

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ



ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

<<Αξιολόγηση της χρήσης της μεθόδου φασματομετρίας μάζας MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time Of Flight) στην ταχεία ταυτοποίηση τροφομογενών βακτηρίων σε επίπεδο γένους και είδους>>

ΕΠΙΜΕΛΕΙΑ : Τραμπάκουλου Ευσταθία

ΕΠΙΒΛΕΠΟΝΤΕΣ : κ. Ψαρουλάκη Άννα, επίκουρη καθηγήτρια της Ιατρικής Σχολής, Πανεπιστημίου Κρήτης, επιστημονική υπεύθυνη του Εργαστηρίου Μικροβιολογικής Υγιεινής, Τροφίμων , Ύδατος και Περιβάλλοντος.

κ. Σπύρος Απόστολος, επίκουρος καθηγητής, Τομέας Χημείας Περιβάλλοντος και Αναλυτικής Χημείας, Πανεπιστημίου Κρήτης

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Μικροβιολογικής Υγιεινής, Τροφίμων , Ύδατος και Περιβάλλοντος, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης .

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στους ανθρώπους που με βοήθησαν στην περαίωση και ολοκλήρωση της πτυχιακής μου εργασίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω πρωτίστως την κ. Ψαρουλάκη Άννα, επίκουρη καθηγήτρια της Ιατρικής Σχολής, επιστημονική υπεύθυνη του Εργαστηρίου Μικροβιολογικής Υγιεινής, Τροφίμων , Ύδατος και Περιβάλλοντος, για την εμπιστοσύνη και τη στήριξη της καθ' όλο το διάστημα εκπόνησης της Πτυχιακής μου εργασίας.

Πολλές ευχαριστίες στους συνεργάτες του εργαστηρίου, ιδιαίτερα τον κ. Βασίλη Σανδαλάκη, μοριακό βιολόγο/βιοπληροφορικό, τόσο για την πληθώρα των γνώσεων που μου εμφύσησε όσο και για την καταλυτικής σημασίας βοήθεια του στη σύνταξη της εν λόγω εργασίας, καθώς και δεν θα μπορούσα στους υπόλοιπους συνεργάτες της κ. Ψαρουλάκη που με βοήθησαν να εγκλιματιστώ στον εργαστηριακό χώρο και να εξοικειωθώ με τις εκάστοτε τεχνικές

Ευχαριστώ τον κ. Σπύρο ο οποίος δέχτηκε να συνεπιβλέψει την εν λόγω πτυχιακή εργασία.

Πάνω από όλα όμως δεν μπορώ παρά να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για την αμέριστη συμπαράσταση και στήριξη κατά την παραμονή μου στο Ηράκλειο της Κρήτης ειδικά σε αυτούς τους χαλεπούς καιρούς που διάγουμε.

Αφιερώνω αυτήν την εργασία στον πατέρα μου.

Περιεχόμενα

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	2
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	5
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	6
ΤΡΟΦΟΓΕΝΕΙΣ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ ΚΑΙ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ	6
1.1 ΤΡΟΦΟΓΕΝΕΙΣ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ	6
1.2 ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΤΕΡΑ ΑΙΤΙΑ ΤΡΟΦΟΓΕΝΩΝ ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ	8
1.3 ΒΑΚΤΗΡΙΑ – ΙΟΙ – ΠΑΡΑΣΙΤΑ	10
ΒΑΚΤΗΡΙΑ.....	11
ΠΑΘΟΓΟΝΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ	13
ΙΟΙ	14
ΠΑΡΑΣΙΤΑ.....	15
1.4 ΒΑΚΤΗΡΙΑ.....	16
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	20
2.1 ΕΠΙΚΙΝΔΥΝΟΤΗΤΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ.....	20
2.2 ΠΟΙΟΤΗΤΑ – ΔΙΑΣΦΑΛΙΣΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ	22
2.2.1 HACCP:ΣΥΣΤΗΜΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ	22
2.2.2 ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΕΞΕΛΙΞΗ ΚΑΙ ΘΕΣΜΙΚΟ ΠΛΑΙΣΙΟ	24
2.2.3 ΑΡΧΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ ΤΟΥ HACCP	27
2.2.4 ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ HACCP ΣΤΗ ΜΑΖΙΚΗ ΕΣΤΙΑΣΗ.....	28
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3	33
3.1 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ, ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ.....	33
ΤΡΟΦΟΓΕΝΩΝ ΠΑΘΟΓΟΝΩΝ	33
3.2 ΣΥΜΒΑΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΛΑΣΣΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ	34
3.3 ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΔΙΑΚΡΙΣΗΣ ΤΡΟΦΟΓΕΝΩΝ ΠΑΘΟΓΟΝΩΝ	38
ΥΒΡΙΔΟΠΟΙΗΣΗ ΝΟΥΚΛΕΪΚΟΥ ΟΞΕΟΣ	38
ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΝ ΤΗΝ PCR	39

