

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ, ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΥΓΕΙΑΣ, ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

**ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ
ΥΓΙΕΙΝΗ**

με κατεύθυνση:

**«ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΥΛΑΤΩΝ &
ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ»**

**«Διερεύνηση - ομαδοποίηση μικροοργανισμών απομονωμένων από
κρέας με ανάλυση υψηλής διακριτικής ικανότητας καμπυλών τήξης
(HRM)»**

Φαίδρα Συροπούλου

Γεωπόνος, Τεχνολόγος τροφίμων Α.Π.Θ.

2018

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ, ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΥΓΕΙΑΣ, ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

**ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ
ΥΓΙΕΙΝΗ**

με κατεύθυνση:

**«ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΥΛΑΤΩΝ &
ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ»**

**«Διερεύνηση - ομαδοποίηση μικροοργανισμών απομονωμένων από
κρέας με ανάλυση υψηλής διακριτικής ικανότητας καμπυλών τήξης
(HRM)»**

Φαίδρα Συροπούλου

Γεωπόνος, Τεχνολόγος τροφίμων Α.Π.Θ.

2018

Τριμελής εξεταστική επιτροπή

Ιωάννης Σ. Μποζιάρης, Αναπληρωτής Καθηγητής Π.Θ., **Επιβλέπων**

Χρήστος Χατζηχριστοδούλου, Καθηγητής Π.Θ., **Μέλος**

Παναγιώτης Μαδέσης, Κύριος Ερευνητής, Ινστιτούτο Εφαρμοσμένων Βιοεπιστημών –ΕΚΕΤΑ, **Μέλος**

«Διερεύνηση - ομαδοποίηση μικροοργανισμών απομονωμένων από κρέας με ανάλυση υψηλής διακριτικής ικανότητας καμπυλών τήξης (HRM)»

Σημαντικοί όροι: ανάλυση υψηλής διακριτικής ικανότητας καμπυλών τήξης, HRM, χοιρινός κιμάς, διερεύνηση παθογόνων μικροοργανισμών, διερεύνηση αλλοιωγόνων μικροοργανισμών

Περίληψη

Η ανάλυση υψηλής διακριτικής ικανότητας καμπυλών τήξης (High Resolution Melting analysis, HRM) δίνει χαρακτηριστικό προφίλ για κάθε δείγμα DNA που αναλύει επιτρέποντας την διάκριση σε επίπεδο είδους μικροοργανισμού. Σκοπός της μελέτης αυτής ήταν η χρήση της ανάλυσης HRM για την διερεύνηση των ειδών των μικροοργανισμών που αναπτύχθηκαν σε χοιρινό κιμά κατά την διάρκεια συντήρησής του. Η μέθοδος της ανάλυσης HRM είναι απλή, οικονομική και πιο σύντομη σε σχέση με την κλασσική καλλιεργητική μέθοδο που χρησιμοποιείται κατά βάση για την διερεύνηση της μικροβιακής ποικιλότητας στα τρόφιμα. Προκειμένου να γίνει η διερεύνηση των ειδών των άγνωστων μικροοργανισμών χρησιμοποιήθηκαν πρότυπα αλλοιωγόνων και παθογόνων μικροοργανισμών που αναμένονταν να υπάρχουν στον χοιρινό κιμά κατά την διάρκεια συντήρησής του. Οι αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί που επικράτησαν ήταν των γενών *Psychrobacter* και *Pseudomonas*, ενώ ο παθογόνος μικροοργανισμός που επικράτησε ήταν ο *Yersinia enterocolitica*. Όσον αφορά την εξέλιξη της μεθόδου HRM, ο σωστός σχεδιασμός των εκκινητών και η βελτιστοποίηση των συνθηκών της PCR αποτελούν βασικά βήματα προς την επίτευξή της.

Abstract

High resolution melting analysis gives a typical profile for every single DNA sample, allowing the distinction of microorganisms on species level. The aim of the present study was the investigation of species of the microorganisms that grew on pork mince during its storage, using HRM analysis. The method of the HRM analysis is simple, cheap and lasts shorter time than the classic cultural method, which is mainly used for the investigation of microbial diversity in food. In order to investigate the species of the unknown microorganisms, spoilage and pathogen reference microorganisms were used. The dominant spoilage microorganisms were of the genus *Psychrobacter* and *Pseudomonas*, whereas the pathogen microorganism that prevailed was *Yersinia enterocolitica*. As far as the advancement of the HRM method is concerned, the proper primer design and the enhancement of the PCR conditions are crucial steps towards this achievement.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<u>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</u>	1
1. Κατανάλωση κρέατος	1
2. Περιβαλλοντική βιωσιμότητα και δημόσια υγεία	3
3. Μικροβιολογία κρέατος	5
3.1 Μικροβιολογική αλλοίωση	6
3.2 Μικροβιολογία κιμά	7
3.3 Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (OMX)	8
4. Αναδυόμενα παθογόνα	8
5. Νομοθεσία	9
6. Μη-καλλιεργητικές τεχνικές	11
7. Μοριακές τεχνικές για τον έλεγχο και προσδιορισμό μικροβιακής χλωρίδας	12
7.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	13
7.2 Real-time PCR	14
7.3 Ανάλυση υψηλής διακριτικής ικανότητας καμπυλών τήξης (High Resolution Melting analysis, HRM)	16
<u>ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ</u>	19
<u>ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</u>	21
1. Δειγματοληψία	21
2. Καλλιεργητική μέθοδος προσδιορισμού Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας	21
3. Καλλιεργητική μέθοδος προσδιορισμού E. coli/ Coliform	21
4. Υγρή ανακαλλιέργεια βακτηρίων	23
5. Απομόνωση DNA	24
6. Ανάλυση υψηλής διακριτικής ικανότητας καμπυλών τήξης (HRM, High Resolution Melting analysis)	25

<u>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ</u>	27
1. Αποτελέσματα μικροβιολογικής ανάλυσης	27
2. Αποτελέσματα ανάλυσης HRM	28
2.1 Κυριότεροι αλλοιωγόνι και παθογόνοι μικροοργανισμοί που ταυτοποιήθηκαν	31
2.1.1 Αλλοιωγόνι μικροοργανισμοί	31
2.1.2 Παθογόνοι μικροοργανισμοί	33
<u>ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</u>	41
<u>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</u>	43

ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Αριθμός χοίρων που παράγει την ίδια ποσότητα των διαφορετικών αποβλήτων με αυτήν που παράγουν 1000 άνθρωποι (πηγή : Fleming and Ford, “Human versus Animals - Comparison of Waste Properties”,2001).....	4
Πίνακας 2: Μικροβιολογικά κριτήρια που πρέπει να πληροί ο κιμάς.....	10
Πίνακας 3: Είδη αλλοιωγόνων και παθογόνων μικροοργανισμών που χρησιμοποιήθηκαν ως πρότυπα.....	22
Πίνακας 4: Πληθυσμοί βακτηρίων στα θρεπτικά υποστρώματα TSA και Harlequin για τις διαφορετικές ημέρες συντήρησης του χοιρινού κιμά.....	27
Πίνακας 5: Κορυφές τήξης (°C) των μικροοργανισμών προτύπων.....	40

ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 1: Ποσοστιαία κατανομή της παραγωγής χοιρινού κρέατος μεταξύ των χωρών της ΕΕ	2
Διάγραμμα 2: Καμπύλες τήξης των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών, πρότυπων και άγνωστων (μετά από κανονικοποίηση).....	28
Διάγραμμα 3: Κορυφές τήξης των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών, πρότυπων και άγνωστων.....	29
Διάγραμμα 4: Καμπύλες τήξης των παθογόνων μικροοργανισμών, πρότυπων και των άγνωστων (μετά από κανονικοποίηση).....	30
Διάγραμμα 5: Κορυφές τήξης των παθογόνων μικροοργανισμών, πρότυπων και άγνωστων.....	30
Διάγραμμα 6: Ποσοστιαία κατανομή των ειδών των βακτηρίων που ταυτοποιήθηκαν την μηδενική ημέρα συντήρησης.....	36
Διάγραμμα 7: Κατανομή των ειδών των βακτηρίων που ταυτοποιήθηκαν την δεύτερη ημέρα συντήρησης.....	37
Διάγραμμα 8: Κατανομή των ειδών των βακτηρίων που ταυτοποιήθηκαν την τέταρτη ημέρα συντήρησης.....	38

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς ευχαριστίες μου στον επιβλέποντα της διπλωματικής εργασίας, Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Ιωάννη Μποζιάρη για την ανάθεση του θέματος καθώς και για την πολύτιμη βοήθεια και υποστήριξη καθ' όλη την διάρκεια της διεκπεραίωσης αυτής της εργασίας.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Δρ. κ. Παναγιώτη Μαδέση για τις ουσιαστικές συμβουλές και υποδείξεις του, για την καθοδήγησή του καθ' όλη την διάρκεια της διεξαγωγής των πειραμάτων καθώς και για την φιλοξενία στο εργαστήριό του, στο Ινστιτούτο Βιοεπισημών του Εθνικού Κέντρου Έρευνας και Τεχνολογικής Ανάπτυξης (ΕΚΕΤΑ).

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την Μεταδιδάκτορα Φωτεινή Παρλαπάνη, για την συνεχή και άμεση βοήθεια και υποστήριξη τόσο στο πειραματικό μέρος της εργασίας όσο και κατά τη συγγραφή της.

Τέλος, ευχαριστώ την υποψήφια Διδάκτορα Ειρήνη Μποσμαλή και την Μεταδιδάκτορα Ευαγγελία Σταυρίδου για την ουσιαστική βοήθειά τους κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων, για το ενδιαφέρον και την υποστήριξή τους.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Κατανάλωση κρέατος

Από τις αρχές του 1970 μέχρι τα μέσα της δεκαετίας του 1990, ο όγκος του κρέατος που καταναλώνεται στις αναπτυσσόμενες χώρες αυξήθηκε τρεις φορές περισσότερο από όσο αυξήθηκε στις αναπτυγμένες χώρες. Η κατανάλωση κρέατος στον αναπτυσσόμενο κόσμο αυξήθηκε με ακόμη μεγαλύτερο ρυθμό στο δεύτερο μισό αυτής της περιόδου, με την Ασία να ηγείται.

Ξεκινώντας από μία μικρή βάση, οι αναπτυσσόμενες χώρες έχουν αρχίσει να φτάνουν τα επίπεδα κατανάλωσης του αναπτυγμένου κόσμου, όμως έχουν ακόμη απόσταση να καλύψουν, κυρίως λόγω του επιπέδου χαμηλού εισοδήματος. Οι άνθρωποι στις αναπτυγμένες χώρες λαμβάνουν σε μέσο όρο το 27% των θερμίδων τους και το 56% των πρωτεϊνών από τρόφιμα ζωικής προέλευσης. Οι μέσοι όροι για τις αναπτυσσόμενες χώρες είναι 11% και 26% αντίστοιχα. Η διαφορά στα επίπεδα κατανάλωσης δίνει μια ένδειξη για τις δραματικές αλλαγές που θα επέλθουν στην παγκόσμια παραγωγή τροφίμων καθώς ξεδιπλώνεται η επανάσταση της κτηνοτροφίας.

Η παραγωγή των τροφίμων ζωικής προέλευσης αυξήθηκε ραγδαία εκεί όπου αυξήθηκε και η κατανάλωση. Η συνολική παραγωγή κρέατος στις αναπτυσσόμενες χώρες αυξήθηκε κατά 5,4% το χρόνο, μεταξύ των αρχών της δεκαετίας του 1980 και της μέσης της δεκαετίας του 1990, περισσότερο από πέντε φορές του ρυθμού των αναπτυσσόμενων χωρών. Η κατά κεφαλή παραγωγή συμβάδισε με τον πληθυσμό στις περισσότερες αναπτυσσόμενες περιοχές, εκτός από την Υποσαχάρια Αφρική (για το κρέας) και την Δυτική Ασία/Βόρεια Αφρική (για το γάλα).

Το αν αυτές οι τάσεις στην κατανάλωση θα συνεχιστούν στο μέλλον είναι ένα ερώτημα που διερευνάται μέσω του παγκόσμιου μοντέλου τροφίμων του IFPRI, το οποίο περιλαμβάνει δεδομένα για 37 χώρες και ομάδες χωρών και 18 προϊόντα. Είναι γνωστό ως Διεθνές Μοντέλο για την Ανάλυση Πολιτικής της Γεωργικής Κατανάλωσης (International Model for Policy Analysis of Agricultural Consumption, IMPACT), το βασικό σενάριο του μοντέλου δείχνει ότι η κατανάλωση κρέατος και γάλακτος στις αναπτυσσόμενες χώρες θα αυξηθεί κατά 2,8% και 3,3% το χρόνο για το διάστημα 1990-2020. Οι αντίστοιχοι ρυθμοί αύξησης στον αναπτυγμένο κόσμο είναι 0,6% και 0,2% το χρόνο. Μέχρι το 2020, οι αναπτυσσόμενες χώρες θα καταναλώνουν 100 εκατομμύρια τόνους περισσότερο κρέας και 223 εκατομμύρια τόνους περισσότερο γάλα απ' ό τι το 1993, κάνοντας τις αυξήσεις των 18 εκατομμυρίων τόνων των αναπτυγμένων χωρών για κρέας και γάλα να φαίνονται ασήμαντες.

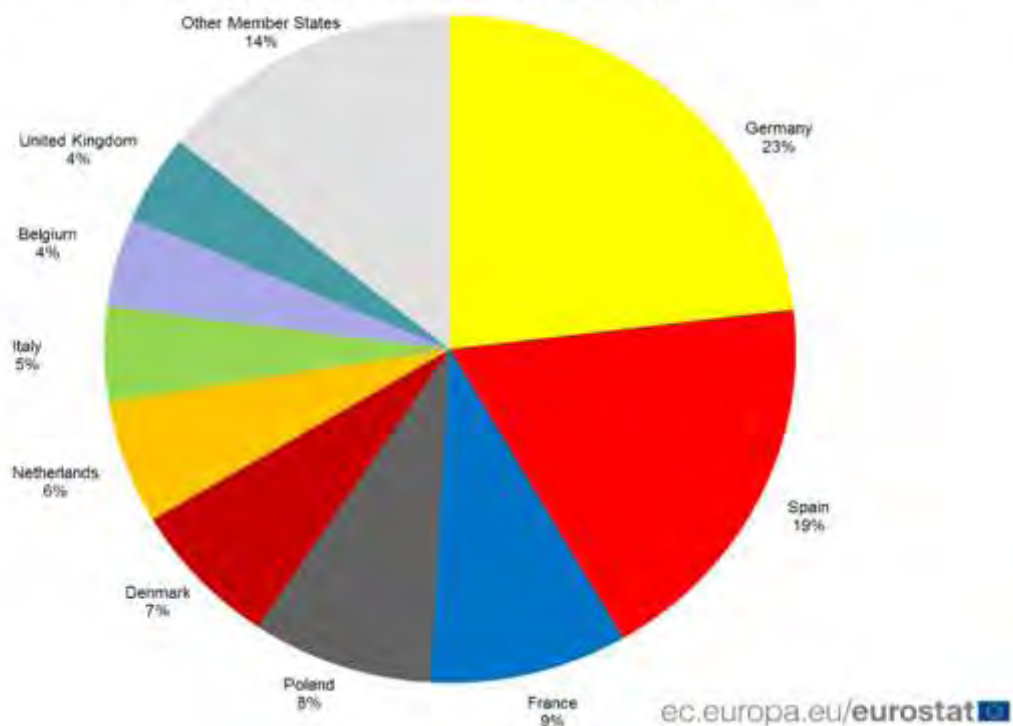
Οι ρυθμοί αύξησης για την παραγωγή κρέατος μέχρι το 2020 ακολουθούν και πάλι αυτούς της κατανάλωσης κρέατος πολύ στενά στις περισσότερες περιοχές. Η παραγωγή κρέατος θα αυξηθεί περίπου τέσσερις φορές πιο γρήγορα στις αναπτυσσόμενες χώρες σε σχέση με τις αναπτυγμένες. Μέχρι το 2020 οι αναπτυσσόμενες χώρες θα παράγουν το 60% του κρέατος παγκοσμίως και το 52% του γάλακτος παγκοσμίως. Η Κίνα θα ηγείται της παραγωγής κρέατος και η Ινδία της παραγωγής γάλακτος.

Το 2017, οι σφαγές των χοίρων ξεπέρασαν τις 257 εκατομμύρια στην Ευρωπαϊκή Ένωση (ΕΕ). Αυτός ο αριθμός ήταν μεγαλύτερος κατά 2 εκατομμύρια το 2015 και μεγαλύτερος κατά 5,2 εκατομμύρια σε σχέση με τον αριθμό δέκα χρόνια πριν. Το 2016, η παραγωγή χοιρινού κρέατος στην ΕΕ ανήλθε στους 23,4 εκατομμύρια τόνους. Αυτό μεταφράζεται σε 45,9 kg για κάθε κάτοικο της ΕΕ και ήταν 1,5 κιλό ανά άτομο περισσότερο από το 2006. Τους τελευταίους μήνες έχει καταγραφεί πτωτική τάση στην παραγωγή χοιρινού. Κατά το πρώτο μισό του 2017, έγιναν 2,7 εκατομμύρια λιγότερες σφαγές χοίρων στην ΕΕ σε σχέση με το πρώτο μισό του 2016 (-2,1%). Η μισή από αυτήν την μείωση προκλήθηκε από τις μειώσεις στην παραγωγή που καταγράφηκαν στις Γερμανία (-700.000), Γαλλία (-426.000) και Ηνωμένο Βασίλειο (-296.000).

Στο παρακάτω διάγραμμα φαίνεται η κατανομή της παραγωγής χοιρινού κρέατος μεταξύ των χωρών της ΕΕ

Pigmeat: slaughterings in the EU Member States, 2016

(% of EU total, based on number of animals)



Διάγραμμα 1: Ποσοστιαία κατανομή της παραγωγής χοιρινού κρέατος μεταξύ των χωρών της ΕΕ.

2. Περιβαλλοντική βιωσιμότητα και δημόσια υγεία

Τα χαμηλά επίπεδα των θερμίδων που καταναλώνονται από τους φτωχούς, η έλλειψη πρόσβασης στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης και όχι η υπερκατανάλωση, πρέπει να είναι το μέλημα αυτών που χαράσσουν πολιτική. Οι μεγαλύτεροι κίνδυνοι για την υγεία από τα κτηνοτροφικά προϊόντα στις αναπτυσσόμενες χώρες προέρχονται από ζωνοσούς όπως η γρίπη των πτηνών και η σαλμονέλωση, η μικροβιακή μόλυνση από μη ασφαλείς χειρισμούς των τροφίμων και η συσσώρευση παρασιτοκτόνων και αντιβιοτικών στην τροφική αλυσίδα μέσω των πρακτικών παραγωγής.

Οι επιπτώσεις της επανάστασης στην κτηνοτροφία στο περιβάλλον είναι δυνητικά ανησυχητικές. Η κτηνοτροφία τυπικά συμβάλλει στην περιβαλλοντική βιωσιμότητα σε μικτά συστήματα που στοχεύουν σε κατάλληλη ισορροπία μεταξύ της γεωργικής και της κτηνοτροφικής εντατικοποίησης. Σε αυτά τα συστήματα, η κτηνοτροφία παρέχει το λίπασμα ώστε να υποστηρίζεται η εντατική γεωργική καλλιέργεια. Η αυξανόμενη συγκέντρωση ζώων στις περιαστικές περιοχές, που απαιτείται προκειμένου να καλυφθεί η αστική ανάγκη σε κρέας και γάλα, προκαλεί υποβάθμιση των περιοχών βόσκησης και προβλήματα ρύπανσης. Οι πολιτικές έχουν ενθαρρύνει την υπερβολική αύξηση της εντατικής κτηνοτροφίας ή την αποψίλωση των δασών προστατεύοντας τους παραγωγούς και τους καταναλωτές από το πραγματικό κόστος της περιβαλλοντικής υποβάθμισης. Στα συστήματα υψηλής έντασης, οι μεγάλες ποσότητες αερίων του θερμοκηπίου και τα πλεονάζοντα επίπεδα θρεπτικών συστατικών που παράγονται από την κτηνοτροφία αποτελούν κινδύνους για το περιβάλλον. Αυτή η μόλυνση θα πρέπει να αντανakλάται στα οικονομικά κόστη του παραγωγού και του καταναλωτή, αλλά σπάνια γίνεται (Courbois, 2001).

