical Veterinary Microbiology. New York: Mosby, 1994;209-36.

Ralovich, B. “*Data for the properties of Listeria strains (a review)*”. Acta Microbiol Hung. 1992;39(2):105-132.

Schneider, J.L., White, P.L., Weiss, J., Norton, D., Lidgard, J., Gould, L.H., Yee, B., Vugia, D.J. and Mohle-Boetani, J. “*Multistate outbreak of multidrug-resistant salmonella newport infections associated with ground beef, October to December 2007*”. J Food Prot. 2011;74(8):1315-1319.

Seeliger, H.P.R. Listeriosis. Hafner Publishing Co. 1961.

Seeliger, H.P.R. and Jones, D. “*Listeria*”. Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology. 1986;2:1235-1245.

Silberlagel, K.M., Carver, C.N., Jechorek, R.P. and Johnson, R.L. “*Evaluation of VIDAS Listeria monocytogenes II (LMO2) immunoassay method for the detection of Listeria monocytogenes in foods: collaborative study*”. J AOAC Int. 2004;87(5):1123-1132.

Solomakos, N., Govaris. A., Koidis. P., Botsoglou. N. “*The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin, and their combination against Listeria monocytogenes in minced beef during refrigerated storage*”. Food microbiology. 2008;25(1):120-7.

Tappero, J.W., Schuchat, A., Deaver, K.A., Mascola, L. and Wenger, J.D. “*Reduction in the incidence of human listeriosis in the United States. Effectiveness of prevention efforts? The Listeriosis Study Group*”. JAMA. 1995;273(14):1118-1122.

Tilney, L.G., DeRosier, D.J. and Tilney, M.S. “*How Listeria exploits host cell actin to form its own cytoskeleton. I. Formation of a tail and how that tail might be involved in movement*”. J Cell Biol. 1992;118(1):71-81.

United States department of agriculture-animal plant health inspection service, veterinary service (USDA). “*National Animal Health Monitoring System Dairy '96*”. 1996.

United States Department of Agriculture (USDA). “*2008 Recall Release*”. http://www.fsis.usda.gov/PDF/Recall_005-2008_Release.pdf

United States Department of Agriculture (USDA). *Foodborne Illness Cost Calculator: Salmonella, 2010.* http://www.ers.usda.gov/data/foodborneillness/salm_Intro.asp

Vazquez-Torres, A., Jones-Carson, J., Baumler, A.J., Falkow, S., Valdivia, R., Brown, W., Le, M., Berggren, R., Parks, W.T. and Fang, F.C. “*Extraintestinal dissemination of Salmonella by CD18-expressing phagocytes*”. *Nature*. 1999;401(6755):804-808.

Vitas, A. I., and Garcia-Jalon V.A. “*Occurrence of Listeria monocytogenes in fresh and processed foods in Navarra (Spain)*”. *Int. J. Food Microbiol.* 2004;90:349–356.

World Health Organization (WHO). “*Salmonella Fact Sheet No 139, Revised April 2005*”.

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/en/>

World Health Organization (WHO). “*Food safety and foodborne illness Fact Sheet No 237, Reviewed March 2007*”.

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs237/en/>

Zunabovic, M., Domig, K.J. and Kneifel, W. “*Practical relevance of methodologies for detecting and tracing of Listeria monocytogenes in ready-to-eat foods and manufacture environments - A review*”. *Lwt-Food Sci Technol.* 2011;44(2):351-62