3.4 ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΕΣ ΕΛΕΓΧΟΥ ΤΡΟΦΟΓΕΝΩΝ ΠΑΘΟΓΟΝΩΝ	41
• NASBA (Nucleic Acid Sequence Based Amplification)	42
• ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΥΡΕΣΗΣ ΥΠΟ-ΤΥΠΩΝ (ΣΤΕΛΕΧΩΝ)	42
• ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ.....	43
3.5 MALDI – TOF ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΡΟΦΟΓΕΝΩΝ ΠΑΘΟΓΟΝΩΝ	44
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	48
ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ – ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	48
4. ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	48
5. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....	48
5.1 ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ	48
5.1.1 ΚΛΑΣΣΙΚΗ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ – ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΑ	54
5.1.2 ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ MALDI – TOF	61
6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	66
6.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΛΑΣΣΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ	66
6.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ MALDI – TOF	80
6.3 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	83
7. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	93
8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	98
9. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	107

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Δεδομένης της αναγκαιότητας ελέγχου των τροφίμων έχουν αναπτυχθεί πολλές μέθοδοι ανάλυσης σύμφωνα με τις οποίες είναι δυνατή η ανίχνευση και η ταυτοποίηση των εκάστοτε παθογόνων ή μη μικροοργανισμών. Στην εν λόγω μελέτη ελέγχθηκαν δείγματα τροφίμων τα οποία ελήφθησαν από διάφορες επιχειρήσεις. Οι μικροοργανισμοί που αναπτύχθηκαν ταυτοποιήθηκαν τόσο με μεθόδους της κλασσικής μικροβιολογίας όσο και με την χρήση της φασματομετρίας μάζας MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time Of Flight), η οποία αποτελεί μία πολλά υποσχόμενη επιστημονική μέθοδο. Αναφορικά με τη μικροβιολογική ανάλυση δειγμάτων τροφίμων, αυτή διεξήχθη με βάση τυποποιημένες μεθόδους ISO (International Standard Organization). Στα πλαίσια αυτών των μεθόδων ο έλεγχος δειγμάτων τροφίμων έγινε με την χρήση παραδοσιακών μεθόδων καλλιέργειας για την απομόνωση και την αρίθμηση των μικροοργανισμών-στόχων (δεικτών υγιεινής και δεικτών ασφαλείας). Στη συνέχεια, οι απομονωμένοι μικροοργανισμοί ελέγχθηκαν και με την μέθοδο φασματομετρίας μάζας MALDI-TOF με σκοπό τη σύγκριση των αποτελεσμάτων και την εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικών με τις δύο μεθόδους ανάλυσης.

Τα δείγματα που αναλύθηκαν ήταν 400 (τετρακόσια) σε αριθμό και περιελάμβαναν τα παρακάτω: επεξεργασμένα τρόφιμα (έτοιμα προς βρώση μετά από θερμική επεξεργασία), έτοιμες σαλάτες (σύνθετες και φρέσκιες), τυροκομικά, κατεψυγμένα σφολιατοειδή πριν την τελική θερμική επεξεργασία, ωμά κρεατικά και κρεατοσκευάσματα πριν την τελική θερμική επεξεργασία. Το σύνολο των εργαστηριακών ελέγχων έγινε στο εργαστήριο της Μονάδας Μικροβιολογικής Υγιεινής Τροφίμων Ύδατος και Περιβάλλοντος της Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Κρήτης.