Εκτός από τις περιβαλλοντικές επιπτώσεις, τα απόβλητα των επιχειρήσεων εντατικής εκτροφής ζώων (CAFOs, Concentrated Animal Feeding Operations) δημιουργούν κινδύνους και για την δημόσια υγεία. Κεντρικό ρόλο σε αυτό το πρόβλημα παίζει και το ότι οι ζωοτροφές μπορεί να περιέχουν ζωικά απόβλητα, ζωικούς ιστούς, ζωικά παραπροϊόντα και άλλα πρόσθετα τα οποία καταλήγουν στο ανθρώπινο φαγητό ή στο περιβάλλον. Η βιομηχανοποιημένη εκτροφή ζώων (IAP, Industrial Animal Production) στις επιχειρήσεις εντατικής εκτροφής, εκτός από τις μεγάλες ποσότητες κρέατος, διαθέτει και τεράστιες ποσότητες αποβλήτων στο περιβάλλον όπως κοπριά, ούρα, νεκρά ζώα, πλεονάζουσα τροφή και πούπουλα. Πολλά από τα συστατικά των ζωοτροφών περνούν, μέσω του ζώου, απευθείας στην κοπριά όπως είναι το αρσενικό, τα αντιβιοτικά, το άζωτο και ο φώσφορος. Επίσης, η κοπριά περιέχει σκόνη, μύκητες, παθογόνα βακτήρια και βακτηριακές ενδοτοξίνες. Ήδη από το 1997, τα ζώα της βιομηχανοποιημένης εκτροφής των ΗΠΑ παράγαν κατά προσέγγιση 1,4 δισεκατομμύρια τόνους αποβλήτων (Walker et al., 2005).

Προκειμένου να γίνει καλύτερα αντιληπτή η παραγωγή αποβλήτων από μία τέτοια επιχείρηση εκτροφής παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα τα απόβλητα που παράγονται από μία τέτοια επιχείρηση και ο αριθμός χοίρων που παράγει την ίδια ποσότητα αυτών των αποβλήτων με αυτήν που παράγουν 1000 άνθρωποι.

Πίνακας 1: Αριθμός χοίρων που παράγει την ίδια ποσότητα των διαφορετικών αποβλήτων με αυτήν που παράγουν 1000 άνθρωποι (πηγή : Fleming and Ford, “Human versus Animals - Comparison of Waste Properties”,2001)

Απόβλητα	Αριθμός χοίρων
Ολικά στερεά	280
BOD5	100
Ολικό Άζωτο	340
Ολικός Φώσφορος	190
Ολικά κολοβακτηρίδια	10000
Ολικά απόβλητα (με τα υγρά αραίωσης)	39000

Η έκθεση σε αυτά τα απόβλητα είναι πιο έντονη για τους εργαζόμενους των επιχειρήσεων εντατικής εκτροφής και για τους ανθρώπους που ζουν στις κοινότητες των γύρω περιοχών. Οι κάτοικοι των αγροτικών κοινοτήτων, ενώ συνήθως εξαιρούνται από τις διαδικασίες λήψεως αποφάσεων για τη δημιουργία νέων επιχειρήσεων εντατικής εκτροφής, είναι οι πρώτοι που θα υποστούν τις σοβαρές επιπτώσεις της λειτουργίας μιας τέτοιας επιχείρησης, όπως είναι η υποβάθμιση της ποιότητας ζωής, η μείωση της αξίας των ακινήτων, η παρουσία ανυπόφορων οσμών και τα μολυσμένα πηγάδια, λόγω της μόλυνσης των υπόγειων υδάτων (Flora et al.,2002).

3. Μικροβιολογία κρέατος

Ο εδώδιμος μυϊκός ιστός των υγιών ζώων είναι στείρος. Οι μικροοργανισμοί μολύνουν συνήθως το κρέας κατά την επεξεργασία του. Η αλλοίωση του κρέατος και των πουλερικών συμβαίνει λόγω της ανάπτυξης βακτηρίων. Η προσάρτηση των βακτηρίων στην επιφάνεια του κρέατος περιλαμβάνει δύο στάδια. Το πρώτο είναι αδύναμη αναστρέψιμη ρόφηση που μπορεί να σχετίζεται με τις δυνάμεις van der Waals ή άλλους φυσικοχημικούς παράγοντες. Το δεύτερο στάδιο αποτελείται από την μη αναστρέψιμη προσάρτηση στην επιφάνεια στην οποία εμπλέκεται η παραγωγή εξωκυτταρικών πολυσακχαριτών. Η προσάρτηση των βακτηρίων στην επιφάνεια του κρέατος επηρεάζεται από την ικανότητα προσκόλλησης, τα χαρακτηριστικά της επιφάνειας του κρέατος, την φάση ανάπτυξης του μικροοργανισμού, την μικροβιακή χλωρίδα του κρέατος, την θερμοκρασία και την κινητικότητα του μικροοργανισμού.

Η μικροβιολογία του σφάγιου κρέατος εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τις συνθήκες σταβλισμού του ζώου, σφαγής και επεξεργασίας. Συνεπώς, η φυσιολογική κατάσταση του ζώου κατά την σφαγή, η διασπορά των μικροοργανισμών κατά την σφαγή και την επεξεργασία, η θερμοκρασία και άλλες συνθήκες αποθήκευσης και μεταφοράς είναι οι πιο σημαντικοί παράγοντες που θα καθορίσουν την μικροβιολογική ποιότητα του κρέατος. Όταν το ζώο θανατώνεται, τα τοιχώματα του εντέρου και άλλων βλεννώδων ιστών μπορεί να χάσουν την αντίστασή τους στον βακτηριακό πληθυσμό. Η βασική μόλυνση του κρέατος από μικροοργανισμούς συμβαίνει όταν το σφάγιο ανοίγεται. Τα βακτήρια που μολύνουν μπορεί να προέρχονται από την εντερική οδό, τους λεμφαδένες, το δέρμα και το τρίχωμα του ζώου, από κοπρανώδη υλικά, τα καλάθια αποθήκευσης, τα μαχαίρια κοπής, τον ρουχισμό και τα χέρια των χειριστών, το έδαφος, το νερό, τον αέρα και τα συναφή. Το μεγαλύτερο μέρος της επιμόλυνσης γίνεται κατά την αφαίμαξη και τον τεμαχισμό του σφάγιου (Erkmen and Bozoglu, 2016).

Η μικροβιακή ποικιλότητα του νωπού κρέατος αποτελείται κυρίως από αρνητικά κατά Gram βακτήρια στα οποία περιλαμβάνονται είδη των *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, είδη της οικογένειας Enterobacteriaceae όπως είναι *Escherichia coli*, *Serratia liquefaciens*, *Citrobacter freundii*, *Pantoea agglomerans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* και *E. hafniae* καθώς και είδη των γενών *Micrococcus* και *Staphylococcus*. Σε χαμηλότερο αριθμό εντοπίζονται βακτήρια των γενών *Enterococcus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, το είδος *Brochothrix thermosphacta*, ζύμες και μύκητες (Κοτζεκίδου-Ρουκά, 2007). Παθογόνα είδη μικροβίων που μολύνουν το κρέας μέσω της γαστρεντερικής οδού είναι στελέχη της *Salmonella enteric*, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni*, *Aeromonas hydrophila*, *Listeria monocytogenes* και *Escherichia coli*. Η φυσιολογική χλωρίδα των λεμφαδένων του ζώου που μολύνει το κρέας είναι *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Clostridium* και *Salmonella*. Οι μικροοργανισμοί που μολύνουν το κρέας από το τρίχωμα του ζώου είναι βακτήρια (όπως *Staphylococcus*, *Micrococcus* και *Pseudomonas*), μύκητες και ζύμες.

Πολλοί από τους μικροοργανισμούς που μπορούν να μολύνουν το κρέας πολλαπλασιάζονται σε θερμοκρασίες που εφαρμόζονται για την ψύξη του κρέατος. Τα σημαντικότερα γένη βακτηρίων που αναπτύσσονται με γρήγορους ρυθμούς, άρα είναι και τα πιο πιθανά να προκαλέσουν αλλοίωση στο κρέας, είναι *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Pseudomonas* και *Psychrobacter*. Τα είδη των *Shewanella* και *Enterobacteriaceae* χρειάζονται πιο ιδανικές συνθήκες από τα παραπάνω είδη για να αναπτυχθούν και να παράγουν αλλοιωγόνους μεταβολίτες. Η μακράς διάρκειας αποθήκευση του κρέατος υπό ψύξη μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένο αριθμό ψυχρότροφων μικροοργανισμών. Η εμπορική διάρκεια ζωής του νωπού κρέατος περιορίζεται σε ένα μικρό εύρος ημερών, ανάλογα με τις συνθήκες συντήρησης, πριν εμφανιστούν σημάδια αλλοίωσης (Garcia-Lopez et al., 1998).

Κατά τις διαδικασίες τεμαχισμού και σερβιρίσματος, μπορεί να μολυνθεί το τρόφιμο από τα χέρια, τις μηχανές κοπής και άλλο εξοπλισμό. Η ανεπαρκής υγιεινή οδηγεί στην επιμόλυνση του κρέατος με αλλοιωγόνους και παθογόνους μικροοργανισμούς. Στην λιανική πώληση, τα μαχαίρια, οι μπαλτάδες, οι μηχανές άλεσης και κοπής, οι επιφάνειες κοπής, οι ζυγαριές, το προσωπικό που χειρίζεται το κρέας, μπορεί να προσθέσει μικροοργανισμούς. Στο σπίτι, τα δοχεία αποθήκευσης που έχουν χρησιμοποιηθεί και προηγουμένως για συντήρηση του κρέατος υπό ψύξη, μπορούν να αποτελέσουν πηγή μόλυνσης με αλλοιωγόνους ψυχρότροφους μικροοργανισμούς. Η αποθήκευση και διανομή του κρέατος σε σακούλες αδιαπέραστες από τον αέρα και υπό κενό συνήθως προκαλεί την ανάπτυξη του *Brochothrix thermosphacta* και των οξυγαλακτικών βακτηρίων (κυρίως *Lactobacillus*).

3.1 Μικροβιολογική αλλοίωση

Το φρέσκο κρέας, το οποίο συντηρείται υπό ψύξη ($\leq 5\text{ }^{\circ}\text{C}$), αλλοιώνεται από ψυχρότροφα αερόβια και προαιρετικά αναερόβια. Η ανάπτυξη των βακτηρίων ευνοείται από την υγρή και γεμάτη θρεπτικά συστατικά επιφάνεια του κρέατος. Τα είδη *Pseudomonas* spp. είναι αυτά που συνήθως κυριαρχούν στον βακτηριακό πληθυσμό που ευθύνεται για την αλλοίωση του κρέατος σε εύρος θερμοκρασιών (-1°C - 25°C) (Stanbridge and Davies, 1998). Μόλις εξαντληθούν οι απλοί υδατάνθρακες, ξεκινούν άλλα ψυχρότροφα (όπως *Aeromonas*, *Brochothrix*, *Shewanella putrefaciens*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Moraxella*, *Serratia* και *Enterobacter*) να χρησιμοποιούν τα ελεύθερα αμινοξέα και απλές αζωτούχες ενώσεις παράγοντας σουλφίδια μεθυλίου, εστέρες και οξέα. Όταν καταναλωθούν και τα αμινοξέα, οι *Pseudomonas* (όπως οι *P. fragi*, *P. fluorescens* και *P. putida*), *Aeromonas*, *Proteus*, *Clostridium* και άλλα αλλοιωγόνα βακτήρια παράγουν πρωτεολυτικά ένζυμα. Ανιχνεύσιμη πρωτεόλυση στο κρέας λαμβάνει χώρα μόνο σε πληθυσμούς μεγαλύτερους από 10^8 cfu/cm². Πολλοί αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί παράγουν λιπάσες, οι οποίες συμβάλλουν στο τάγγισμα, καταλύοντας την υδρόλυση των τριγλυκεριδίων σε γλυκερόλη και λιπαρά οξέα.

Η αλλοίωση του κρέατος έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία δυσάρεστης οσμής αρχικά και κατόπιν ακολουθεί η σήψη. Κατά την αναερόβια αποσύνθεση των πρωτεϊνών παράγονται ενώσεις δυσάρεστης οσμής, όπως υδρόθειο, μερκαπτάνες, ινδόλη, αμμωνία και αμίνες. Η επιφάνεια του κρέατος εμφανίζει γλοιώδη υφή εξαιτίας της υπερβολικής βακτηριακής ανάπτυξης και της τρυφεροποίησης του κρέατος. Επίσης, η αλλοίωση του κρέατος χαρακτηρίζεται από αύξηση του pH, αύξηση του βακτηριακού πληθυσμού και αύξηση της ικανότητας συγκράτησης νερού των πρωτεϊνών. Η αύξηση του pH στο 6,5 είναι ένδειξη αλλοίωσης στον κιμά και το pH μπορεί να αυξηθεί ως και 8,5 στα κρέατα υπό σήψη. Ο αποχρωματισμός, ο σχηματισμός γλίτσας και το ξίνισμα οφείλονται στα *Lactobacillus* και *Streptococcus*. Όταν η εσωτερική θερμοκρασία του κρέατος δεν μειώνεται στο εύρος των θερμοκρασιών του ψυγείου, η αλλοίωση συμβαίνει κυρίως από το *Clostridium perfringens* και τα γένη της οικογένειας Enterobacteriaceae (Erkmen and Bozoglu, 2016).

3.2 Μικροβιολογία κιμά

Ο κιμάς φέρει μεγαλύτερο μικροβιολογικό φορτίο σε σχέση με τα τεμάχια κρέατος γιατί:

- 1) Φέρει μεγαλύτερη διαθέσιμη επιφάνεια για την ανάπτυξη των αερόβιων μικροοργανισμών που είναι και οι κύριοι υπεύθυνοι της αλλοίωσης του προϊόντος στις χαμηλές θερμοκρασίες.
- 2) Τα μηχανήματα κοπής αποτελούν σημαντική πηγή μόλυνσης του κιμά με κολοβακτηριοειδή, εντερόκοκκους, σταφυλόκοκκους και μικρόκοκκους.
- 3) Θεωρείται ότι ο κιμάς έχει 10-100 φορές μεγαλύτερο μικροβιολογικό φορτίο από τα τεμάχια κρέατος από τα οποία προήλθε.
- 4) Όσο αυξάνεται η περιεκτικότητα του κιμά σε λίπος αυξάνεται και το μικροβιακό του φορτίο (Κοτζεκίδου, 2007).

Η αλλοίωση στον κιμά αναπτύσσεται με τον ίδιο τρόπο όπως και στα αυτοτελή τεμάχια κρέατος, όμως η ολική μάζα οποιουδήποτε υποστρώματος χρησιμοποιούν τα βακτήρια είναι πιο άμεσα διαθέσιμο και κατανεμημένο σε όλη την μάζα του κιμά. Τα βακτήρια φτάνουν σε υψηλότερο αριθμό ανά γραμμάριο (g) κιμά σε σχέση με τον αριθμό ανά τετραγωνικό εκατοστό (cm²) στο τεμάχιο κρέατος προτού γίνει αντιληπτή η αλλοίωση (Gill, 1983).

3.3 Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (OMX)

Οι μικροβιακοί πληθυσμοί στα δείγματα τροφίμων έχουν τεράστια διακύμανση, η οποία εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά κάθε δείγματος και τις συνθήκες επεξεργασίας του. Τα μη επεξεργασμένα τρόφιμα είναι πιθανό να περιέχουν μια μεγάλη ποικιλία μικροοργανισμών ενώ τα προϊόντα θερμικής επεξεργασίας μπορεί να περιέχουν θερμοανθεκτικά σπόρια ή θερμοανθεκτικά κύτταρα μικροοργανισμών. Ο υπολογισμός της OMX μπορεί να παρέχει μόνο μία εκτίμηση του μικροβιακού πληθυσμού βασιζόμενη σε εκείνα τα κύτταρα που μπορούν να ανακτήσουν τη σωστή λειτουργία τους υπό τις συνθήκες της ανάλυσης.

Η καταμέτρηση της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη ανάλυση που προσφέρει μια εικόνα για την συνολική μικροβιολογική ποιότητα του τροφίμου. Χρησιμοποιείται ως *δείκτης της ποιότητας* του τροφίμου και μπορεί να αντανάκλα την καλή υγιεινή του προσωπικού και του περιβάλλοντος καθώς και τις ορθές πρακτικές υγιεινής. Στις περισσότερες περιπτώσεις, όμως, είναι ανεπαρκής δείκτης ασφάλειας γιατί δεν συσχετίζεται άμεσα με την παρουσία παθογόνων ή τοξινών. Ο χαμηλός αριθμός αποικιών OMX δεν εγγυάται ότι το προϊόν δεν περιέχει παθογόνους μικροοργανισμούς, όμως, κάποια προϊόντα που έχουν υπερβολικό ή ασυνήθιστα υψηλό αριθμό OMX μπορούν δικαιολογημένα να θεωρηθούν πιθανοί κίνδυνοι για την δημόσια υγεία. Άρα, η παρουσία μεγάλου αριθμού βακτηρίων μπορεί να υποδεικνύει κακή υγιεινή ή προβλήματα με τον έλεγχο της επεξεργασίας ή με κάποιο συστατικό του προς εξέταση τροφίμου (Halkman, 2014).

4. Αναδυόμενα παθογόνα

Ο όρος «αναδυόμενα παθογόνα» σημαίνει ότι τα παρόντα στελέχη προσαρμόζονται για επιβίωση υπό στρες σε καινούριο περιβάλλον. Θα πρέπει να ληφθούν υπόψη τρεις διαφορετικές έννοιες: *νέα, εξελισσόμενα και αναδυόμενα παθογόνα*. Τα *νέα τροφιμογενή παθογόνα* είναι εκείνα που δεν έχουν περιγραφεί μέχρι τώρα και αποτελούν σοβαρούς κινδύνους για τη δημόσια υγεία και σημαντικούς αιτιολογικούς παράγοντες για εξάρσεις. Τα *εξελισσόμενα τροφιμογενή παθογόνα* είναι εκείνα που γίνονται πιο δραστικά (π.χ. μικροοργανισμοί των οποίων η εμπλοκή σε τροφιμογενείς εξάρσεις θεωρήθηκε λανθασμένα ότι μειώνεται, ενώ στην πραγματικότητα εμπλέκονται σε αξιόλογο αριθμό κρουσμάτων) ή πλέον σχετίζονται με άλλα προϊόντα ή είναι εκείνα που προκάλεσαν νόσους που λανθασμένα έχουν αποδοθεί σε άλλα τροφιμογενή παθογόνα για πολλά χρόνια (π.χ. οι μικροοργανισμοί οι οποίοι ήταν ήδη γνωστοί αλλά δεν ήταν αναγνωρισμένοι ως αιτίες ανθρώπινων νόσων, δηλαδή οργανισμοί των οποίων η παθογένεια ήταν άγνωστη ή αμελούνταν μέχρι τώρα). Τα *αναδυόμενα τροφιμογενή παθογόνα* είναι αυτά για τα οποία έχει εμφανιστεί ενδιαφέρον πρόσφατα, δηλαδή έχουν αναγνωριστεί ως παθογόνα εδώ και πολλά χρόνια αλλά τώρα έχουν συσχετιστεί με τροφιμογενή μετάδοση (Sofos, 2008).