Εν κατακλείδι, η έρευνα κατέληξε σε πλήρη συμφωνία των αποτελεσμάτων των κλασσικών μεθόδων μικροβιολογίας που χρησιμοποιήθηκαν και της μοριακής μεθόδου MALDI-TOF.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΤΡΟΦΟΓΕΝΕΙΣ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ ΚΑΙ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

1.1 ΤΡΟΦΟΓΕΝΕΙΣ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ

Οι τροφογενείς νόσοι αποτελούν ένα από τα πιο διαδεδομένα προβλήματα δημόσιας υγείας. Ωστόσο, μόνο ένα μικρό ποσοστό από αυτές τις ασθένειες γίνονται αντιληπτές από τις υπηρεσίες υγείας, και ακόμα μικρότερο ποσοστό αυτών διερευνάται. Εκτιμάται ότι η αναφερόμενη επίπτωση των τροφιμογενών ασθενειών αντιπροσωπεύει λιγότερο από το 10 τοις εκατό, και ίσως λιγότερο από το 1 τοις εκατό, της πραγματικής επίπτωσης (Motarjemi and Käferstein, 1997). Στις αναπτυσσόμενες χώρες, μετρήθηκαν ακόμη λιγότερες περιπτώσεις ανάλογων ασθενειών, κυρίως λόγω της εξάλειψης της φτώχειας και της συνεχούς ανακάλυψης νέων πόρων για τις υπηρεσίες διαχείρισης ασφάλειας και ελέγχου των τροφίμων. Παρά το γεγονός ότι ανάλογα κρούσματα παραμένουν αδήλωτα, παρατηρείται αύξηση των τροφιμογενών νόσων σε πολλά μέρη του κόσμου και εμφάνιση νέων ή πρόσφατα αναγνωρισμένων τροφιμογενών προβλημάτων (Εικόνα 1.1.1). Ως αναδυόμενα, ή σε ορισμένες περιπτώσεις, επανεμφανιζόμενα, τροφιμογενή προβλήματα μπορούν να χαρακτηριστούν όλα εκείνα τα οποία έχουν κάνει πρόσφατα την εμφάνιση τους σε ένα πληθυσμό, έχουν αρχίσει να αυξάνονται ραγδαία ως προς τη συχνότητα ή το γεωγραφικό φάσμα, οφείλονται σε διάφορες αιτίες και είναι ευρέως διαδεδομένα για πολλά χρόνια, ενώ είναι πρόσφατα αναγνωρισμένα λόγω των νέων ή αυξημένων γνώσεων ή μεθόδων ταυτοποίησης και ανάλυσης του νοσογόνου παράγοντα.



ΕΙΚΟΝΑ 1.1.1, Η συλλογή των καλαμποκιών στη Νότια Αφρική (Motarjemi, Y. & Käferstein, F.K. 1997).

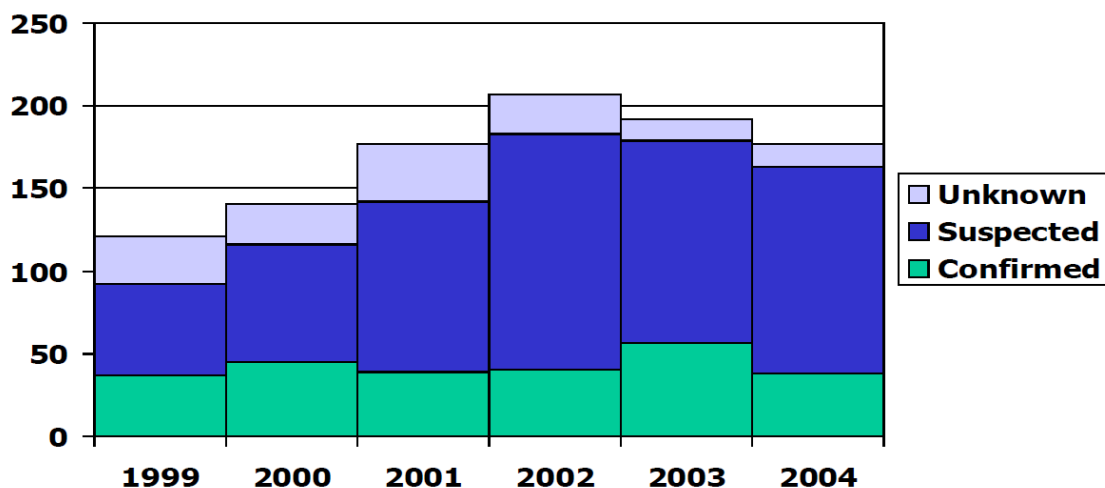
Οι ακόλουθοι παράγοντες παίζουν σημαντικό ρόλο στην επιδημιολογία των αναδυόμενων τροφιμογενών νόσων (Käferstein, 1997):

- *Αλλαγές στα παθογόνα:* η μικροβιακή προσαρμογή μέσω της φυσικής επιλογής είναι μια βασική προϋπόθεση για την εμφάνιση παθογόνων. Η θεραπευτική χρήση ενός αντιμικροβιακού παράγοντα σε πληθυσμούς ανθρώπων ή ζώων δημιουργεί μια σταδιακά επιλεκτική ανθεκτικότητα των βακτηριακών στελεχών στον παράγοντα.
- *Ανάπτυξη:* οικονομικές και τεχνικές εξελίξεις έχουν εισαγάγει νέες τροφές και νέα συστήματα παραγωγής. Η αλυσίδα τροφίμων έχει γίνει μεγαλύτερη και πιο περίπλοκη, ενώ οι τρόποι επιμόλυνσης είναι πλέον περισσότεροι. Η έλλειψη γνώσης και η αμέλεια των χειριστών τροφίμων σε συνδυασμό με την μαζική εστίαση αποτελούν βασικούς λόγους εμφάνισης τροφιμογενών νοσημάτων.
- *Η φτώχεια και η ρύπανση:* η μόλυνση του περιβάλλοντος, οι φτωχές κοινωνικές συνθήκες και η έλλειψη δυνατοτήτων ελέγχου της προετοιμασίας των τροφίμων αποτελούν αλληλένδετους παράγοντες της εμφάνισης των εν λόγω λοιμώξεων.
- *Οι διατροφικές συνήθειες:* οι διατροφικές προτιμήσεις και πρακτικές (όπως λόγου χάρη η βρώση ωμών ή επικίνδυνων τροφίμων) και κάποιες πολιτιστικές πεποιθήσεις, οι οποίες σχετίζονται με τον τρόπο μαγειρέματος μπορούν να αυξήσουν τον κίνδυνο εμφάνισης ασθενειών, ενώ ένα πολύ υψηλό ποσοστό γεννήσεων συχνά συνιφάζεται με την φτώχεια και τον υποσιτισμό.
- *Ταξίδια και μετανάστευση:* εκατοντάδες εκατομμύρια άνθρωποι οι οποίοι διασχίζουν τα σύνορα βρίσκονται σε υψηλό κίνδυνο έκθεσης σε τροφιμογενείς ασθένειες. Οι ταξιδιώτες μπορούν να μεταδώσουν τις ασθένειες γρήγορα σε ένα νέο περιβάλλον, ενώ οι μετανάστες εισάγουν επίσης νέα τρόφιμα και διατροφικές συνήθειες στις νέες περιοχές που μετοικούν.
- *Το εμπόριο των τροφίμων, των ζωοτροφών και των ζώων:* η παγκοσμιοποίηση, που διευκολύνεται από την ελευθερία στο εμπόριο, έχει οδηγήσει σε αύξηση του αριθμού των περιπτώσεων όπου η ταχεία κυκλοφορία των τροφίμων φυτικής και ζωικής προέλευσης συνέβαλε στην εξάπλωση των τροφιμογενών νοσημάτων.
- *Νέα οχήματα μεταφοράς τροφίμων:* η νέα πραγματικότητα στο τομέα του φαγητού είναι αγορά τροφίμων στο δρόμο, ενώ όχι και τόσο καλοψημένα τρόφιμα ζωικής και θαλάσσιας προέλευσης αποτελούν πιθανά αίτια τροφιμογενών ασθενειών. Η προσοχή τώρα στρέφεται σε τρόφιμα όπως φρούτα, λαχανικά και χυμός μήλου.
- *Τομέας Υγείας:* πολλές κυβερνήσεις βρίσκονται υπό αυξανόμενη πίεση με σκοπό τη μείωση του προσωπικού, την αποκέντρωση και την ιδιωτικοποίηση των συστημάτων υγείας τους. Οι ραγδαίες αλλαγές, η λιτότητα του δημόσιου τομέα και η έλλειψη εκπαίδευσης περί της ασφάλειας των τροφίμων έχουν άμεσες και δραματικές επιπτώσεις στην υγεία. Επιπροσθέτως, η ευπάθεια σε ασθένειες τροφιμογενών λοιμώξεων αυξάνεται καθώς η εμφάνιση και η λοίμωξη από τον ιό HIV όλο και μεγαλύτερου μέρους του πληθυσμού, έχει οδηγήσει στην εφαρμογή ολοένα

ισχυρότερων ανοσοκατασταλτικών θεραπειών με αποτέλεσμα το ανοσοποιητικό σύστημα να αδρανοποιείται.