5. Νομοθεσία

Η διατήρηση της ψυχρής αλυσίδας αποτελεί μία από τις κύριες αρχές και τα βασικά προαπαιτούμενα της νομοθεσίας της Ευρωπαϊκής Ένωσης (ΕΕ) για την υγιεινή των τροφίμων. Οι πρώτες ύλες, τα συστατικά, τα ενδιάμεσα προϊόντα και τα τελικά προϊόντα που είναι πιθανό να υποστηρίζουν την ανάπτυξη των παθογόνων μικροοργανισμών και/ή των αλλοιωγόνων βακτηρίων, θα πρέπει να συντηρούνται σε θερμοκρασίες που δεν θα οδηγήσουν σε κίνδυνο για την υγεία. Η ψυχρή αλυσίδα δεν πρέπει να διακόπτεται.

Στην περίπτωση του κρέατος (περιλαμβάνεται το φρέσκο κρέας, τα προϊόντα κρέατος, ο κιμάς και τα παρασκευάσματα κρέατος), η νομοθεσία της ΕΕ (Κανονισμός (ΕΕ) Νο 853/2004) παραθέτει συγκεκριμένες απαιτήσεις για την αποθήκευση και την μεταφορά σχετικά με τις θερμοκρασίες και τη μέγιστη διάρκεια αποθήκευσης. Σε αυτές τις απαιτήσεις περιλαμβάνονται:

- Φρέσκο κρέας από ζώα εκτός από πουλερικά:

Η επιθεώρηση του σφάγιου πρέπει να ακολουθεί άμεσα και υπό ψύξη στο σφαγείο ώστε να εξασφαλίζεται μία θερμοκρασία σε όλο το κρέας όχι μεγαλύτερη από 3°C για τα εντόσθια και 7 °C για το υπόλοιπο κρέας, η οποία θα ακολουθεί μια καμπύλη ψύξης που θα εξασφαλίζει μία συνεχόμενη μείωση στη θερμοκρασία. Παρόλα αυτά ο τεμαχισμός και η αποστέωση του κρέατος μπορεί να γίνεται, υπό ψύξη, και σε εγκαταστάσεις που βρίσκονται δίπλα στο σφαγείο.

Εκτός από ελάχιστες εξαιρέσεις, το κρέας θα πρέπει να έχει τις παραπάνω θερμοκρασίες πριν από την μεταφορά και να παραμείνει σε αυτές και κατά την μεταφορά του.

Ο μέγιστος χρόνος αποθήκευσης μεταξύ της σφαγής και της παραγωγής κιμά και παρασκευασμάτων κρέατος δεν θα πρέπει να ξεπερνά τις 6 ημέρες και τις 15 ημέρες από την σφαγή του ζώου στην περίπτωση του αποστεωμένου, συσκευασμένου υπό κενό μοσχαρίσιου και βοδινού κρέατος.

- Κρέας πουλερικών:

Μετά την μετά τη σφαγή επιθεώρηση, τα σφάγια πρέπει να ψύχονται σε θερμοκρασία ίση ή μικρότερη των 4°C, όσο το δυνατόν γρηγορότερα, εκτός κι αν το κρέας τεμαχίζεται όσο είναι θερμό σε εγκαταστάσεις δίπλα από το σφαγείο.

Ο μέγιστος χρόνος αποθήκευσης μεταξύ της σφαγής και της παραγωγής κιμά και παρασκευασμάτων κρέατος δεν πρέπει να ξεπερνά τις 3 ημέρες.

- Κιμάς και παρασκευάσματα κρέατος:

Αμέσως μετά την παραγωγή, ο κιμάς και τα παρασκευάσματα κρέατος πρέπει να τυλιχτούν ή να πακεταριστούν και να ψυχθούν σε εσωτερική θερμοκρασία όχι μεγαλύτερη από 2°C για τον κιμά και 4 °C για τα παρασκευάσματα κρέατος, ή να καταψυχθούν σε εσωτερική θερμοκρασία ίση ή μικρότερη των -18 °C.

Ο κιμάς και τα παρασκευάσματα κρέατος πρέπει να πληρούν τα μικροβιολογικά κριτήρια που ορίζονται από τον Κανονισμό (ΕΕ) Νο 2073/2005, σε ό,τι αφορά την *Salmonella*, τις αερόβιες αποικίες και *Escherichia coli*. Αυτά τα κριτήρια παραμένουν σε ισχύ και παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 2: Μικροβιολογικά κριτήρια που πρέπει να πληροί ο κιμάς

Μικροοργανισμοί	Όρια	
	m	M
<i>Salmonella</i>	Απουσία σε 10 g	
Αερόβιες αποικίες	5x10 ⁵ cfu/g	5x10 ⁶ cfu/g
<i>E. coli</i>	50 cfu/g	500 cfu/g

6. Μη – καλλιεργητικές Τεχνικές

Προκειμένου να προσδιοριστεί η ποικιλομορφία των μικροοργανισμών στα φυσικά οικοσυστήματα και να ελεγχθεί η εξέλιξη των μικροβιακών πληθυσμών στο χώρο και στον χρόνο, έχουν αναπτυχθεί οι μέθοδοι που είναι ανεξάρτητες των καλλιεργείων. Συγκρινόμενες με τις παραδοσιακές, καλλιεργητικές μεθόδους, αυτές στοχεύουν στη λήψη μιας εικόνας του μικροβιακού πληθυσμού χωρίς να υπάρχει η ανάγκη της ξεχωριστής απομόνωσης και καλλιέργειας των συστατικών του. Αυτό είναι δυνατό γιατί αυτές οι τεχνικές βασίζονται στην «προσέγγιση απομόνωσης DNA/RNA». Παρόλο που υπάρχουν περιορισμοί στις μεθόδους αυτές, μπορούν να είναι πολύ χρήσιμες όταν αυτοί οι περιορισμοί ληφθούν υπόψη και αντιμετωπιστούν. Τέτοιοι περιορισμοί περιλαμβάνουν από τεχνικά προβλήματα, όπως η λήψη γενομικού DNA από δείγματα τροφίμων μέχρι εννοιολογικές ερωτήσεις, όπως η χρήση παγκοσμίως αποδεκτών και ουσιαστικών ορισμών των μικροβιακών ειδών (Giraffa, Carminati, 2008).

Η εξερεύνηση της επικρατούσας μικροχλωρίδας αλλοίωσης στην τσιπούρα έχει πραγματοποιηθεί ήδη (Parlapani et al., 2013), χρησιμοποιώντας είτε τον φαινοτυπικό χαρακτηρισμό αποικιών που αναπτύσσονται σε τρυβλία είτε τον γενοτυπικό από bulk DNA (προσέγγιση ανεξάρτητη καλλιεργείων). Όμως, ο φαινοτυπικός προσδιορισμός δεν είναι ακριβής και αξιόπιστος και η μέθοδος που είναι ανεξάρτητη της καλλιέργειας δεν επιτρέπει την απομόνωση των βακτηρίων αλλοίωσης (Parlapani, Boziaris, 2016).

Οι μη-καλλιεργητικές τεχνικές βασίζονται κυρίως στην ανάλυση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών των μικροβίων (DNA και /ή RNA). Οι περισσότερες στηρίζονται στην ενίσχυση αυτών των αλληλουχιών με χρήση της τεχνικής της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) και στοχεύουν στα γονίδια rRNA (rDNA). Ο καθορισμός των φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ των μικροβίων προκύπτει από την σύγκριση των αλληλουχιών που λαμβάνονται μεταξύ τους και με αυτές που υπάρχουν στις βάσεις δεδομένων. Κάποιες από τις μη-καλλιεργητικές τεχνικές που βασίζονται στην PCR είναι: η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή με βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE), η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή με βαθμίδωση θερμοκρασίας (Temporal Temperature Gradient gel Electrophoresis, TTGE), η ποσοτικοποιημένη real-time PCR (qPCR), η κατασκευή και ανάλυση των βιβλιοθηκών του 16S rRNA γονιδίου, ο πολυμορφισμός διαμόρφωσης μονόκλωνου DNA (Single Stranded Conformation Polymorphism, SSCP). Από τις παραπάνω τεχνικές αυτές που έχουν χρησιμοποιηθεί κυρίως για μικροβιολογικό χαρακτηρισμό τροφίμων και για ανάλυση της πορείας των ζυμώσεων στα τρόφιμα είναι η qPCR (ποσοτικοποιημένη ανάλυση) και η DGGE (ποιοτική/ ημι-ποσοτικοποιημένη ανάλυση) (Mayo et al., 2014).

7. Μοριακές τεχνικές για τον έλεγχο και προσδιορισμό μικροβιακής γλωρίδας

Συγκεκριμένα, οι μέθοδοι που βασίζονται στην PCR θεωρούνται οι πιο πολλά υποσχόμενες τεχνικές για την άμεση και ακριβή ανίχνευση και χαρακτηρισμό των μικροοργανισμών στα τρόφιμα. Στα μικροβιολογικά εργαστήρια, οι κλασικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για ταυτοποίηση των βακτηρίων βασίζονται σε φαινοτυπικές αναλύσεις. Οι μέθοδοι αυτές, όταν τα βακτήρια έχουν αναπτυχθεί υπό ιδανικές συνθήκες, κάνουν σωστή ταυτοποίηση των βακτηρίων με γνωστό φαινότυπο. Όταν όμως τα γνωστά βακτήρια εμφανίζονται με ασυνήθιστο φαινότυπο η φαινοτυπική ταυτοποίησή τους καθίσταται δύσκολη και επιρρεπής σε σφάλμα. Σε αυτές τις περιπτώσεις, οι μοριακές μέθοδοι που βασίζονται στην ανάλυση της αλληλουχίας DNA μπορούν να επιτύχουν γρήγορη και αξιόπιστη ταυτοποίηση των βακτηρίων, ανίχνευση των μη καλλιεργούμενων και των νεκρών βακτηρίων όπως και ταυτοποίηση των εκλεκτικών και δύσκολα καλλιεργήσιμων βακτηρίων (Drancourt et al., 2000).

Οι εκκινητές (primers) που χρησιμοποιούνται κατά την ταυτοποίηση των βακτηρίων στοχεύουν στην αλληλουχία του γονιδίου 16S rRNA. Η μεγάλη ποσότητα τόσο των μεταβλητών όσο και των σταθερών περιοχών στο γονίδιο 16S rRNA το καθιστά έναν εξαιρετικό, καθολικό, φυλογενετικό δείκτη. Συνεπώς, ο γενοτυπικός προσδιορισμός που βασίζεται στην σύγκριση της αλληλουχίας των νουκλεοτιδίων του 16S rRNA γονιδίου έχει γίνει ένα χρήσιμο εργαλείο για την ταυτοποίηση βακτηρίων σε επίπεδο γένους και είδους (Nisiotou et al., 2014).

Το γονίδιο αυτό έχει διάφορα χαρακτηριστικά που το καθιστούν φυλογενετικό εργαλείο άρα και χρήσιμο στόχο για ταυτοποίηση των βακτηρίων. Ένα από τα σημαντικά χαρακτηριστικά του είναι ότι είναι παρόν σε όλα τα βακτήρια, άρα αποτελεί κοινό, καθολικό στόχο για την βακτηριακή ταυτοποίηση. Ένα δεύτερο χαρακτηριστικό, είναι ότι η λειτουργία του 16S rRNA γονιδίου έχει παραμείνει σταθερή για μακρύ χρονικό διάστημα, οπότε οι αλλαγές στην αλληλουχία του είναι πιο πιθανό να αντανακλούν τυχαίες αλλαγές παρά στοχευμένες οι οποίες θα μετέβαλλαν τις λειτουργίες του (Woese, 1987). Τέλος, το γονίδιο 16S rRNA είναι αρκετά μεγάλο (περίπου 1,500 bp) ώστε να περιέχει πληροφορίες αλληλουχιών που να είναι στατιστικά χρήσιμες και το μόριο του αποτελείται από περίπου 50 λειτουργικές περιοχές. Ο αριθμός των περιοχών είναι σημαντικός, γιατί η εμφάνιση στοχευμένων αλλαγών σε μία περιοχή δεν επηρεάζει ιδιαίτερα τις αλληλουχίες των άλλων περιοχών. Όσο αυξάνεται ο αριθμός των περιοχών, τόσο μειώνεται η επίδραση των στοχευμένων αλλαγών στις φυλογενετικές σχέσεις (Patel, 2001).

7.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Τα απαραίτητα συστατικά για την πραγματοποίηση μιας αντίδρασης PCR είναι:

- 1) Αλληλουχία στόχος (δείγμα DNA)
- 2) DNA πολυμεράση
- 3) Ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές
- 4) Ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης και Mg^{2+}
- 5) Τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTP's)

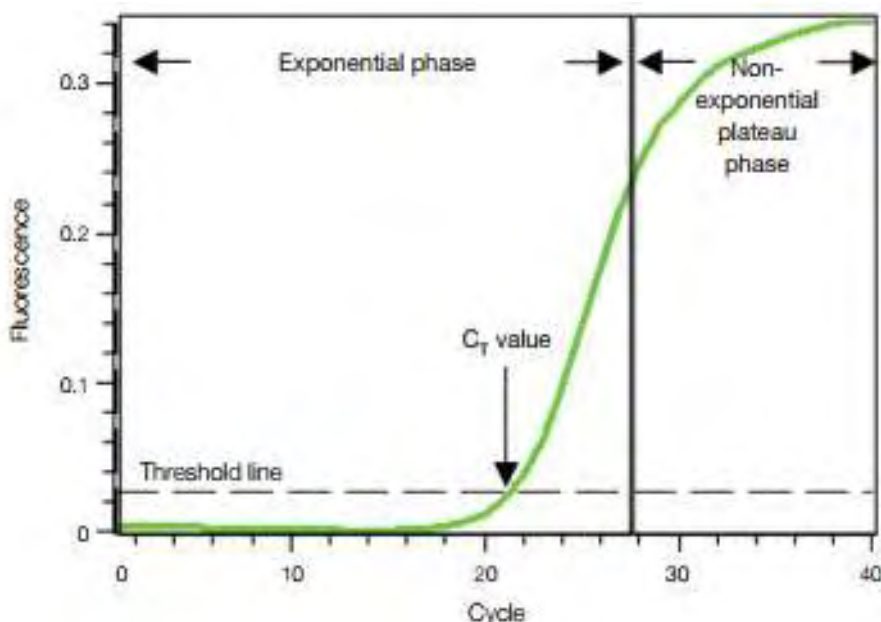
Η DNA πολυμεράση χρησιμοποιεί μονόκλωνο DNA ως μήτρα για τη σύνθεση μιας συμπληρωματικής αλυσίδας. Το μονόκλωνο DNA προκύπτει από τη θέρμανση του δίκλωνου σχεδόν στο σημείο βρασμού. Οι δύο κλώνοι που προκύπτουν χρησιμοποιούνται και οι δύο ως μήτρες για τη σύνθεση νέων μορίων. Προκειμένου να ξεκινήσει η πολυμεράση τη σύνθεση χρειάζεται ένα τμήμα δίκλωνου DNA, για αυτόν τον λόγο προστίθενται δύο ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές. Ο κάθε εκκινητής είναι συμπληρωματικός με μια περιοχή ενός από τους δύο κλώνους DNA ώστε να προσδένεται σε αυτή (υβριδισμός) (Watson et al., 2007). Το ρυθμιστικό διάλυμα προστίθεται ώστε να διατηρείται το pH και η συγκέντρωση των αλάτων στις ιδανικές συνθήκες για την διεξαγωγή της αντίδρασης.

Τα ιόντα Mg^{2+} είναι απαραίτητα για την δράση της πολυμεράσης και σχηματίζουν διαλυτά σύμπλοκα με τα dNTP's, το DNA-μήτρα και τους εκκινητές. Θα πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή στη συγκέντρωση των ιόντων μαγνησίου καθώς η περίσσεια τους οδηγεί στην μη ειδική σύνδεση των εκκινητών με το DNA, η οποία αυξάνει την παραγωγή των μη ειδικών προϊόντων της αντίδρασης. Επίσης, μειώνει την πιστότητα της αντιγραφής της Taq πολυμεράσης. Σε αντίθεση, η χαμηλή συγκέντρωση ιόντων μαγνησίου μειώνει την ποσότητα του παραγόμενου προϊόντος. Τα dNTP's χρησιμοποιούνται ως δομικά μόρια για τη σύνθεση της νέας αλυσίδας (Παλαιολόγου κ.α., 2015).

7.2 Real- time PCR

Η real-time PCR είναι η συνεχόμενη συλλογή του φθορίζοντος σήματος από μία ή περισσότερες αλυσιδωτές αντιδράσεις πολυμεράσης για ένα εύρος κύκλων. Η ποσοτικοποιημένη real-time PCR (qPCR) είναι η μετατροπή του φθορίζοντος σήματος από κάθε αντίδραση σε μια αριθμητική τιμή για κάθε δείγμα. Η real-time qPCR έχει γίνει η πιο ακριβής και ευαίσθητη μέθοδος για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των νουκλεϊκών οξέων. Αυτή η μέθοδος, έχει υπερβεί τα περισσότερα από τα κυριότερα μειονεκτήματα των προηγούμενων μεθόδων (Dorak, 2006).

Στην παρακάτω γραφική παράσταση (Εικόνα 1) ο αριθμός των κύκλων φαίνεται στον άξονα των x ενώ στον άξονα των y φαίνεται ο φθορισμός, ο οποίος είναι ανάλογος της ποσότητας του προς ενίσχυση προϊόντος. Στην καμπύλη ενίσχυσης διακρίνονται δύο στάδια, ένα εκθετικό και ένα μη-εκθετικό ή στάδιο πλατώ.



Εικόνα 1: Γραφική παράσταση καμπύλης real-time PCR (προσαρμογή από: www.bio-rad.com)

Αρχικά, στην καμπύλη ο φθορισμός παραμένει σε χαμηλά επίπεδα και οποιαδήποτε αύξηση του δεν δίνει ανιχνεύσιμο σήμα (κύκλοι 1-18) , παρόλο που το προϊόν συσσωρεύεται εκθετικά. Τελικά, όταν συσσωρευτεί αρκετό προϊόν αποδίδει ένα ανιχνεύσιμο φθορίζον σήμα. Ο αριθμός του κύκλου στον οποίο συμβαίνει αυτό ονομάζεται κύκλος κατωφλίου ή C_T (threshold cycle). Από την στιγμή που η τιμή C_T υπολογίζεται στο εκθετικό στάδιο όπου τα αντιδραστήρια είναι επαρκή, η real-time qPCR μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να υπολογιστεί αξιόπιστα και με ακρίβεια η αρχική ποσότητα του πρότυπου δείγματος που χρησιμοποιείται στην αντίδραση.

Η τιμή C_T μιας αντίδρασης καθορίζεται κυρίως από την αρχική ποσότητα του προς ενίσχυση δείγματος. Αν η αρχική ποσότητα του δείγματος, στην έναρξη της αντίδρασης, είναι μεγάλη, τότε απαιτούνται σχετικά λιγότεροι κύκλοι για την συσσώρευση προϊόντος ικανού να αποδώσει ανιχνεύσιμο σήμα φθορισμού. Σε αυτήν την περίπτωση, η αντίδραση θα έχει μια χαμηλή τιμή C_T . Αναλόγως, αν η αρχική ποσότητα του δείγματος είναι μικρή, η αντίδραση θα έχει υψηλή τιμή C_T . Αυτή η σχέση αποτελεί την βάση της ποσοτικοποίησης για την real-time PCR (BioRad Laboratories, 2006).