- *Οι δημογραφικές αλλαγές:* το ποσοστό των ευπαθών πληθυσμών ως προς τις τροφιμογενείς λοιμώξεις αυξάνεται συνεχώς, αν και στις πιο εύπορες περιοχές το προσδόκιμο ζωής αυξάνεται συνεχώς.

Η κατανάλωση τροφίμων μπορεί να επηρεαστεί από ποικίλους παράγοντες. Οι διατροφικές συνήθειες μπορεί να μεταβληθούν ως απόρροια των εκάστοτε διατροφικών συστάσεων και της περιρρέουσας ατμόσφαιρας. Το υψηλότερο βιοτικό επίπεδο μπορεί να οδηγήσει στην κατανάλωση περισσότερου κρέατος, ενώ από την άλλη οι περιβαλλοντικές αλλαγές μπορεί να οδηγήσουν στην κατανάλωση συγκεκριμένων τροφών. Ακόμα καταλυτικής σημασίας όσον αφορά τη διαμόρφωση των διατροφικών συνθηκών φαίνεται να είναι ο σύγχρονος τρόπος ζωής σε συνδυασμό με την πολιτική των τροφίμων, η οποία προτείνει την κατανάλωση προπαρασκευασμένων προϊόντων (Εικόνα 1.1.2).



ΕΙΚΟΝΑ 1.1.2, Στην παραπάνω εικόνα απεικονίζεται η σχέση των αγνώστων, ύποπτων τροφιμογενών και των διαπιστωμένων τροφιμογενών λοιμώξεων ως αίτια θανάτου ανά τα αναγραφόμενα έτη (Στατιστικά δεδομένα από το Centers for Disease Control and Prevention) (Foodborne Pathogens, Gabriella Kisko).

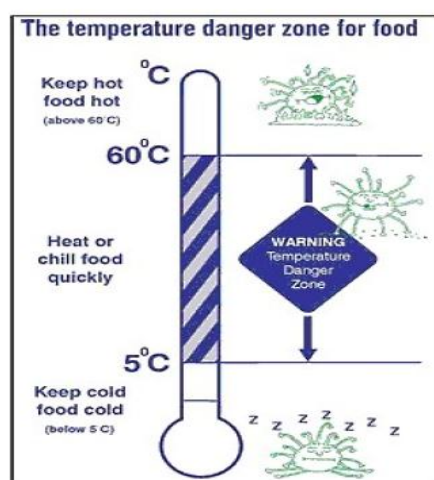
1.2 ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΤΕΡΑ ΑΙΤΙΑ ΤΡΟΦΟΓΕΝΩΝ ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ

Με τον όρο τροφογενείς λοιμώξεις, αναφερόμαστε σε λοιμώξεις που οφείλονται σε βακτήρια, ιούς ή παράσιτα τα οποία μεταδίδονται μέσω της κατανάλωσης τροφίμων (Motarjemi, Y. & Käferstein, 1997). Χαρακτηριστικά αξίζει να σημειωθεί πως πάνω από διακόσιες ασθένειες εξαπλώνονται μέσω των τροφίμων, ενώ σύμφωνα με έρευνες που έχουν διεξαχθεί στην Αμερική ένας στους τέσσερεις Αμερικάνους νοσεί μία φορά τον χρόνο

από τροφογενή λοίμωξη και ένας στους χίλιους νοσηλεύεται. Το ερώτημα που τίθεται συνεπώς είναι το εξής: «**νιώθουμε πλέον ασφαλείς να καταναλώνουμε όποιο τρόφιμο επιθυμούμε;**» Η απάντηση είναι καταφατική υπό προϋποθέσεις, οι οποίες αφορούν στον ποιοτικό έλεγχο των τροφίμων. Οι κατηγορίες ανθρώπων που χαρακτηρίζονται ως πιο επιρρεπείς σε τροφογενείς λοιμώξεις είναι τα μικρά παιδιά, οι έγκυες, οι υπερήλικες και οι ασθενείς με μειωμένο ανοσοποιητικό (Foodborne Pathogens, Gabriella Kisko).