Πλεονεκτήματα της RT-PCR

Έχουν αναπτυχθεί δοκιμές RT- PCR για μια ποικιλία αλληλουχιών-στόχων παθογόνων μικροοργανισμών τροφίμων, φυτών και γενετικά τροποποιημένων τροφίμων. Η χρήση της φθορίζουσας χρωστικής- δείκτη, η οποία ενωμένη με το DNA αποδίδει ακόμη πιο έντονο φθορισμό, αποτελεί κύριο και υψηλής ευαισθησίας πλεονέκτημα για την RT- PCR. Μεταξύ των συστημάτων φθορίζόντων-δεικτών που χρησιμοποιούνται είναι η SYBR green και οι μοριακοί ανιχνευτές TaqMan, FRET και ποικιλίες των συστημάτων αυτών. Ένα ακόμη βασικό πλεονέκτημα της RT-PCR αφορά την ικανότητα ενίσχυσης μικρών αλληλουχιών-στόχων (60-70 bp), το οποίο μειώνει τους απαιτούμενους χρόνους για τον πολλαπλασιασμό και σε συνδυασμό με την προηγμένη τεχνολογία των real-time θερμικών κυκλοποιητών μειώνουν τόσο σημαντικά τη διάρκεια των κύκλων ώστε, σε κάποιες περιπτώσεις, οι ενισχυμένοι στόχοι να αναγνωρίζονται στα πρώτα 30 min της ενίσχυσης. Ένα άλλο πλεονέκτημα της RT-PCR είναι ότι δεν χρειάζεται η ηλεκτροφόρηση σε gel αгарόζης για την οπτικοποίηση του ενισχυμένου DNA-στόχου, το οποίο μειώνει τη συνολική διάρκεια της ανάλυσης (Levin, 2004).

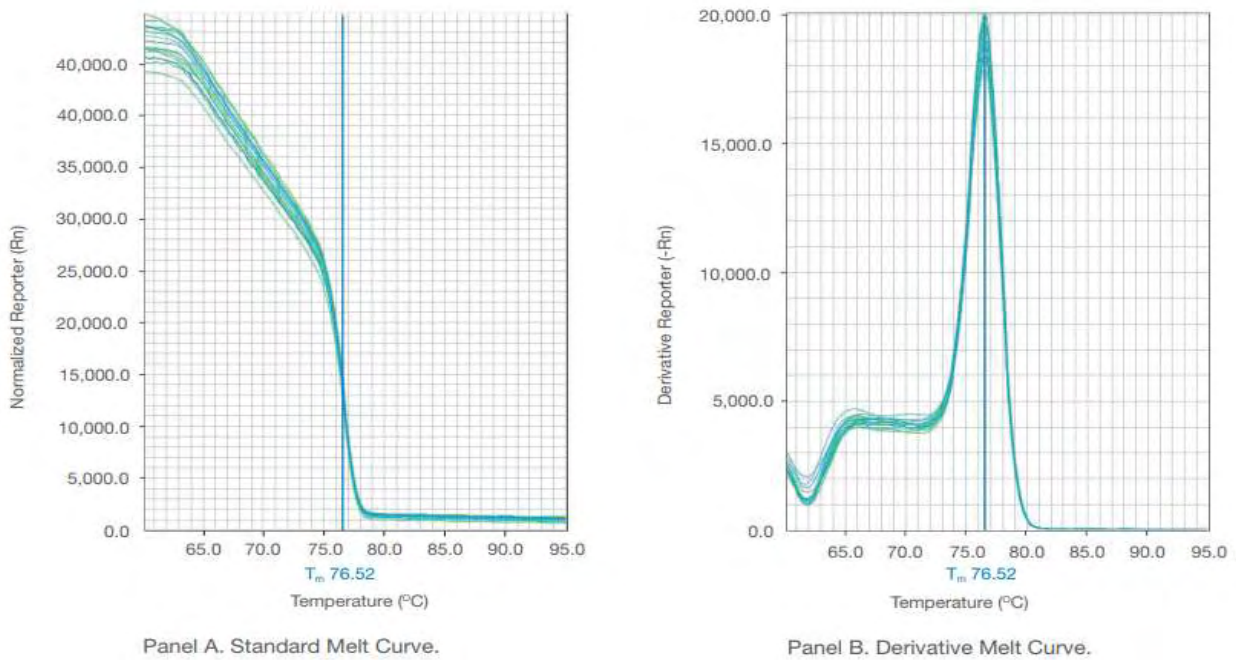
7.3 Ανάλυση υψηλής διακριτικής ικανότητας καμπυλών τήξης (High Resolution Melting analysis, HRM)

Η ανάλυση HRM έχει εμφανιστεί πρόσφατα ως μία καινοτόμος και προηγμένη μέθοδος PCR για μικροβιακή γονοτύπηση. Η HRM θεωρείται η εφαρμογή νέας γενιάς της κλασικής ανάλυσης καμπυλών τήξης. Η ικανότητα διάκρισης κομματιών DNA ακόμα και σε επίπεδο διαφοράς μιας βάσης, μπορεί να επιτευχθεί λόγω του συνδυασμού ενός βελτιωμένου συστήματος ανίχνευσης φθορισμού με εξειδικευμένο λογισμικό για την HRM και φθορίζουσες χρωστικές που προσδένονται στο δίκλωνο DNA. Στην HRM μπορούν να αναλυθούν ταυτόχρονα πολλά κομμάτια DNA και τα χαρακτηριστικά προφίλ που δίνει επιτρέπουν την διάκριση σε επίπεδο ειδών ή/και υποειδών (Erdem et al., 2016).

Ο όρος ανάλυση “high- resolution melting” (HRM) περιλαμβάνει τεχνικές ανάλυσης κομματιών DNA που αφορούν τον ακριβή προσδιορισμό της σχέσης μεταξύ της θερμοκρασίας και του μεγέθους της μετουσίωσης. Πρώτα περιγράφηκε από την ομάδα του Carl Wittwer για κλινικές εφαρμογές, η HRM γίνεται τυπικά με χρήση οργάνου της real-time PCR, αμέσως μετά την PCR. Τα πλεονεκτήματα της τεχνολογίας HRM είναι το χαμηλό της κόστος, η χρήση κοινού εξοπλισμού που είναι διαθέσιμος σε πολλά εργαστήρια και η απλότητα της προσέγγισης- με την πλειοψηφία των εφαρμογών να ενσωματώνουν μεθόδους ενός σταδίου και κλειστού tube. Ενώ η αλληλουχία ολόκληρου του γονιδιώματος μπορεί να αντικαταστήσει πολλές μεθόδους μικροβιακής γονοτύπησης, η ταχύτητα και η ευκολία της HRM καθώς και η κοινή τεχνολογία της δείχνουν ότι πρωτόκολλα μικροβιολογικών αναλύσεων που την περιλαμβάνουν μπορεί να έχουν σημαντική χρησιμότητα σε first-pass screening (Tong, Giffard, 2012).

Το δίκλωνο DNA (dsDNA) είναι πολύ σταθερό σε θερμοκρασία δωματίου, όμως καθώς αυξάνεται η θερμοκρασία αρχίζει να αποδιατάσσεται μέχρι να διαχωριστεί πλήρως σε δύο μονόκλωνες αλυσίδες. Η θερμοκρασία στην οποία το 50% του DNA έχει γίνει μονόκλωνο καλείται θερμοκρασία τήξης (T_m) και καθορίζεται εξίσου από το μήκος και την περιεκτικότητα στο ζεύγος βάσεων γουανίνη-κυτοσίνη (GC) του κομματιού DNA. Το ζεύγος βάσεων γουανίνη-κυτοσίνη (GC) καθίσταται πιο σταθερό καθώς συνδέεται με τρεις δεσμούς υδρογόνου σε αντίθεση με το ζεύγος βάσεων αδενίνη-θυμίνη (AT) που συνδέεται με δύο. Άρα οι αλληλουχίες DNA που φέρουν πολλά ζεύγη βάσεων GC θα έχουν και υψηλότερη θερμοκρασία τήξης (T_m). Η ανάλυση των καμπυλών τήξης βασίζεται στην σταδιακή αύξηση της θερμοκρασίας μετά τον τελευταίο κύκλο της PCR. Επίσης, προαπαιτούμενη είναι η παρουσία μιας φθορίζουσας χρωστικής, η οποία συνδεόμενη με τα προϊόντα της αντίδρασης δίνει στην αρχή της ανάλυσης έντονο φθορίζον σήμα, λόγω του δίκλωνου DNA των προϊόντων. Καθώς αυξάνεται η θερμοκρασία, το δίκλωνο DNA αποδιατάσσεται, απελευθερώνοντας την χρωστική και αρχίζει να παρατηρείται σταδιακή μείωση του φθορίζοντος σήματος.

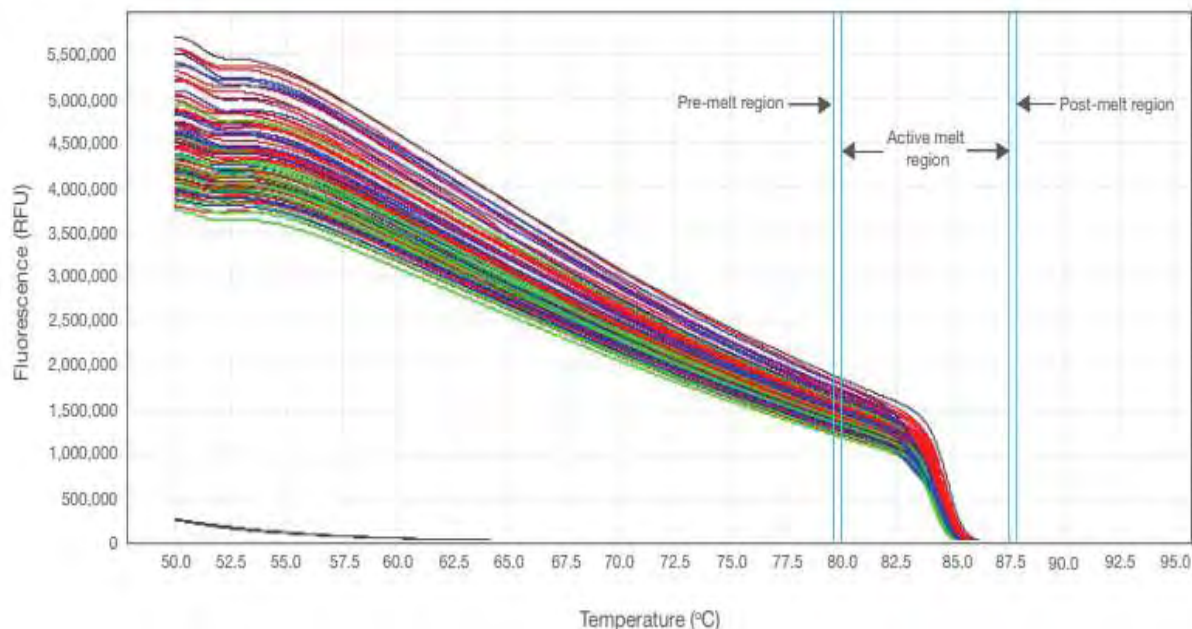
Η θερμοκρασία τήξης T_m του προϊόντος μπορεί να προσδιοριστεί από το σημείο καμψής της καμπύλης τήξης ή από την κορυφή τήξης (melting peak) που λαμβάνεται από το διάγραμμα του αρνητικού παράγωγου του φθορισμού προς τη θερμοκρασία ($-dF/dT$) ως προς την θερμοκρασία (Druml and Markl,2014).



Εικόνα 2: Διαγράμματα που προκύπτουν από τα δεδομένα μιας real-time PCR.(A) Διάγραμμα κανονικής καμπύλης τήξης, (B) Διάγραμμα με κορυφές τήξης (melting peaks) (προσαρμογή από: www.appliedbiosystems.com)

Το πρώτο διάγραμμα (Εικόνα 2A) δείχνει την καμπύλη που προκύπτει από την συσχέτιση του σήματος φθορισμού (F) ως προς την θερμοκρασία (T). Φαίνεται το αρχικό υψηλό σήμα φθορισμού όταν όλα τα προϊόντα είναι ακόμη δίκλιωνα και η μέγιστη ποσότητα της χρωστικής είναι συνδεδεμένη σε αυτά. Καθώς αυξάνεται η θερμοκρασία το σήμα φθορισμού μειώνεται. Η κάθετη γραμμή ορίζει τη θερμοκρασία τήξης T_m . Το δεύτερο διάγραμμα (Εικόνα 2B) δείχνει την κορυφή τήξης που προκύπτει από τη συσχέτιση του αρνητικού παράγωγου ($-dF/dT$) ως προς την θερμοκρασία (T). Χρησιμοποιείται ως ένας ευκολότερος τρόπος να φανεί οπτικά η θερμοκρασία τήξης (T_m).

Στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 3) παρουσιάζεται το διάγραμμα που προκύπτει από την ανάλυση HRM:



Εικόνα 3:Καμπύλες τήξης ανεπεξέργαστων δεδομένων. (προσαρμογή από: www.appliedbiosystems.com)

Οι περιοχές προ- και μετά- της τήξης ορίζονται από τα ζεύγη των κάθετων γραμμών που τοποθετούνται πριν και μετά την περιοχή της ενεργής τήξης. Η περιοχή των δεδομένων μεταξύ των κάθετων γραμμών στα αριστερά της περιοχής ενεργού τήξης χρησιμοποιείται από το λογισμικό για να οριστεί το 100% του φθορισμού όπου κάθε προϊόν είναι δίκλωνο. Αυτό το επίπεδο φαίνεται στη γραφική παράσταση της εικόνας 3 πάνω αριστερά. Η αλλαγή του σήματος φθορισμού για κάθε δείγμα, που φαίνεται στα δεξιά του σημείου 100% φθορισμού, λαμβάνεται υπόψη ως η πραγματική αλλαγή του σήματος φθορισμού και χρησιμοποιείται για να δημιουργηθεί η κανονικοποιημένη γραφική παράσταση της σχετικής καμπύλης τήξης. Η μετα-τήξης περιοχή ορίζεται από το ζεύγος των κάθετων παράλληλων γραμμών στα δεξιά της περιοχής ενεργού τήξης και χρησιμοποιείται από το λογισμικό για να καθοριστεί το σημείο 0% φθορισμού όπου κάθε προϊόν είναι πλέον μονόκλωνο.

Η κανονικοποιημένη γραφική παράσταση προσφέρει μια κλιμακωτή όψη των δεδομένων, διευκολύνοντας την διάκριση παραλλαγών στις αλληλουχίες που εμφανίζουν πραγματικές διαφορές στις καμπύλες τήξης τους. Αντιθέτως με τα ανεπεξέργαστα δεδομένα, τα οποία επηρεάζονται από τα διαφορετικά σήματα φθορισμού που δίνει το κάθε δείγμα.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Σκοπός αυτής της μελέτης ήταν η ταυτοποίηση των αλλοιωγόνων και παθογόνων μικροοργανισμών που αναπτύσσονται στον χοιρινό κιμά κατά τη διάρκεια συντήρησής του, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της ανάλυσης υψηλής διακριτικής ικανότητας καμπυλών τήξης HRM (High Resolution Melting analysis). Για την επίτευξη του σκοπού αυτού, χρησιμοποιήθηκαν πρότυπα γνωστών μικροοργανισμών, από αυτούς που θα αναμενόταν να αναπτυχθούν στον χοιρινό κιμά, ώστε να μπορούν να συγκριθούν οι καμπύλες τήξης τους με αυτές των άγνωστων μικροοργανισμών και να διαπιστωθεί αν οι άγνωστοι ταυτοποιούνται με κάποιο από τα πρότυπα.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Δειγματοληψία

Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονταν από χοιρινό κιμά ο οποίος αγοράστηκε από κατάστημα λιανικής πώλησης. Το βάρος του χοιρινού κιμά που αγοράστηκε ήταν περίπου 200g. Μόλις παραλήφθηκε στο εργαστήριο χωρίστηκε σε δείγματα των 10 g και αποθηκεύτηκε σε συντήρηση στους 4 °C.

2. Καλλιεργητική μέθοδος προσδιορισμού Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας (OMX)

Η μέθοδος που ακολουθήθηκε για τον προσδιορισμό της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας (OMX) είναι η παρακάτω:

- 1) Ασηπτική μεταφορά 10 g δείγματος σε αποστειρωμένη σακούλα (stomacher) όπου προστίθενται και 90g MRD (Maximum Recovery Diluted).
- 2) Ομογενοποίηση του μίγματος δύο διαδοχικές φορές για διαφορετικούς χρόνους, την πρώτη φορά για 180 sec ενώ την δεύτερη για 120 sec.
- 3) Διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις από την σακούλα με μεταφορά 1ml από κάθε αραιώση σε επόμενο δοκιμαστικό σωλήνα που περιέχει 9 ml MRD.
- 4) Επίστρωση 0,1 ml των επιθυμητών αραιώσεων σε τρυβλία που περιείχαν θρεπτικό υπόστρωμα Tryptone Soy Agar (TSA).
- 5) Επώαση των τρυβλίων στους 25°C για 2 ημέρες και ύστερα καταμέτρηση των αποικιών.

3. Καλλιεργητική μέθοδος προσδιορισμού E. coli/ Coliform

Η μέθοδος που ακολουθήθηκε για τον προσδιορισμό των παθογόνων μικροοργανισμών είναι η ίδια με την παραπάνω στα τρία πρώτα στάδια και:

- 4) Επίστρωση 0,1 ml των επιθυμητών αραιώσεων σε τρυβλία που περιείχαν εκλεκτικό και διαγνωστικό με χρωμογόνους παράγοντες υπόστρωμα (LABM, HAL008).
- 5) Επώαση των τρυβλίων στους 37 °C για 2 ημέρες και καταμέτρηση των αποικιών.

Τα πρότυπα των αλλοιωγόνων και των παθογόνων μικροοργανισμών που χρησιμοποιήθηκαν στην HRM ήταν αποθηκευμένα σε beads στην υπερκατάψυξη (-80 °C). Προκειμένου να γίνει η αναζωογόνησή τους, λήφθηκαν δύο beads από κάθε πρότυπο και τοποθετήθηκαν σε σωληνάκι που περιείχε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα TSB (Tryptone Soy Broth). Στη συνέχεια, τα σωληνάκια των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών επώαστηκαν στους 25 °C για 2-3 ημέρες, ενώ τα σωληνάκια των παθογόνων μικροοργανισμών επώαστηκαν στους 37 °C για 1 ημέρα. Από το κάθε σωληνάκι τοποθετήθηκε με κρίκο μία σταγόνα σε τρυβλίο TSA και επώαστηκε στους 25°C για 2 ημέρες για τους αλλοιωγόνους και στους 37 °C για 1 ημέρα για τους παθογόνους μικροοργανισμούς.