Σε αυτό το σημείο, ωστόσο, αξίζει να γίνει αναφορά στα αίτια της εμφάνισης των τροφογενών λοιμώξεων, μιας και η επισήμανση αυτών είναι το πρώτο και σημαντικότερο βήμα για την εξυγίανση του τομέα παραγωγής τροφίμων.

Κατ' αρχήν, ένα από τα βασικότερα αίτια είναι η συντήρηση τροφίμων σε θερμοκρασία δωματίου για μεγάλο χρονικό διάστημα καθώς η παραγωγή τους γίνεται αρκετό καιρό πριν από την κατανάλωσή τους. Ωστόσο, η θερμοκρασία στην οποία πρέπει να φυλάσσεται το εκάστοτε τρόφιμο είναι συγκεκριμένη και αναγράφεται στις αντίστοιχες διαδικασίες ISO, επομένως η ακατάλληλη θερμοκρασία ψύξης δύναται να αποβεί καταστροφική για το τρόφιμο. Η θερμοκρασία αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα αίτια εμφάνισης τροφομογενών λοιμώξεων και ως εκ τούτου πέρα από την θερμοκρασία ψύξης, ιδιαίτερης σημασίας χρήζει τόσο η αποφυγή ανεπαρκούς αναθέρμανσης όσο και η μαγειρική σε ανεπαρκείς για τις εκάστοτε κατηγορίες τροφίμων (Εικόνα 1.2.1).



ΕΙΚΟΝΑ 1.2.1, Στην παραπάνω εικόνα διαφαίνεται η επικίνδυνη ζώνη θερμοκρασίας των τροφίμων (Foodborne Pathogens, Gabriella Kisko).

Επιπροσθέτως, θα θεωρείτο μεγάλη παράλειψη να μην γίνει αναφορά στην έλλειψη υγιεινής στις διάφορες φάσεις παραγωγής τροφίμων, καθώς επίσης και στη διασταυρούμενη επιμόλυνση με μικροοργανισμούς, η οποία μπορεί να επισυμβεί ύστερα από την κοπή ωμού κρέατος και λαχανικών στον ίδιο πάγκο κοπής (Εικόνα 1.2.2) ή σε άλλη περίπτωση με την μη σχολαστική καθαριότητα των χεριών και των μαγειρικών σκευών.



ΕΙΚΟΝΑ 1.2.2, Στην παραπάνω εικόνα διαφαίνεται ο κίνδυνος διασταύρωσης μικροοργανισμών (Foodborne Pathogens, Gabriella Kisko).

1.3 ΒΑΚΤΗΡΙΑ – ΙΟΙ – ΠΑΡΑΣΙΤΑ

Τα τρόφιμα, λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς τους σε θρεπτικά συστατικά και της ευκολίας μόλυνσής και ρυπάνσής τους, είναι πάντοτε φορείς μικροοργανισμών. Τα μικρόβια αυτά συμμετέχουν στις φυσικοχημικές και βιολογικές μεταβολές που συμβαίνουν στα τρόφιμα. Αυτό αποτελεί και το αντικείμενο της επιστήμης της μικροβιολογίας των τροφίμων (Food microbiology, M.R. Adams and M.O. Moss).

Ο όρος "μικρόβιο" ή "μικροοργανισμός" είναι όρος της βιολογίας και αφορά ένα σύνολο εμβίων όντων από διάφορες ταξινομικές ομάδες με ορισμένα κοινά χαρακτηριστικά. Οι μικροοργανισμοί είναι αόρατοι με γυμνό οφθαλμό, με μικροσκοπικές διαστάσεις μεγαλύτερες από τη διακριτική ικανότητα του μικροσκοπίου (0.16 μm). Γενικά, πρόκειται για μονοκύτταρους οργανισμούς ή κοινοκυτταρικούς χωρίς εγκάρσια τοιχώματα ή και πολυκύτταρικούς χωρίς όμως διαφοροποίηση των κυττάρων για σχηματισμό οργάνων ή ιστών (The Microbiology of safe food, S. J. Forsythe).

Ως μικροοργανισμοί αναφέρονται όλοι οι μονοκύτταροι μικροοργανισμοί συμπεριλαμβανομένων και των ιών, οι οποίοι είναι μικροσκοπικοί αλλά όχι κυτταρικοί. Τα μικροβιακά κύτταρα διαφέρουν από τα κύτταρα των φυτών και των ζώων, καθώς οι μικροοργανισμοί είναι ανεξάρτητες οντότητες που διενεργούν τις διαδικασίες της ζωής ανεξάρτητα από άλλα κύτταρα. Αντίθετα, τα κύτταρα των φυτών και των ζώων δεν είναι σε θέση να ζουν μόνοι τους στη φύση και ως εκ τούτου υπάρχουν μόνο ως μέρη των πολυκύτταρων δομών, όπως τα συστήματα οργάνων του ζώου ή τα φύλλα των φυτών.

Ανάλογα με την πηγή άνθρακα, αζώτου και ενέργειας, τα μικρόβια διαιρούνται σε τέσσερις ομάδες (Food microbiology, M.R. Adams and M.O. Moss) (The Microbiology of safe food, S. J. Forsythe) :

- α) τα φωτοαυτότροφα, τα οποία χρησιμοποιούν ως πηγή ενέργειας την ηλιακή ακτινοβολία και ως πηγή άνθρακα το CO₂,
- β) τα φωτοετερότροφα, τα οποία χρησιμοποιούν ως πηγή ενέργειας την ηλιακή ακτινοβολία και ως πηγή άνθρακα οργανικές ενώσεις,
- γ) τα χημειοαυτότροφα, τα οποία χρησιμοποιούν το CO₂ ως μοναδική πηγή άνθρακα και αντλούν ενέργεια από τις οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις ανοργάνων

ουσιών, και

δ) τα χημειοετερότροφα, τα οποία χρησιμοποιούν ως πηγή άνθρακα οργανικές ουσίες και αντλούν ενέργεια από οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις οργανικών πάντα ουσιών.

Τα μικρόβια της τελευταίας ομάδας, τα χημειοετερότροφα, είναι αυτά που ενδιαφέρουν κυρίως τη μικροβιολογία τροφίμων και διαιρούνται σε τρεις κατηγορίες ανάλογα με τη σχέση τους προς το υπόστρωμα ή τον ξενιστή πάνω στον οποίο αναπτύσσονται. Έτσι, διακρίνονται σε:

α) παθογόνα μικρόβια, τα οποία αναπτύσσονται πάνω σε ζωντανούς οργανισμούς και δημιουργούν με την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό τους παθολογικές καταστάσεις. Στην περίπτωση μας ενδιαφέρον παρουσιάζουν μόνο όσα μικρόβια μεταφέρονται με τα τρόφιμα και το πόσιμο νερό, φθάνουν ως τον άνθρωπο και τα ανώτερα ζώα, τον μολύνουν και δημιουργούν παθολογικές καταστάσεις.

β) παράσιτα μικρόβια, που αναπτύσσονται πάνω σε ζωντανούς οργανισμούς χωρίς να δημιουργούν νοσηρές ή παθολογικές καταστάσεις, τουλάχιστον υπό ομαλές συνθήκες. Αν όμως μειωθεί η αντοχή του οργανισμού (π.χ. λοιμώξεις), τότε εξελίσσονται σε ισχυρά παθογόνα και προξενούν σοβαρές παθολογικές καταστάσεις.

γ) σαπρόφυτα μικρόβια, που αναπτύσσονται πάνω σε νεκρή οργανική ουσία (όπως είναι πολλά τρόφιμα) και όχι πάνω σε ζωντανούς οργανισμούς. Αναπτυσσόμενα όμως πάνω στα τρόφιμα προξενούν αλλοιώσεις, οπότε είναι ανεπιθύμητα, ή διασπάσεις προς ενδιάμεσα προϊόντα που είναι πολύτιμα για τον άνθρωπο, οπότε είναι ωφέλιμα.