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα πρότυπα αλλοιωγόνων και παθογόνων μικροοργανισμών που χρησιμοποιήθηκαν:

Πίνακας 3: Είδη αλλοιωγόνων και παθογόνων μικροοργανισμών που χρησιμοποιήθηκαν ως πρότυπα

Αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί	Παθογόνοι μικροοργανισμοί
<i>Shewanella putrefaciens</i> ATCC 8071	<i>Escherichia coli</i> O157 Atoxinogenic
<i>Brochothrix thermosphacta</i> Br 6	<i>Listeria monocytogenes</i> Scott A
<i>Pseudomonas fluorescens</i> strain DF41TB	<i>Salmonella enteridis</i> PT 4
<i>Psychrobacter cryohalolentis</i>	<i>Salmonella enteridis</i> PT 7
<i>Psychrobacter maritimus</i> strain CAIM	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Pseudomonas veronii</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>
<i>Pseudomonas fragi</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Carnobacterium sp. eilaticum</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>Lactobacillus fuchuensis</i>	<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>enterica</i>
<i>Psychrobacter immobilis</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>
<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Vagococcus fluvialis</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>

4. Υγρή ανακαλλιέργεια βακτηρίων

Πριν την απομόνωση του DNA, έγινε υγρή ανακαλλιέργεια των βακτηρίων σε θρεπτικό υπόστρωμα LB (Luria-Bertani broth). Τα συστατικά του υποστρώματος για προετοιμασία 1L ήταν : α) πεπτόνη (10g), β) χλωριούχο νάτριο (10g), γ) εκχύλισμα ζυμομύκητα (5g). Αφού έγινε ρύθμιση του pH του υποστρώματος στο 7,5, αποστειρώθηκε στους 120 °C για 20 min.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η παρακάτω:

- 1) Τοποθέτηση 5 ml υγρού υποστρώματος LB σε falcon των 15 ml.
- 2) Από το τρυβλίο με τις αναπτυγμένες αποικίες μεταφορά, υπό άσηπτες συνθήκες, μίας αποικίας σε κάθε falcon.
- 3) Τοποθέτηση των falcon σε επωαστικό κλίβανο στους 37 °C με ανακίνηση στις 250 στροφές για 24h.



Εικόνα 1: Επωαστικός κλίβανος με ανακίνηση

5. Απομόνωση DNA

Τα βήματα που ακολουθηθήκαν για την απομόνωση είναι τα εξής:

- 1) Φυγοκέντρωση 1ml της υγρής καλλιέργειας στα 14000g για 10 min και απόρριψη του υπερκείμενου υγρού.
- 2) Προσθήκη 500 μl διαλύματος buffer λυσοζύμης (25% [wt/vol] σουκρόζη, 5mg λυσοζύμη/ml), φυγοκέντρωση στα 14000g για 10 min και απόρριψη του υπερκείμενου υγρού.
- 3) Προσθήκη 50 μl διαλύματος λυσοζύμης (5mg/ml) και τοποθέτηση σε υδατόλουτρο στους 37 °C για 30 min.
- 4) Προσθήκη 300 μl διαλύματος λύσης (2% Triton X-100, 1% sodium dodecyl sulfate, 100 mM NaCl, 10 mM Tris, 1mM EDTA, pH 8), 300 μl διαλύματος φαινόλης-χλωροφόρμιου (25:25) και 0,3 g γυάλινων σφαιριδίων. Ανατάραξή τους σε Mini-Bead Beater, στη μέγιστη ταχύτητα, για 30 sec, τρεις φορές με ενδιάμεσα διαλείμματα των 15 sec.
- 5) Προσθήκη 300 μl διαλύματος 10 mM Tris - 5 mM EDTA (pH 8) και φυγοκέντρωση στα 12000 g για 10 min.
- 6) Μεταφορά της υπερκείμενης φάσης σε αποστειρωμένο eppendorf, προσθήκη 1ml αιθανόλης 70% και φυγοκέντρωση στα 14000 g για 10 min.
- 7) Απόρριψη του υπερκείμενου υγρού και άφεση των καπακιών των eppendorf ανοιχτών ώστε να εξατμιστεί η περίσσεια αιθανόλης για 5 min.
- 8) Προσθήκη 100 μl διαλύματος Tris-EDTA (TE) 1X, 2 μl διαλύματος RNase (10 mg/ml) και τοποθέτηση σε υδατόλουτρο στους 37 °C για 1h.

Στο τέλος της διαδικασίας απομόνωσης τα δείγματα αποθηκεύονταν στην κατάψυξη (-20 °C) μέχρι να χρησιμοποιηθούν στα επόμενα στάδια του πειράματος.

6. Ανάλυση υψηλής διακριτικής ικανότητας καμπυλών τήξης (HRM, High Resolution Melting analysis)

Η διαδικασία της ανάλυσης HRM περιλαμβάνει μια real-time PCR και ακολούθως την HRM.

Το μείγμα που χρησιμοποιήθηκε, κατά την προετοιμασία των δειγμάτων DNA για την real-time PCR, αποτελούνταν από: Buffer B 1X, MgCl₂ (0,5 mM), dNTP's (0,2 mM), τους δύο εκκινητές (0,2 μM), τη χρωστική Syto® 9 green fluorescent nucleic acid stain (1,2 μM), την πολυμεράση KAPA Taq (1U/ml) και water for injection. Στο μείγμα αυτό γινόταν προσθήκη 2 μl DNA κάθε διαφορετικού μικροοργανισμού προκειμένου να προετοιμαστούν τα διαφορετικά δείγματα. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν, προκειμένου να ενισχυθεί η αλληλουχία του γονιδίου 16S rRNA, ήταν οι S-DBact-0341-b-S-17 (F): 5'-CCT ACG GGN GGC WGC AG-3' και S-D-Bact-078-5-a-A-21 (R): 5'-GAC TAC HVG GGT ATC TAA TCC-3'.

Η αρχική αποδιάταξη πραγματοποιούνταν στους 95 °C για 5 min. Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα της real-time PCR ήταν : αποδιάταξη στους 95 °C για 30 sec, υβριδισμός των εκκινητών με την αλληλουχία στόχο στους 53 °C για 30 sec, σύνθεση συμπληρωματικών κλώνων DNA παρουσία της πολυμεράσης στους 72 °C για 20 sec. Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε για 40 κύκλους και ακολούθουσε η HRM. Το πρόγραμμα της HRM περιλάμβανε τήξη του προϊόντος PCR στο θερμοκρασιακό εύρος 75-92 °C, με αύξηση κατά 0,1 βαθμούς και αναμονή 2 sec σε κάθε βήμα.

Η ανάλυση HRM πραγματοποιήθηκε σε θερμικό κυκλοποιητή Corbett Rotor Gene 6000 που φαίνεται στην παρακάτω εικόνα:



Εικόνα 2: Θερμικός κυκλοποιητής Corbett Rotor Gene 6000

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

1. Αποτελέσματα μικροβιολογικής ανάλυσης

Όσον αφορά τις μικροβιολογικές αναλύσεις, στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι πληθυσμοί των βακτηρίων που προέκυψαν από τις μετρήσεις στα τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα TSA για την Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (OMX) και στα τρυβλία με το εκλεκτικό με χρωμογόνους παράγοντες υπόστρωμα για *E. coli*/ Ολικά κολοβακτηριοειδή.

Πίνακας 4: Πληθυσμοί βακτηρίων στα θρεπτικά υποστρώματα TSA και Harlequin για τις διαφορετικές ημέρες συντήρησης του χοιρινού κιμά

Ημέρα συντήρησης	OMX	<i>E. coli</i> /Coliform
Day 0	8,24 log cfu/g	6,1 log cfu/g
Day 2	8,77 log cfu/g	6,3 log cfu/g
Day 4	9,11 log cfu/g	6,24 log cfu/g

Σε μελέτη που έγινε από τους Girova και Gochev (2009), τα βακτήρια ήταν η επικρατέστερη ομάδα μικροοργανισμών που ανιχνεύτηκε σε κιμά που συντηρήθηκε υπό ψύξη και ξεπέρασαν κατά πολύ τις ομάδες των ζυμών και των μυκήτων. Τα βακτήρια αντιπροσώπευσαν το 97% του συνόλου των μικροοργανισμών που εντοπίστηκαν και το 88% του συνολικού πληθυσμού των μικροοργανισμών δεικτών υγιεινής ανήκε στην οικογένεια *Enterobacteriaceae*. Το 90% των *Enterobacteriaceae* ανήκε στα coliform και το 10% ανήκε στην ομάδα *Proteus-Providencia-Morganella*.

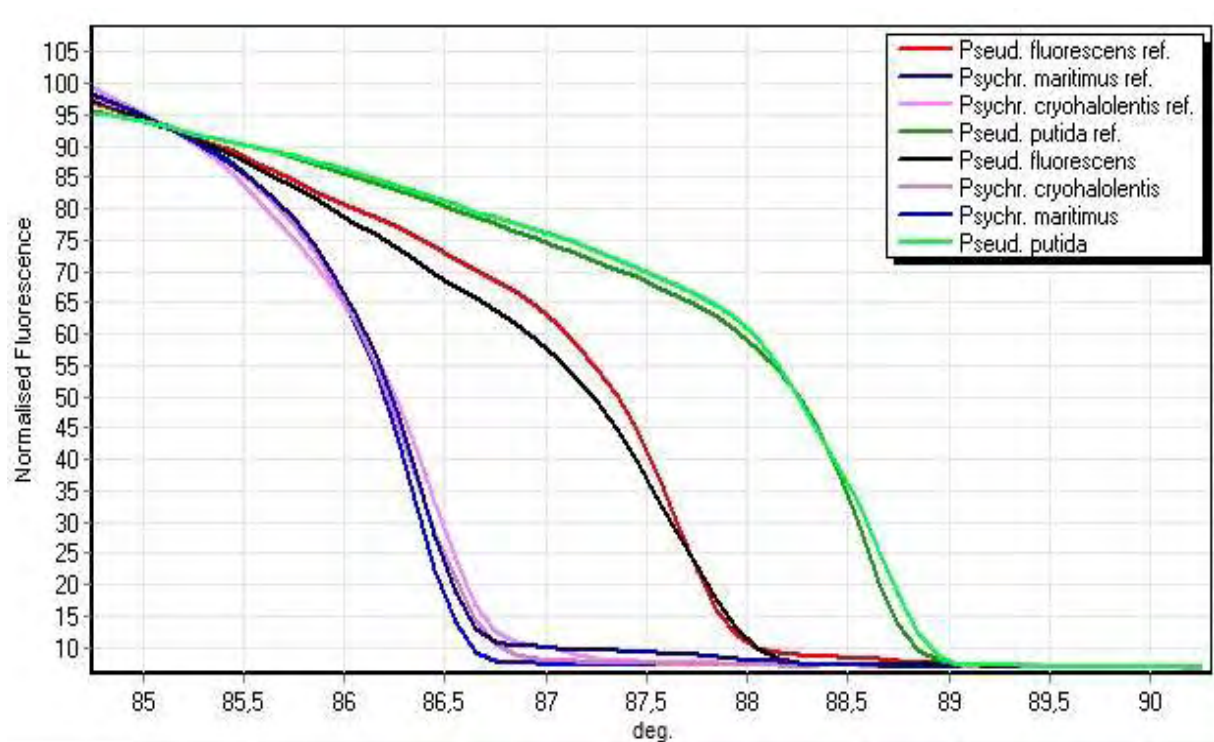
Σε μικροβιολογική ανάλυση χοιρινού κιμά η κατανομή της OMX ήταν $6,8 \pm 1,0$ log cfu/g, με εύρος τιμών από 4,9 έως 8,7 log cfu/g. Η μέση λογαριθμική τιμή για τα ολικά κολοβακτηριοειδή ήταν $2,9 \pm 1,1$ log cfu/g. Η μέση τιμή της OMX για χοιρινό κιμά που είχε αγοραστεί από κρεοπωλεία ήταν $6,7 \pm 1,0$ log cfu/g ενώ για χοιρινό κιμά που είχε αγοραστεί από supermarket ήταν $7,2 \pm 0,7$ log cfu/g (Andritsos et al., 2012). Σε άλλη μελέτη που έγινε σε 60 δείγματα κιμά η OMX κυμαινόταν μεταξύ $2,7 \times 10^4$ - 2×10^8 cfu/g ($4,43$ – $8,3$ log cfu/g) ενώ τα ολικά κολοβακτηριοειδή κυμαίνονταν μεταξύ $3,5 \times 10^2$ - $4,5 \times 10^7$ cfu/g ($2,54$ – $7,65$ log cfu/g) (Kimiran-Erdem et al., 2014).

2. Αποτελέσματα ανάλυσης HRM

Συνολικά εξετάστηκαν 304 δείγματα DNA των άγνωστων μικροοργανισμών που είχαν αναπτυχθεί στα τρυβλία σε σύγκριση με 24 πρότυπα γνωστών μικροοργανισμών. Από τα 304 δείγματα αντιστοιχήθηκαν με τα πρότυπα τα 142.

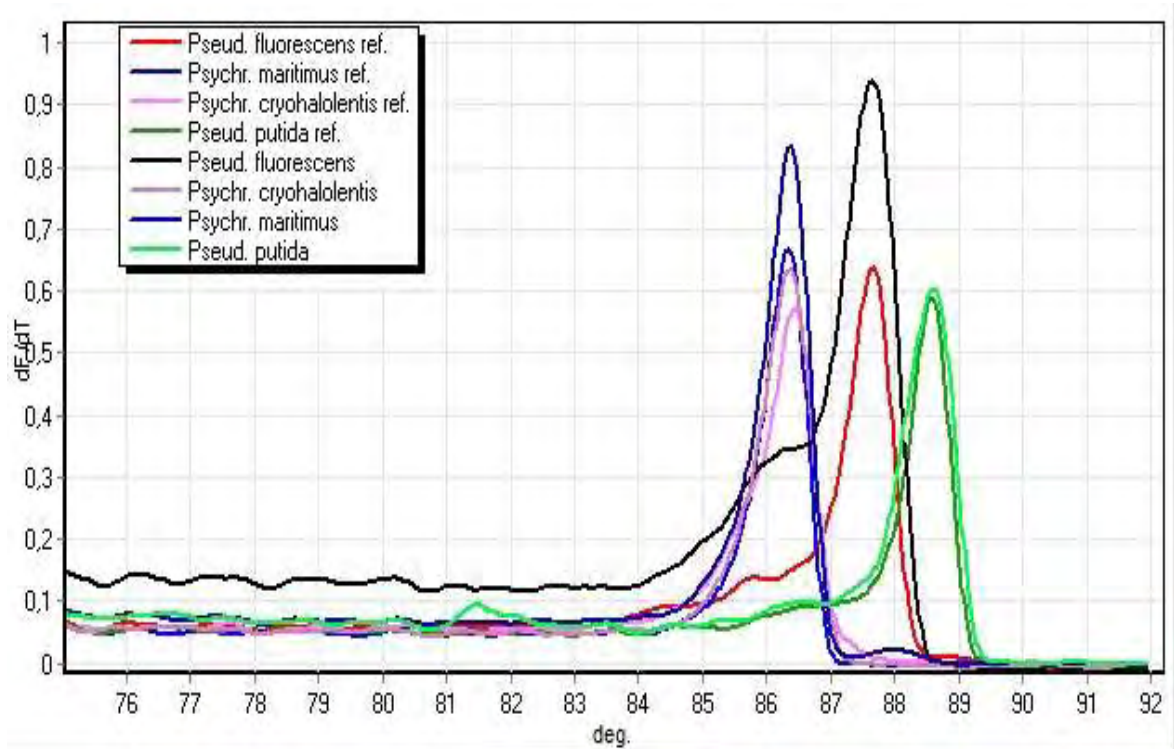
Παρακάτω παρουσιάζονται οι τύποι των διαγραμμάτων που προέκυψαν από την ανάλυση HRM των άγνωστων μικροοργανισμών που αναπτύχθηκαν κατά την συντήρηση του χοιρινού κιμά για διάστημα τεσσάρων ημερών.

Στο παρακάτω διάγραμμα (Διάγραμμα 2) φαίνονται οι χαρακτηριστικές σιγμοειδείς καμπύλες τήξης που δίνουν οι μικροοργανισμοί κατά την ανάλυσή τους και παρατηρούμε την ομοιότητα των καμπυλών των άγνωστων μικροοργανισμών με τις καμπύλες των προτύπων μικροοργανισμών. Με αυτόν τον τρόπο, προσδιορίστηκε το είδος των άγνωστων μικροοργανισμών, π.χ. η καμπύλη τήξης του πρότυπου της *Pseudomonas putida* (*Ps.putida* ref.) συμπίπτει με την καμπύλη τήξης του άγνωστου μικροοργανισμού, άρα συμπεραίνουμε ότι πρόκειται για *Pseudomonas putida*.



Διάγραμμα 2: Καμπύλες τήξης των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών, πρότυπων και άγνωστων (μετά από κανονικοποίηση)

Προκειμένου να επιτευχθεί καλύτερος διαχωρισμός μεταξύ των ειδών των βακτηρίων, τα δεδομένα φθορισμού που προκύπτουν από την HRM θα πρέπει να κανονικοποιούνται έτσι ώστε να έχουν κοινή αρχή και σχετικές τιμές φθορισμού που θα εκφράζονται ως ποσοστά της διαφοράς μεταξύ της μέγιστης και της ελάχιστης τιμής φθορισμού για κάθε αντίδραση (Wittwer et al., 1997).

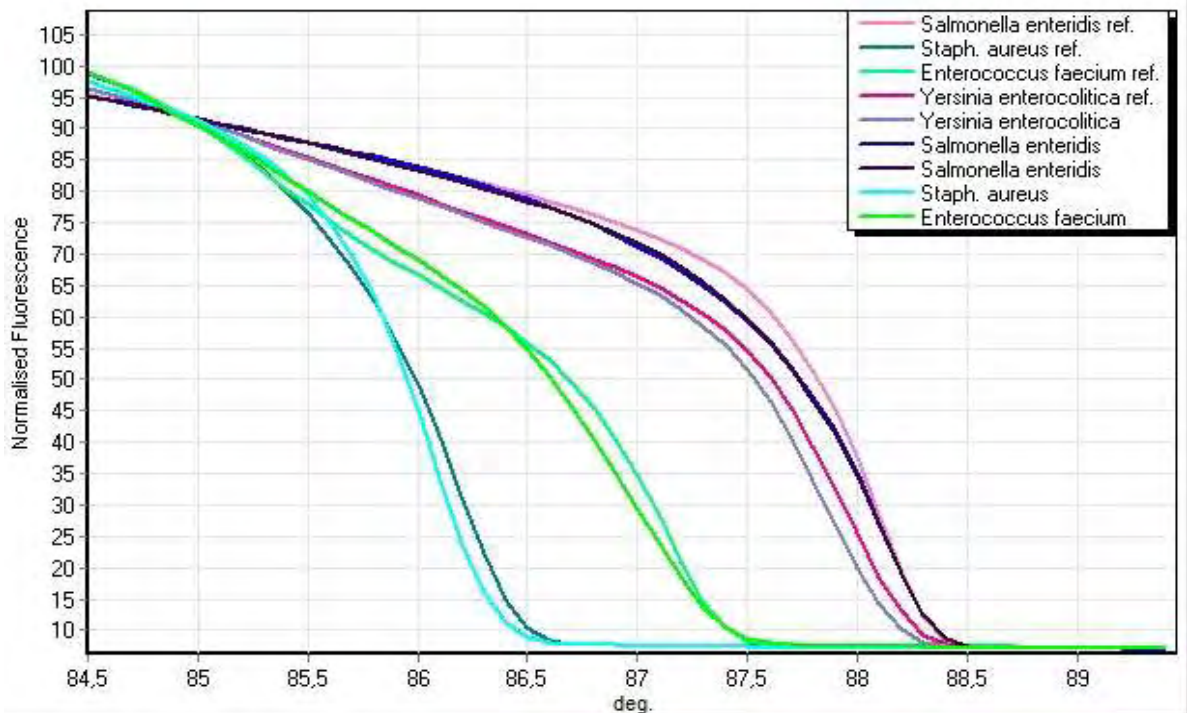


Διάγραμμα 3: Κορυφές τήξης των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών, πρότυπων και άγνωστων

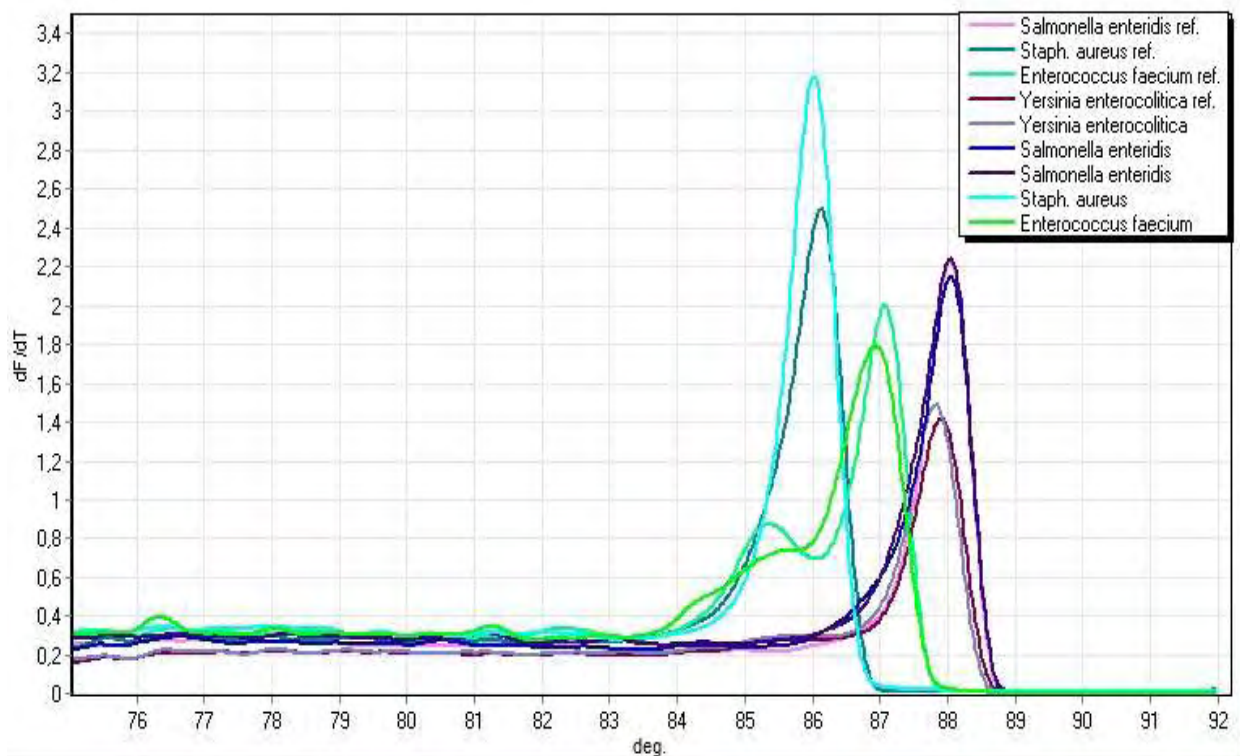
Στο παραπάνω διάγραμμα (Διάγραμμα 3) μπορούμε να παρατηρήσουμε πόσο κοντινές είναι οι κορυφές τήξης των *Psychrobacter maritimus* και *Psychrobacter cryohalolentis* που ανήκουν στο ίδιο γένος όπως το ίδιο συμβαίνει και με τις καμπύλες τήξης τους (Διάγραμμα 2). Αυτό συμβαίνει γιατί ανήκουν στο ίδιο γένος και οι αλληλουχίες του γονιδίου 16S rRNA, στο οποίο στοχεύουν οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν, είναι αρκετά όμοιες. Γι' αυτόν τον λόγο, οι αλληλουχίες του γονιδίου 16S rRNA μπορούν να παρέχουν μόνο μια αρχική εκτίμηση της ταυτότητας των ειδών εντός του ίδιου γένους και θα πρέπει απαραίτητως να υπάρχουν επιπλέον φαινοτυπικά και άλλα γενοτυπικά δεδομένα για αξιόπιστη ταυτοποίηση (Bowman, 2006).

Προκειμένου να αντιμετωπιστεί το πρόβλημα του διαχωρισμού των ειδών εντός του ίδιου γένους η Andini κ.α., (2017) μελέτησαν την επιλογή της εσωτερικά μεταγραφόμενης περιοχής (ITS) μεταξύ του 16S και του 23S rDNA, του ριβοσωμικού οπερονίου *rrn*, ως εναλλακτική της παραδοσιακής περιοχής του 16S rDNA για φυλογενετική ταξινόμηση. Όλα τα είδη του ίδιου γένους παρουσίασαν έντονη ποικιλομορφία στις καμπύλες τήξης τους όπως και τα διαφορετικά γένη μεταξύ τους. Επίσης, οι κορυφές τήξης της ITS είναι πολλαπλές και σε μεγαλύτερο εύρος θερμοκρασιών τήξης (T_m) (15 °C σε σύγκριση με 5 °C του 16S).

Ακολουθούν οι ίδιοι τύποι διαγραμμάτων που προέκυψαν για τους παθογόνους μικροοργανισμούς.



Διάγραμμα 4: Καμπύλες τήξης των παθογόνων μικροοργανισμών, πρότυπων και των άγνωστων (μετά από κανονικοποίηση)



Διάγραμμα 5: Κορυφές τήξης των παθογόνων μικροοργανισμών, πρότυπων και άγνωστων

2.1 Κυριότεροι αλλοιωγόνοι και παθογόνοι μικροοργανισμοί που ταυτοποιήθηκαν

2.1.1 Αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί

Οι επικρατέστεροι μικροοργανισμοί αλλοίωσης που ταυτοποιήθηκαν ήταν του γένους *Psychrobacter* όλες τις ημέρες συντήρησης και μόνο την τέταρτη ημέρα συντήρησης βακτήρια του γένους *Pseudomonas* εμφάνισαν το ίδιο ποσοστό με τα *Psychrobacter*.

Psychrobacter

Το γένος *Psychrobacter* προτάθηκε πρώτη φορά από τους Juni και Heym το 1986 και είχε οριστεί ως μια ομάδα μικροοργανισμών που αναπτύσσονται σε χαμηλές θερμοκρασίες και είναι αερόβιοι, θετικοί στην καταλάση, θετικοί στην οξειδάση, μη σπορογόνοι, αρνητικοί κατά Gram κοκκοβάκιλοι. Πριν από αυτήν την ταξινόμηση, οι μικροοργανισμοί αυτής της ομάδας ανήκαν στο γένος *Acinetobacter* και περιγράφονταν ως ψυχρότροφα βακτήρια που μοιάζουν με *Moraxella*.

Όσον αφορά τους παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξή τους, το ιδανικό εύρος θερμοκρασιών είναι 20°C - 30 °C ενώ το γενικότερο εύρος ανάπτυξής τους κυμαίνεται από -18 °C έως 37 °C. Τα περισσότερα είδη είναι αλόφιλα και μπορούν να αναπτυχθούν σε περιεκτικότητες NaCl \geq 10% (García-Lopez et al.,2014). Οι προτιμητέες πηγές άνθρακα για τα *Psychrobacter* είναι τα οργανικά οξέα και τα αμινοξέα. Οι υδατάνθρακες και γενικότερα άλλες ενώσεις δεν καταναλώνονται από τα *Psychrobacter*. Κάποια είδη του γένους μπορούν να παράγουν λιπάσες και να αποσυνθέσουν κάποια υποστρώματα τα οποία είναι κοινά, αλλά συνήθως δεν καταβολίζονται από αρνητικά κατά Gram βακτήρια (Bowman, 2006).

Pseudomonas

Οι ψευδομονάδες είναι μεσόφιλα βακτήρια, άρα το ιδανικό εύρος θερμοκρασιών για την ανάπτυξή τους είναι 25 °C – 35°C. Λόγω της ετερογένειας της ομάδας των ψευδομονάδων υπάρχουν και ψυχρότροφες, οι οποίες μπορούν να αναπτυχθούν σε θερμοκρασίες ψύξης ενώ δεν μπορούν να επιβιώσουν σε υψηλές θερμοκρασίες. Το ιδανικό pH για τα στελέχη *Pseudomonas* είναι πάνω από 5.8. Σε χαμηλότερο pH επιβραδύνεται σημαντικά ο ρυθμός ανάπτυξης των βακτηρίων (Andreani & Fasolato, 2017).

Οι ψευδομονάδες μεταβολίζουν κατά προτίμηση την γλυκόζη και οδηγούν τα τρόφιμα σε οριακά αποδεκτό οργανοληπτικά επίπεδο. Όταν ο ρυθμός διάχυσης της γλυκόζης από τον υποδόριο ιστό προς την επιφάνεια του κρέατος δεν μπορεί να ανταποκριθεί στον μεγάλο αριθμό των βακτηρίων αλλοίωσης ($>10^8$ cfu/g), ξεκινά η αποσύνθεση των αμινοξέων (κυστεΐνη, κυστίνη και μεθειονίνη) και των πρωτεϊνών. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό αμμωνίας, αμινών (καδαβερίνη, πουτρεσκίνη, σπερμιδίνη, σπερμίνη, ισταμίνη και τυραμίνη) και σουλφιδίων (υδρόθειο, μεθυλοσουλφίδιο και διμεθυλοσουλφίδιο) (Gill, Newton, 1977).

Σχετικά με την ταυτοποίηση στελεχών *Pseudomonas* με μοριακές μεθόδους, παρόλο που το oligotyping βασίζεται στην ανάλυση ενός νουκλεοτίδιου και καλύπτει την ποικιλομορφία που υπάρχει στην περιοχή που αλληλουχείται, δεν μπορεί να αντιμετωπίσει τους βιολογικούς περιορισμούς του γονιδίου 16S rRNA. Είναι πολύ πιθανό να υπάρχουν πολλαπλά, ξεχωριστά στελέχη *Pseudomonas*, τα οποία είναι πανομοιότυπα στην περιοχή αλληλούχισης του γονιδίου 16S rRNA. Συνεπώς, η βιοποικιλότητα του γένους *Pseudomonas* μπορεί ακόμη να υποτιμάται και κάποια από τα πιο συνηθισμένα και πολυάριθμα oligotypes να αντιπροσωπεύουν συμπυκνωμένα στελέχη *Pseudomonas* με πανομοιότυπες V1-V3 περιοχές του γονιδίου 16S rRNA (Stellato et al., 2017).

2.1.2 Παθογόνοι μικροοργανισμοί

Από τους παθογόνους μικροοργανισμούς που ταυτοποιήθηκαν στον χοιρινό κιμά τα μεγαλύτερα ποσοστά ήταν της *Yersinia enterocolitica* όλες τις ημέρες συντήρησης και του *Staphylococcus aureus* μόνο την πρώτη ημέρα συντήρησης που εμφάνισε το ίδιο ποσοστό με την *Yersinia*.

Yersinia

Το γένος *Yersinia* αποτελείται κυρίως από 12 είδη: *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*, *Y. frederiksenii*, *Y. kristensenii*, *Y. intermedia*, *Y. aldovae*, *Y. mollaretii*, *Y. bercovieri*, *Y. rohdei*, *Y. ruckeri* and *Y. aleksiciae*. Μόνο η *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* και μερικά είδη *Y. enterocolitica* είναι ανθρώπινα παθογόνα. Το *Y. pestis*, είναι ο αιτιολογικός παράγοντας της πανούκλας, δεν βρίσκεται στην Ευρώπη και δεν είναι τροφιμογενές παθογόνο. Η *Y. enterocolitica* και η *Y. pseudotuberculosis* είναι ευρέως διαδεδομένες στην Ευρώπη και έχουν τα χαρακτηριστικά των τυπικών εντεροπαθογόνων (μετάδοση διά της κοπρανο-στοματικής οδού, με μέρος του κύκλου ζωής τους να είναι στο περιβάλλον και υπεύθυνα για εντερικά συμπτώματα)

Η *Yersinia enterocolitica* είναι από τα πιο συνηθισμένα είδη που σχετίζονται με ανθρώπινες μολύνσεις στις περισσότερες χώρες της Ευρώπης. Οι μολύνσεις από *Y. pseudotuberculosis* παρατηρούνται κυρίως στο Βορειο-Ανατολικό τμήμα της Ευρώπης (Φιλανδία και Ρωσία) (Jalava et al., 2004). Όλα τα παθογόνα είδη *Yersinia* φέρουν ένα πλασμίδιο λοιμογόνου ικανότητας (pYV) το οποίο είναι απαραίτητο για το φαινότυπο της λοιμογόνου ικανότητας. Επιπρόσθετα, το υποσύνολο αυτών των ειδών φέρει και τη νησίδα παθογένειας (HPI) που συνεισφέρει στην ικανότητα διάδοσης της μόλυνσης.

Yersinia enterocolitica

Η *Y. enterocolitica* χωρίζεται σε 6 βιότυπους (1A, 1B, 2, 3, 4 και 5) και σε πολυάριθμους ορότυπους (>48).

Τα στελέχη της *Y. enterocolitica* μπορούν να χωριστούν σε τρεις ομάδες παθογένειας:

HP = Υψηλής παθογένειας (High pathogenicity) (pYV+, HPI+): βιότυπος 1B

P = Μέτριας παθογένειας (Moderate pathogenicity) (pYV+, HPI-): βιότυποι 2 έως 5

NP = Μη παθογένειας (No pathogenicity) (pYV-, HPI-): βιότυποι 1A.

Τα απομονωμένα στελέχη του υψηλά παθογενή βιότυπου 1B εντοπίζονται κυρίως στην Βόρεια Αμερική και ακολούθως στην Ιαπωνία αλλά είναι εξαιρετικά σπάνια στην Ευρώπη. Τα επιδημιολογικά τους χαρακτηριστικά είναι ξεκάθαρα διαφορετικά από άλλα παθογόνα στελέχη *Y. enterocolitica*: μπορούν να εντοπιστούν στο περιβάλλον (συμπεριλαμβανόμενου του νερού) και είναι υπεύθυνα για εμφάνιση κρουσμάτων στους ανθρώπους. Στελέχη του βιότυπου 4 (ορότυπος O:3) και βιότυπου 2 (ορότυπος O:9) σχετίζονται συνήθως με ανθρώπινες μολύνσεις στην Ευρώπη. Ο βιότυπος 4 κυριαρχεί στα περισσότερα κράτη μέλη. Όμως, ο βιότυπος 2 φαίνεται να είναι ο κύριος βιότυπος στο Ηνωμένο Βασίλειο και σε κάποια άλλα κράτη μέλη. Σπάνια αναφέρεται απομόνωση αυτών των βιότυπων από το περιβάλλον. Τα ζώα (χοίροι και βοοειδή) είναι τα κύρια υπόδοχα και τα ανθρώπινα κρούσματα είναι συνήθως σποραδικά. Τα στελέχη του βιότυπου 3 δεν απομονώνονται συνήθως και τα στελέχη του βιότυπου 5 είναι εξαιρετικά σπάνια.

Σε αντίθεση, τα μη παθογόνα στελέχη του βιότυπου 1A βρίσκονται ευρέως στο περιβάλλον και απομονώνονται συχνά από τα τρόφιμα. Εντοπίζονται συχνά στα ανθρώπινα κόπρανα αλλά δεν θεωρείται ότι δημιουργούν αποικίες στην ανθρώπινη γαστρεντερική οδό. Παρόλο που έχει προταθεί η δυνατότητά τους να έχουν ιδιότητες λοιμογόνου ικανότητας, δεν έχουν δοθεί μέχρι τώρα σταθερές αποδείξεις για την υποστήριξη αυτής της υπόθεσης (EFSA, 2007).

Σύμφωνα με το ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control) το 2016 παρουσιάστηκαν 6918 επιβεβαιωμένα κρούσματα γερσινίωσης σε χώρες της ΕΕ/ΕΟΧ εκ των οποίων τα 6860 ήταν σε κράτη μέλη της ΕΕ. Οι περισσότερες καταγεγραμμένες περιπτώσεις ήταν στην Γερμανία (2764) και το μεγαλύτερο ποσοστό των ατόμων που την εμφάνισε ανήκε στην ηλικιακή ομάδα 5-14. Στην ΕΕ συνολικά, η πιο ευπαθής ηλικιακή ομάδα ήταν η 0- 4 και ακολούθως η 5-14.

Σε μία ποιοτική ανάλυση κινδύνου, η *Y. enterocolitica* αναγνωρίστηκε μαζί με την *Salmonella* spp., το *Toxoplasma gondii* και την *Trichinella* sp., ως ένας από τους πιο συχνά εμφανιζόμενους βιολογικούς κινδύνους κατά την επιθεώρηση χοιρινού κρέατος (EFSA Panel in Biological Hazards, 2011). Η εντεροπαθογόνος *Yersinia* δεν εμφανίζει ορατά κλινικά συμπτώματα στους χοίρους και έτσι οι χοίροι που την φέρουν δεν μπορούν να αναγνωριστούν στον έλεγχο πριν από την σφαγή, κατά την διαδικασία της σφαγής ή στον έλεγχο του κρέατος μετά την σφαγή. Προκειμένου να βρεθούν πιθανά μέτρα ελέγχου για την εντεροπαθογόνο *Yersinia*, είναι απαραίτητο να εντοπιστούν οι οδοί μόλυνσης και οι παράγοντες που επηρεάζουν την εμφάνιση αυτού του παθογόνου στην αλυσίδα παραγωγής χοιρινού κρέατος από την φάρμα μέχρι το πιάτο του καταναλωτή (Laukkanen- Ninios et al., 2014).

Η επιδημιολογία των μολύνσεων από *Yersinia enterocolitica* είναι πολύπλοκη και παραμένει ελάχιστα κατανοητή. Στις περισσότερες περιπτώσεις τα κρούσματα γερσινίωσης εμφανίζονται σποραδικά χωρίς να είναι προφανής η πηγή. Οι κύριες πηγές της ανθρώπινης μόλυνσης θεωρούνται ότι είναι οι χοίροι και τα χοιρινά προϊόντα, καθώς οι χοίροι αποτελούν κύριο υπόδοχο της παθογόνου *Y. enterocolitica*, όμως δεν υπάρχουν ξεκάθαρα στοιχεία για την ύπαρξη αυτής της οδού μετάδοσης. Ο ρυθμός ανίχνευσης της *Y. enterocolitica*, με χρήση της PCR, στα ωμά χοιρινά προϊόντα είναι υψηλός, γεγονός το οποίο προωθεί την υπόθεση ότι τα προϊόντα αυτά αποτελούν έναν σύνδεσμο μετάδοσης μεταξύ χοίρων και ανθρώπων (Fredriksson- Ahomaa et al., 2006). Σε μελέτη που έγινε, οι γενότυποι της *Yersinia* που λήφθηκαν από χοιρινές γλώσσες και

χοιρινό κιμά ήταν πανομοιότυποι με αυτούς που βρέθηκαν σε ανθρώπους, γεγονός το οποίο υποστηρίζει την συσχέτιση της γερσινίωσης με την κατανάλωση χοιρινού κρέατος (Fredriksson- Ahomaa et al., 2001α).

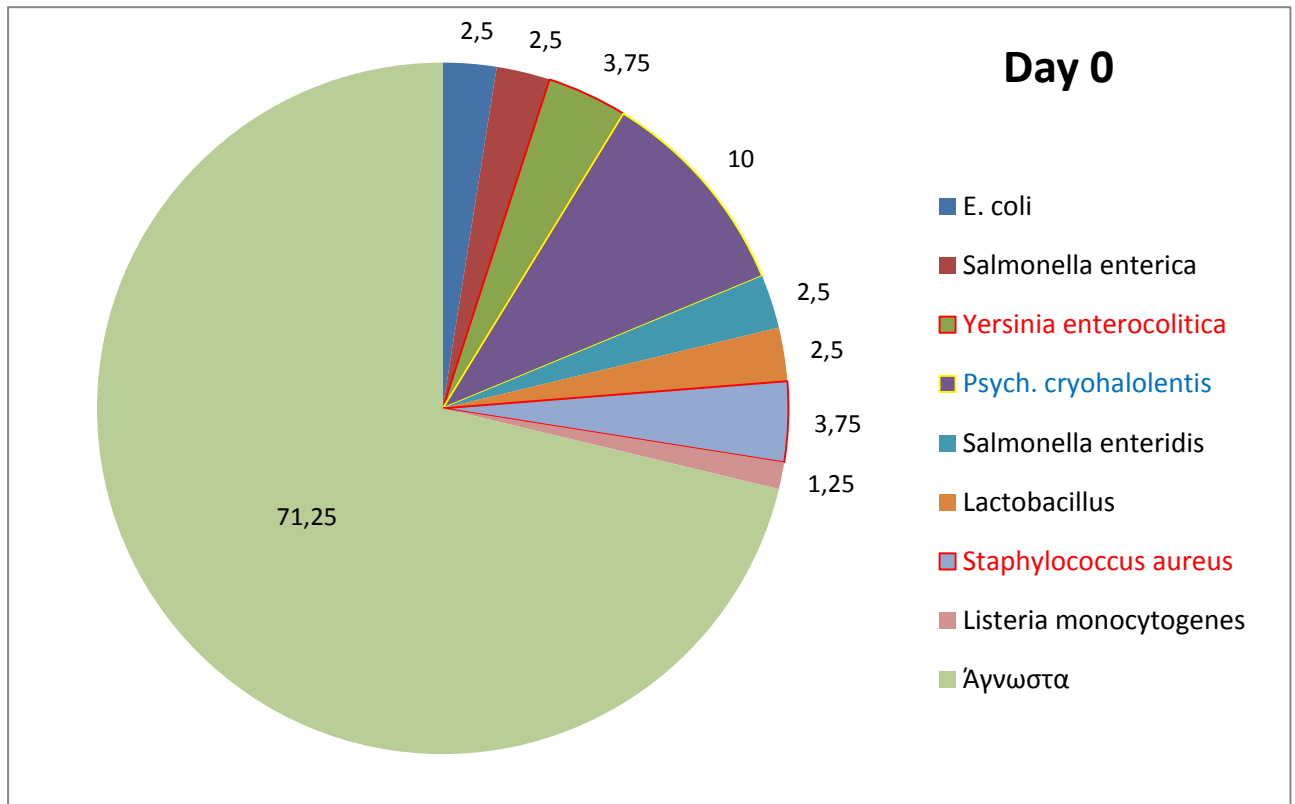
Staphylococcus aureus

Ο *Staphylococcus aureus* είναι προαιρετικά αναερόβιος, θετικός κατά Gram κόκκος, είναι μη κινητός και θετικός στην κοαγκουλάση. Τα κύτταρά του είναι σφαιρικοί μονοί ή κατά ζεύγη κόκκοι ή σχηματίζουν βοτρυοειδείς συστάδες. Κάποια στελέχη του *S. aureus* μπορούν και παράγουν εντεροτοξίνες οι οποίες είναι ο αιτιολογικός παράγοντας της τροφικής δηλητηρίασης από σταφυλόκοκκο. Όσον αφορά τις συνθήκες που επηρεάζουν την ανάπτυξή του:

- 1) Θερμοκρασία: Αναπτύσσεται σε εύρος θερμοκρασιών 7°C – 48°C. Η ιδανική θερμοκρασία παραγωγής της εντεροτοξίνης είναι 40 °C - 45 °C, ενώ μπορεί να παραχθεί σε εύρος θερμοκρασιών 10 °C - 46 °C. Όσο η θερμοκρασία ανάπτυξης του *S. aureus* απομακρύνεται από το ιδανικό εύρος θερμοκρασιών παραγωγής της εντεροτοξίνης, τόσο μειώνεται και ο ρυθμός παραγωγής της.
- 2) pH: Αναπτύσσεται σε pH 4.0-9.0, ενώ το άριστο pH για την ανάπτυξή του είναι 6-7.
- 3) NaCl: Τα περισσότερα στελέχη αναπτύσσονται σε συγκέντρωση NaCl 10%, ενώ ορισμένα μπορούν να αναπτυχθούν και σε συγκέντρωση NaCl 20%. Όσον αφορά την παραγωγή εντεροτοξίνης, όταν η συγκέντρωση NaCl ξεπερνά το 10% δεν παράγεται εντεροτοξίνη των τύπων A,B και C.
- 4) Ενεργότητα νερού, a_w: Η ελάχιστη τιμή ενεργότητας νερού για την ανάπτυξη του *S. aureus* σε αερόβιες συνθήκες είναι 0,86 ενώ σε αναερόβιες 0,90. Με ελάχιστη μείωση της ενεργότητας νερού (π.χ. από 0,99 σε 0,97) παρατηρείται δραματική μείωση της παραγωγής εντεροτοξίνης (π.χ. από 55 µg/ml σε 60h σε 1 µg/ml σε 60h για τις παραπάνω a_w αντίστοιχα) (Κοτζεκίδου,2007).

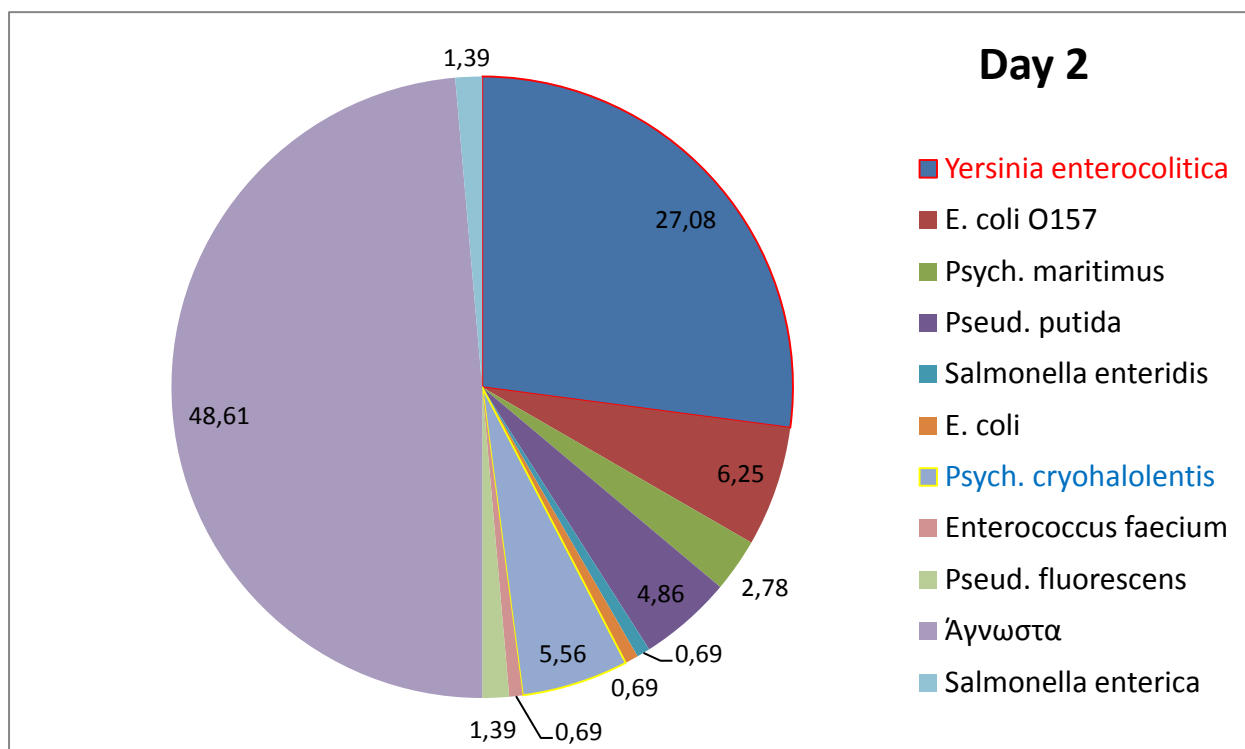
Οι προαναφερθείσες ιδανικές συνθήκες ανάπτυξης δικαιολογούν την παρουσία και ανάπτυξη του *S. aureus* σε πληθώρα τροφίμων. Καθώς ο *S. aureus* δεν παράγει σπόρια, η θέρμανση του τροφίμου που τον περιέχει είναι αρκετή για να αποφευχθεί η δράση του. Παρ' όλα αυτά, εξακολουθεί να αποτελεί κύρια αιτία τροφιμογενών νόσων επειδή μπορεί να επιμολύνει τα τρόφιμα κατά τις διαδικασίες προετοιμασίας και επεξεργασίας. Ο *Staphylococcus aureus* εντοπίζεται στα ρουθούνια, το δέρμα και το τρίχωμα των ομοιόθερων ζώων. Επίσης, το 30-50% του ανθρώπινου πληθυσμού είναι φορείς του (Le Loir et al.,2003). Η κύρια πηγή επιμόλυνσης των τροφίμων στις τροφιμογενείς νόσους είναι οι χειριστές των τροφίμων. Τα τρόφιμα μολύνονται συνήθως μετά την επεξεργασία και ακολούθως συντηρούνται σε υψηλές θερμοκρασίες και για τέτοιο χρονικό διάστημα που ευνοεί την σημαντική ανάπτυξη του μικροοργανισμού και την παραγωγή της εντεροτοξίνης (Wong and Bergdoll,2002).

Στα παρακάτω διαγράμματα (Διάγραμμα 6, Διάγραμμα 7, Διάγραμμα 8) παρουσιάζονται τα είδη των βακτηρίων των οποίων η παρουσία διαπιστώθηκε, σε σύγκριση με τα πρότυπα μικροοργανισμών, με χρήση της HRM κατά την μηδενική, δεύτερη και τέταρτη ημέρα συντήρησης του χοιρινού κιμά στους 4°C. Το όριο του ποσοστού εμπιστοσύνης που χρησιμοποιήθηκε για την ομοιότητα των καμπυλών τήξης των μικροοργανισμών που διερευνήθηκαν σε σύγκριση με τις καμπύλες τήξης των προτύπων, ήταν το 70%.



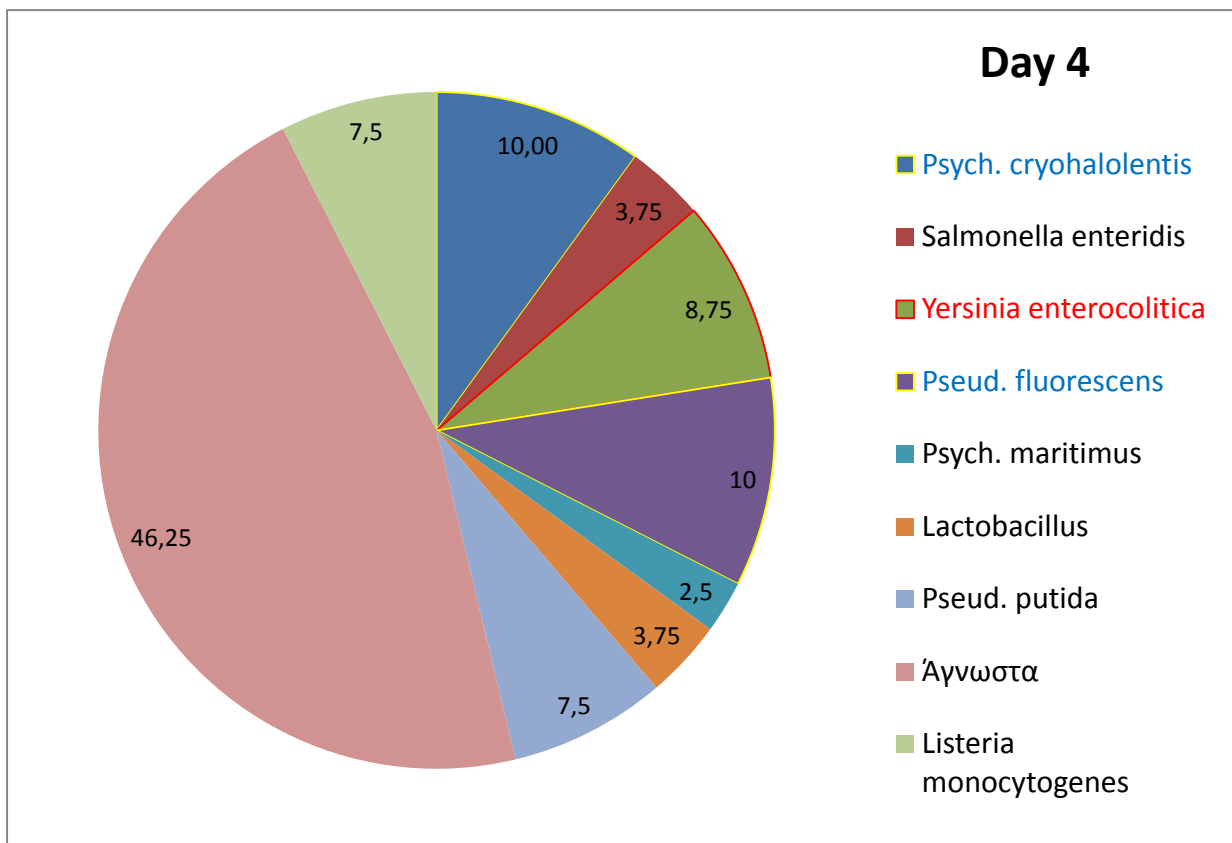
Διάγραμμα 6: Ποσοστιαία κατανομή των ειδών των βακτηρίων που ταυτοποιήθηκαν την μηδενική ημέρα συντήρησης.

Την μηδενική ημέρα συντήρησης παρατηρούμε ότι ο αλλοιωγόνος μικροοργανισμός που επικρατεί είναι το *Psychrobacter cryohalolentis* ενώ ο παθογόνος μικροοργανισμός που επικρατεί είναι η *Yersinia enterocolitica*. Σύμφωνα με την Laukkanen-Ninios κ.α. (2014) η *Yersinia enterocolitica* επιβιώνει κατά την συντήρηση του χοιρινού κρέατος υπό ψύξη αλλά δεν πολλαπλασιάζεται ραγδαία.



Διάγραμμα 7: Κατανομή των ειδών των βακτηρίων που ταυτοποιήθηκαν την δεύτερη ημέρα συντήρησης

Κατά την δεύτερη ημέρα συντήρησης του χοιρινού κιμά, παρατηρούμε ότι ο κύριος αλλοιωγόνος μικροοργανισμός εξακολουθεί να είναι το *Psychrobacter cryohalolentis* όπως και ο κύριος παθογόνος εξακολουθεί να είναι η *Yersinia enterocolitica*. Η αποθήκευση του χοιρινού κρέατος υπό ψύξη ευνοεί την ανάπτυξη της *Yersinia enterocolitica*, καθώς είναι ψυχρόφιλο βακτήριο και μπορεί να πολλαπλασιάζεται σε σχετικά χαμηλές θερμοκρασίες (Fredriksson-Ahomaa et al. 2001b). Τα προαιρετικά αναερόβια βακτήρια που ανήκουν στην οικογένεια Enterobacteriaceae μπορούν να αποτελέσουν μέρος της μικροχλωρίδας αλλοίωσης. Όπως και οι ψευδομονάδες, τα βακτήρια αυτά μεταβολίζουν τη γλυκόζη και κάποια από αυτά χρησιμοποιούν την 6-φωσφορική γλυκόζη καθώς και τα αμινοξέα. Ο ρυθμός ανάπτυξης των Enterobacteriaceae υπό συνθήκες ψύξης είναι χαμηλός, γι' αυτό δεν επικρατούν στην αλλοίωση του υπό συντήρηση κρέατος (Gill and Newton, 1977). Τα ψυχρότροφα Enterobacteriaceae φαίνεται να επικρατούν στο αρνίσιο και χοιρινό κρέας, ιδίως στα λιπαρά τμήματα και στους 5°C και όχι στον 1°C (Dainty and Mackey, 1992).



Διάγραμμα 8: Κατανομή των ειδών των βακτηρίων που ταυτοποιήθηκαν την τέταρτη ημέρα συντήρησης.

Κατά την τέταρτη ημέρα συντήρησης, ο επικρατέστερος παθογόνος μικροοργανισμός είναι η *Yersinia enterocolitica*, ενώ στους αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς εκτός από το *Psychrobacter cryohalolentis* παρατηρούμε ίδιο ποσοστό εμφάνισης και του *Pseudomonas fluorescens*. Όσον αφορά την επικράτηση της *Yersinia enterocolitica* η οποία ανήκει στην οικογένεια Enterobacteriaceae, οι Girova και Gochev (2009) έκαναν επίσης ανίχνευση και καταμέτρηση αλλοιωγόνων και παθογόνων σε δείγματα κιμά και τα ψυχρότροφα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* αντιπροσώπευσαν το 3% του συνόλου των βακτηρίων (το 88% ήταν Enterobacteriaceae) αποτελώντας τον πιθανό παράγοντα πρόκλησης αλλοίωσης στον κιμά που συντηρείται υπό ψύξη.

Σχετικά με την παρουσία του *Pseudomonas fluorescens*, το κρέας και τα προϊόντα κρέατος που συντηρούνται υπό ψύξη σε αερόβιες συνθήκες υπόκεινται αλλοίωση από αυστηρά αερόβια, Gram αρνητικά βακτήρια, καθώς αυτά παρουσιάζουν τον υψηλότερο ρυθμό ανάπτυξης σε αυτές τις συνθήκες. Συνήθως από τα *Pseudomonas* spp. κυριαρχούν συγκεκριμένα τα *P. fragi*, *P. fluorescens* και *P. lundensis* σε ποσοστό >50% (Koutsoumanis et al., 2006).

Ο αναμενόμενος επικρατών μικροβιακός πληθυσμός αλλοίωσης, κατά την συντήρηση του κιμά, θα ήταν είδη του γένους *Pseudomonas* ενώ στην περίπτωση που εξετάστηκε ήταν βακτήρια της ομάδας *Psychrobacter*.

Άλλες ομάδες βακτηρίων που εμπλέκονται στην αλλοίωση του κρέατος υπό αερόβιες συνθήκες είναι οι *Acinetobacter* spp., *Psychrobacter* spp. και *Moraxella* spp. Αυτά τα βακτήρια τείνουν να επικρατούν ως μικροχλωρίδα αλλοίωσης στο κρέας με υψηλότερο pH ($\text{pH} > 5.8$) ή όταν οι θερμοκρασίες συντήρησης είναι υψηλότερες (Gill and Newton, 1982). Το κρέας με τελικό υψηλό pH ($\text{pH} > 6.0$) και χαμηλή συγκέντρωση γλυκόζης, όπως είναι το κρέας DFD (Dark Firm Dry), υφίσταται πιο γρήγορα αλλοίωση σε σχέση με το κρέας που έχει κανονικό pH ($5.5 \leq \text{pH} \leq 5.8$). DFD μοσχαρίσιο κρέας που συντηρούνταν υπό αερόβιες συνθήκες στους 6°C εμφάνισε δυσάρεστη οσμή μετά από δύο ημέρες συντήρησης ενώ μοσχαρίσιο κρέας κανονικού pH την εμφάνισε μετά από τέσσερις ημέρες (Bem et al., 1976, Koutsoumanis et al., 2006). Επίσης, σε σύγκριση της μικροβιακής ανάπτυξης μεταξύ PSE και DFD χοιρινού κρέατος η παρατήρηση ότι ο ολικός αριθμός βακτηρίων (ψυχρότροφα, *Pseudomonas* spp., *Brochothrix thermosphacta* και *Enterobacteriaceae*) ήταν υψηλότερος για το DFD κρέας, είχε στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0.05$). Επιπρόσθετα, η διάρκεια της φάσης προσαρμογής των βακτηρίων πριν από την έναρξη της λογαριθμικής φάσης ανάπτυξης ήταν διαφορετική. Το PSE κρέας είχε την μεγαλύτερη φάση προσαρμογής ενώ το DFD την μικρότερη σε σχέση και με το κρέας με κανονικό pH (Greer and Murray, 1988).

Τα παραπάνω στοιχεία, η επικράτηση των *Psychrobacter* spp. στην μικροχλωρίδα αλλοίωσης και το γεγονός ότι ο χοιρινός κιμάς είχε υψηλές τιμές OMX σε σχέση με τις μέσες τιμές OMX άλλων μελετών που προαναφέρθηκαν, συναινούν στο συμπέρασμα ότι ο κιμάς προήλθε από DFD κρέας, το οποίο είχε ήδη υψηλό αρχικό μικροβιακό φορτίο και οι συνθήκες συντήρησής του υπό ψύξη δεν ήταν οι ιδανικές. Ο πιο αδύναμος κρίκος, στην ψυχρή αλυσίδα που πρέπει να τηρείται, είναι η διανομή του κρέατος. Οι συνθήκες κατά την μεταφορά και στο επίπεδο της λιανικής πώλησης βρίσκονται εκτός του άμεσου ελέγχου της βιομηχανίας παραγωγής και συνήθως παρεκκλίνουν από τις προδιαγραφές. Ο έλεγχος της θερμοκρασίας δεν υφίσταται από το κατάστημα μέχρι την συντήρηση στο σπίτι και μέχρι την στιγμή της προετοιμασίας και της κατανάλωσης του κρέατος (Nychas et al., 2008).

Προκειμένου να επιβεβαιωθούν τα αποτελέσματα της ταυτοποίησης των άγνωστων μικροοργανισμών με τα πρότυπα, που προέκυψαν από τις HRM, έγινε αλληλούχιση 20 δειγμάτων. Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 5)

Πίνακας 5:

Άγνωστα δείγματα	% ομοιότητας HRM	% ομοιότητας αλληλούχισης
K117		
K30		
H106		
H33		
H171		

H156		
H158		
K100		
H88		
H157		
H173		
H174		
H181		
H179		
K91		
K101		
K116		
K54		
H155		
H169		

Ακολουθεί ένας πίνακας (Πίνακας 5) που δίνει τις χαρακτηριστικές θερμοκρασίες τήξης (melting peaks) για κάθε μικροοργανισμό πρότυπο που χρησιμοποιήθηκε:

Πίνακας 5: Κορυφές τήξης (°C) των μικροοργανισμών προτύπων

Μικροοργανισμοί πρότυπα	HRM peaks (°C)
<i>Escherichia coli Antitoxigenic O157</i>	88.23
<i>Staphylococcus aureus</i>	86.12
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	87.65
<i>Psychrobacter maritimus</i>	86.33
<i>Pseudomonas putida</i>	88.57
<i>Psychrobacter cryohalolentis</i>	86.43
<i>Salmonella enteridis</i>	88.05
<i>Yersinia enterocolitica</i>	87.90

<i>Salmonella enterica</i>	88.62
<i>Lactobacillus fuchuensis</i>	87.77
<i>Listeria monocytogenes</i>	87.5
<i>Enterococcus faecium</i>	87.07
<i>Psychrobacter immobilis</i>	87.63
<i>Enterobacter aerogenes</i>	86.37

Η αλληλούχιση (sequencing) είναι ακριβή και χρονοβόρα, ενώ χρησιμοποιώντας την μέθοδο της HRM, η PCR και η ανάλυση της αλληλουχίας γίνεται σε ένα στάδιο και ολοκληρώνεται σε λίγες ώρες. Ένα άλλο πλεονέκτημα της μεθόδου αυτής είναι ότι γίνεται με κλειστό tube, άρα ο χειρισμός του δείγματος μειώνεται και με αυτόν τον τρόπο αποκλείεται η μόλυνση του προϊόντος της PCR. Στην μελέτη που έκαναν οι Miller et al. (2015) χρησιμοποίησαν την ανάλυση HRM προκειμένου να ταυτοποιήσουν είδη της οικογένειας *Pasteurellaceae* και χρησιμοποίησαν προϊόντα της PCR με μικρό μήκος γιατί ακόμη και οι αλλαγές σε μία βάση υποδεικνύουν ξεχωριστό σημείο τήξης (T_m) ακόμη και όταν τα είδη έχουν το ίδιο περιεχόμενο σε ζεύγη βάσεων GC. Στα μεγαλύτερα προϊόντα PCR, τα οποία φέρουν περιοχές με διαφορετικό περιεχόμενο σε GC μπορεί να γίνει διαφοροποίηση των ειδών βασιζόμενη στις αλλαγές στο προφίλ των καμπυλών τήξης. Η αποτελεσματικότητα της ανίχνευσης υποκαταστάσεων σε μία βάση μειώνεται με την αύξηση του μήκους της αλληλουχίας DNA.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ο χοιρινός κιμάς που χρησιμοποιήθηκε στην μικροβιολογική ανάλυση δεν προήλθε από καλή ποιότητα κρέατος. Συγκεκριμένα, το υψηλό μικροβιακό φορτίο του ήδη από την μηδενική ημέρα συντήρησης και η επικράτηση των βακτηρίων του γένους *Psychrobacter* υποδεικνύουν τις μη προβλεπόμενες συνθήκες συντήρησής του όσον αφορά τη θερμοκρασία ψύξης καθώς και την κατάσταση του κρέατος στην κατηγορία DFD.

Ο σχεδιασμός των εκκινητών και η βελτιστοποίηση των συνθηκών της PCR αποτελούν καίρια βήματα για την εξέλιξη της μεθόδου HRM. Κατά τον σχεδιασμό των εκκινητών για την ανάλυση HRM θα πρέπει να ακολουθούνται οι γενικές οδηγίες που προβλέπονται για τον σχεδιασμό με ιδιαίτερη έμφαση στην αποφυγή σχηματισμού μη ειδικών προϊόντων. Επίσης, στον σχεδιασμό των εκκινητών θα πρέπει να αποφεύγονται

οι ομόλογες αλληλουχίες τόσο μεταξύ προκαρυωτικών και ευκαρυωτικών κυττάρων όσο και μεταξύ των προκαρυωτικών και ευκαρυωτικών οργανιδίων. Ο σχεδιασμός είναι σημαντικός επειδή οι ταξινομικές πληροφορίες που δίνουν οι διαφορετικές περιοχές του γονιδίου 16S rRNA ποικίλουν και όταν ο στόχος είναι συγκεκριμένη ομάδα μικροβίων μπορεί να απαιτείται ενίσχυση συγκεκριμένης υπερμεταβλητής περιοχής του γονιδίου (Soergel et al., 2012).

Όπως αναφέρθηκε και πριν, η μέθοδος HRM είναι απλή, γρήγορη, φθηνή, ολοκληρώνεται σε ένα στάδιο και με κλειστά tubes. Παρόλο που δεν παρέχει τις πληροφορίες που παρέχει η αλληλούχιση, για όλους τους παραπάνω λόγους καθώς και για το ότι είναι εύκολα προσβάσιμη, υπάρχουν μεγάλες πιθανότητες να υιοθετηθούν τα πρωτόκολλα μικροβιολογικών αναλύσεων που την ενσωματώνουν από τα κλινικά εργαστήρια για ελέγχους πρώτου βαθμού ή διαγνώσεις. Τα πλεονεκτήματά της HRM δημιουργούν την ανάγκη να εξελιχθεί η μέθοδος περαιτέρω ώστε να μπορεί να επιτύχει αξιόπιστη αποτύπωση αλληλουχιών (sequence fingerprinting) για την ταυτοποίηση των ειδών των βακτηρίων (Andini et al., 2017)

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- **Steven Y. C. Tong, Philip M. Giffard,**” *Microbiological Applications of High-Resolution Melting Analysis*”, *Journal of Clinical Microbiology*, November 2012, Vol. 50, Number 11, p. 3418–3421.
- **HBD Halkman, AK Halkman,** *Encyclopedia of Food Microbiology, Indicator Organisms*, Elsevier, 2014.
- **Osman Erkmen, T. Faruk Bozoglu,** *Food Microbiology: Principles into Practice*, John Wiley & Sons, 2016
- **Christopher Delgado, Mark Rosegrant, Henning Steinfeld, Simeon Ehui and Claude Courbois,** *Livestock to 2020: the next food revolution*, *Outlook on Agriculture*, Vol 30, No 1, 2001, p. 27–29
- **Montserrat Mor-Mur & Josep Yuste,** “*Emerging Bacterial Pathogens in Meat and Poultry: An Overview*”, *Food Bioprocess Technol*, Vol.3, 2010, p. 24–35

- **John N. Sofos**, “Challenges to meat safety in the 21st century”, *Meat Science*, Vol. 78, 2008, p. 3–13
- **T. D. Girova & V. K. Gochev**, “Detection and Enumeration of Spoilage and Pathogenic Microorganisms in Refrigeratory Stored Meat Products”, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, Vol. 23, 2009
- **Luca Cocolin, Danilo Ercolini**, *Molecular Techniques in the Microbial Ecology of Fermented Foods*, Chapter 1, Springer, 2008
- **Polly Walker, Pamela Rhubart-Berg, Shawn McKenzie, Kristin Kelling and Robert S Lawrence**, “Public health implications of meat production and consumption” *Public Health Nutrition*: 8(4), p. 348–356, 2005.
- “Monitoring and identification of human enteropathogenic *Yersinia* spp.1 Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards”, *The EFSA Journal*, 595, p. 1-30, 2007.
- **Jalava, K., Hallanvuo, S., Nakari, U. M., Ruutu, P., Kela, E., Heinasmaki, T., Siitonen, A. and Nuorti**, “Multiple outbreaks of *Yersinia pseudotuberculosis* infections in Finland” *J. Clin. Microbiol.* 42 (6): 2789-91, J. P. 2004.
- **Riikka Laukkanen-Ninios, Maria Fredriksson-Ahomaa, Hannu Korkeala**, “Enteropathogenic *Yersinia* in the Pork Production Chain: Challenges for Control”, *Comprehensive Review in Food Science and Food Safety*, Vol.13, 2014.
- **Ron Fleming and Marcy Ford**, “Human versus Animals - Comparison of Waste Properties” - July 4, 2001
- **Flora JL, Hodne CJ, Goudy W, Osterberg D, Kliebenstein J, Thu KM, et al.** Social and community impacts. In: Iowa State University and University of Iowa Study Group, ed. “*Iowa Concentrated Animal Feeding Operations Air Quality Study*”. Iowa City Ames, IA: Iowa State University The University of Iowa Study Group, p. 147–163, 2002.
- **Barbara Druml, Margit Cichna-Markl**, “High resolution melting (HRM) analysis of DNA – Its role and potential in food analysis”, *Food Chemistry* 158, p. 245–254, 2014.
- **Mine Erdem, Zülal Kesmen, Esra Özbekar, Bülent Çetin, and Hasan Yetim**, “Application of high-resolution melting analysis for differentiation of spoilage yeasts”, *Journal of Microbiology*, Vol. 54, No. 9, p. 618–625, 2016.
- **M. L. Garcia-Lopez, M. Prieto and A. Otero**, “*The Microbiology of Meat and Poultry*” edited by A. Davies and R. Board, Chapter 1: The physiological attributes of Gram-negative bacteria associated with spoilage of meat and meat products, Thomson Science, 1998.
- **Α. Παλαιολόγου, Ε. Κατσαρέλη και Γ. Παπανικολάου**, «Εργαστηριακές ασκήσεις γενετικής του ανθρώπου» Κεφ. 7 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, 2015.
- **James D. Watson, Amy A. Caudy, Richard M. Myers, Jan A. Witkowski**, «Ανασυνδυασμένο DNA, Γονίδια και Γονιδιώματα», σελ. 126-135, Ακαδημαϊκές Εκδόσεις Ι. Μπάσδρα και ΣΙΑ Ο.Ε., 2007.
- **J. Šimenc and U. Potocnik**, “Differentiation of Bacterial Species by High Resolution Melting Curve Analysis”, *Applied Biochemistry and Microbiology*, Vol.47, No.3, p. 256-263, 2011.
- **Drancourt M., Bollet C., Carlizot A., Martelin R., Gayral J.P., and Raoult D.**, “*J. Clin. Microbiology*, Vol. 38, No. 10, p. 3623–3630, 2000.

- **Wittwer C.T., Herrmann M.G., Moss A.A., and Rasmussen R.P.**, “Continuous Fluorescence Monitoring of Rapid Cycle DNA Amplification”, *BioTechniques*, Vol. 22, no. 1, pp. 130–138, 1997.
- **Maria Fredriksson-Ahomaa, Andreas Stolle & Hannu Korkeala**, “Molecular epidemiology of *Yersinia enterocolitica* infections”, *FEMS Immunol. Med Microbiol.* No 47, p. 315–329, 2006.
- **Fredriksson-Ahomaa M, Bucher M, Hank C, Stolle A, Korkeala H**, “High prevalence of *Yersinia enterocolitica* 4:O3 on pig offal in southern Germany: a slaughtering technique problem.” *Syst. Appl. Microbiol.*, Vol. 24, p. 457-463, (2001b)
- **Fredriksson-Ahomaa M., Hallanvuori S., Korte T., Siitonen A., Korkeala H.**, “Correspondence of genotypes of sporadic *Yersinia enterocolitica* bioserotypes 4:O3 strains from human and porcine sources”. *Epidemiol. Infect.* (in press) (2001a).
- **Nikolaos D. Andritsos, Marios Mataragas, Elpida Mavrou, Anastasios Stamatiou, Eleftherios H. Drosinos**, “The microbiological condition of minced pork prepared at retail stores in Athens, Greece” *Meat Science*, Vol. 91, p.486–489, 2012.
- **Π. Κοτζεκίδου – Ρουκά**, «Μικροβιολογία τροφίμων», σελ. 69-73, Σ. Γιαχούδης & ΣΙΑ Ο.Ε., 2007.
- **Ayten Kimiran Erdem, Duygu Saglam, Didem Ozer, Ezgi Ozcelik**, “Microbiological Quality of Minced Meat Samples Marketed in Istanbul”, *Van Veterinary Journal*, Vol. 23, No 3, p.67-70, 2014.
- **Koutsoumanis K., Geornaras I. and Sofos J.**, “Handbook Of Food Science, Technology, and Engineering”, Vol.1, Chapter 52 Microbiology of Land Muscle Foods, Edited by Y. H. HUI, Taylor & Francis, 2006.
- **Gill C. O.**, “Meat Spoilage and Evaluation of the Potential Storage Life of Fresh Meat” *Journal of Food Protection*, Vol. 46, No.5, p. 444-452, 1983.
- **Gill C.O., Newton K. G.**, “The development of aerobic spoilage on meat stored at chill temperatures”, *Journal of Applied Bacteriology*, Vol. 43, p.189–195, 1977.
- **Dainty R.H. and B.M. Mackey**, “The relationship between the phenotypic properties of bacteria from chill-stored meat and spoilage processes”, *Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement*, Vol.73, p.103-114, 1992.
- **Gill C. O., Newton K. G.**, “Effect of lactic acid concentration on growth on meat of gram-negative psychrotrophs from a meatworks” *Appl. Environ. Microbiol.* Vol.43, p.284–288, 1982.
- **Bem Z., Hechelmann H., Leistner L.**, “Mikrobiologie des DFD-Fleisches (The bacteriology of DFD meat)”, *Fleischwirtschaft*, Vol.56, p.985–987, 1976.
- **G. Gordon Greer & Austin C. Murray**, “Effects of Pork Muscle Quality on Bacterial Growth and Retail Case Life”, *Meat Science*, Vol. 24, p.61-71, 1988.
- **Woese CR**, “Bacterial evolution” *Microbiological Reviews*, Vol.51, p.221-271, 1987.
- **Patel J. B.**, “16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Pathogen Identification in the Clinical Laboratory”, *Molecular Diagnosis*, Vol. 6, No.4, 2001.
- **Manuel Miller, Julia Zorn, Markus Brielmeier**, “High-Resolution Melting Curve Analysis for Identification of Pasteurellaceae Species in Experimental Animal Facilities”, *PLOS ONE*, 2015.

- **Le Loir Y., Baron F. and Gautier M.**, “*Staphylococcus aureus and food poisoning*”, Genetics and Molecular Research, Vol.2, p.63-76, 2003.
- **ACL Wong, MS Bergdoll**, “*Staphylococcal food poisoning*” In: DO Cliver, HP Riemann. eds. Foodborne Diseases, 2nd edition San Diego: Academic Press, p. 231–248, 2002.
- **Garcia-Lopez M-L, JA Santos, A. Otero and JM Rodriguez-Calleja**, Ch. *Psychrobacter* in: Encyclopedia of Food Microbiology 2nd Edition, edited by Carl Batt and Mary Lou Tortorello, Academic Press, 2014.
- **George-John E. Nychas, Panos N. Skandamis, Chrysoula C. Tassou, Konstantinos P. Koutsoumanis**, “*Meat spoilage during distribution*”, Meat Science, Vol.78, p. 77–89, 2008.
- **Nadia Andrea Andreani and Luca Fasolato**, “*Pseudomonas and Related Genera*”, Ch.2 in: The Microbiological Quality of Food, Foodborne Spoilers, Woodhead Publishing, 2017.
- **Giuseppina Stellato, Daniel R. Utter, Andy Voorhis, Maria De Angelis, A. Murat Eren and Danilo Ercolini**, “*A Few Pseudomonas Oligotypes Dominate in the Meat and Dairy Processing Environment*”, Frontiers in Microbiology, Vol.8, 2017.
- **Nisiotou, A., Parlapani, F. F., Kormas, K., & Boziaris, I. S.**, “*Old Targets, new weapons: food microbial communities revealed with molecular tools*”. In I. S. Boziaris (Ed.), Novel food Preservation and microbial assessment techniques p. 277-312, Taylor & Francis, CRC Press, 2014.
- **Foteini F. Parlapani, Ioannis S. Boziaris**, “*Monitoring of spoilage and determination of microbial communities based on 16S rRNA gene sequence analysis of whole sea bream stored at various temperatures*”, LWT - Food Science and Technology Vol.66, p. 553-559,2016.
- **Parlapani, F. F., Meziti, A., Kormas, ArK., & Boziaris, I. S.**, “*Indigenous and spoilage microbiota of farmed sea bream stored in ice identified by phenotypic and 16S rRNA gene analysis*” Food Microbiology, Vol. 33,p. 85-89,2013.
- **Baltasar Mayo, Caio T. C. C. Rachid, Ángel Alegria, Analy M. O. Leite, Raquel S. Peixoto and Susana Delgado**, “*Impact of Next Generation Sequencing Techniques in Food Microbiology*”, Current Genomics, Vol.15, p. 293 – 309, 2014.
- **Soergel, D.A., Dey, N., Knight, R., Brenner, S.E.**, “*Selection of primers for optimal taxonomic classification of environmental 16S rRNA gene sequences*” The ISME Journal, Vol. 6, p.1440-1444, 2012.
- **John P. Bowman**, Ch. 3.3.35 “*The Genus Psychrobacter*” In: Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer KH., Stackebrandt E. The Prokaryotes. Springer, 2006.
- **Nadya Andini, Bo Wang, Pornpat Athamanolap, Justin Hardick, Billie J. Masek, Simone Thair, Anne Hu, Gideon Avornu, Stephen Peterson, Steven Cogill, Richard E. Rothman, Karen C. Carroll, Charlotte A. Gaydos, Jeff Tza-Huei Wang, Serafim Batzoglou & Samuel Yang**, “*Microbial Typing by*

Machine Learned DNA Melt Signatures”, Scientific Reports, 7:42097, February 2017.

- **L.H. Stanbridge and A.R. Davies**, “*The Microbiology of Meat and Poultry*” edited by A. Davies and R. Board, Chapter 6: The microbiology of chill-stored meat, Thomson Science, 1998.
- <https://ecdc.europa.eu/en/yersiniosis/surveillance-and-disease-data/atlas>
- <https://www.appliedbiosystems.com>
- <https://ec.europa.eu/eurostat/>
- <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EL/TXT/PDF/?uri=CELEX:32005R2073&qid=1429776034765&from=EL>