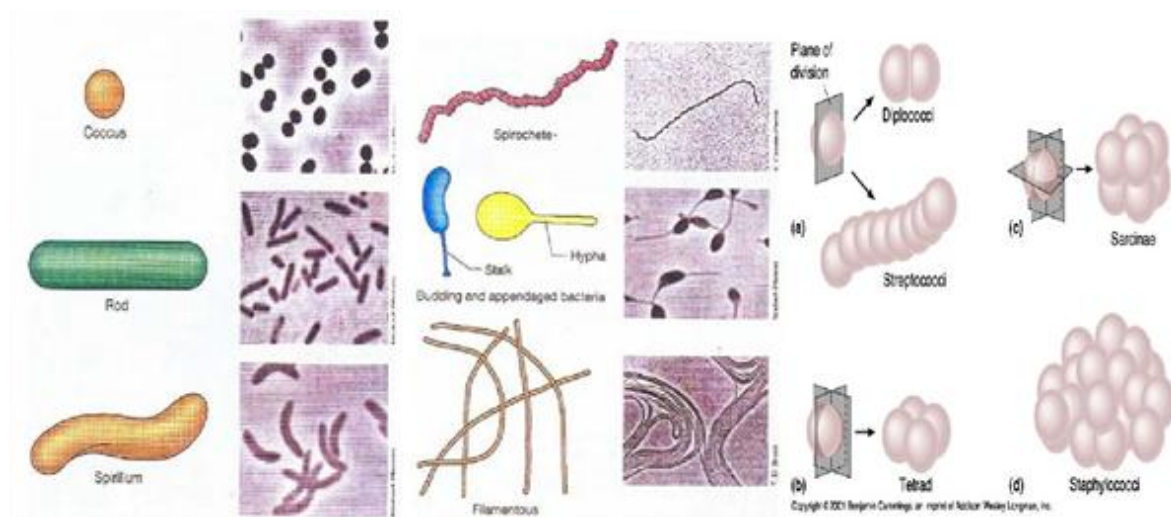
Στο ταξινομικό σύστημα των μικροβίων αναγνωρίζονται οι ακόλουθες ταξινομικές κατηγορίες: τάξη, γένος (genus), είδος (species), στέλεχος (strain). Το είδος παρουσιάζει μια υψηλή βαθμίδα φαινοτυπικής ομοιότητας και σημαντικής ανομοιότητας ως προς άλλα αθροίσματα συγγενών πληθυσμών. Τα διάφορα στελέχη έχουν μεγάλη σημασία για την Μικροβιολογία Τροφίμων. Οι κύριες κατηγορίες μικροοργανισμών είναι οι εξής:

- I. Βακτήρια
 - II. Ιοί
 - III. Παράσιτα
- Αναλυτικότερα :

ΒΑΚΤΗΡΙΑ

Πρόκειται για μικροσκοπικούς μονοκύτταρους οργανισμούς, που πολλαπλασιάζονται με διαίρεση. Είναι ετερότροφοι, αγενείς, χωρίς διάκριτο κυτταρικό πυρήνα, χωρίς χλωροφύλλη και με σφαιρικό (κοκκώδες), ραβδόμορφο ή σπειροειδές σχήμα. Τα σφαιρικά διαιρούνται προς κάθε επίπεδο και διακρίνονται σε διπλόκοκκους, τετράκοκκους, σαρκίνες,

στρεπτόκοκκους και σταφυλόκοκκους. Τα ραβδόμορφα διαιρούνται εγκάρσια και διακρίνονται σε λεπτοτριχοειδή κλωστρίδια (διόγκωση στο μέσο) κεφαλοσπόρια (διόγκωση στο άκρο). Τα σπειροειδή είναι σαν τα ραβδόμορφα παρουσιάζουν όμως απολήξεις ή ελικοειδή περιστροφή και διακρίνονται σε δονάκια και σπειρύλια (Εικόνα 1.3.1). Τα βακτήρια που παρουσιάζουν σπορίωση ονομάζονται βάκιλλοι.



ΕΙΚΟΝΑ 1.3.1, Μορφολογία ορισμένων βακτηρίων (Μικροβιολογία τροφίμων : βακτήρια-ζύμες-μύκητες, Μπαλατσούρας Γεώργιος, 1992).

Τα βακτήρια, ανάλογα με τη χρώση τους κατά Gram, διακρίνονται σε θετικά (+) και σε αρνητικά (-). Η χρώση κατά Gram εξαρτάται από τη σύσταση και τη δομή του βακτηριακού τοιχώματος και είναι θεμελιακή ιδιότητα που συνδέεται με διαφορετική συμπεριφορά όσον αφορά την παθογένεια, την αντοχή στα αντιβιοτικά και άλλους παράγοντες.

Η κυτταρική οργάνωση των βακτηρίων παρουσιάζει ορισμένες ιδιαιτερότητες:

- Δύσκαμπτο κυτταρικό τοίχωμα με κύριο συστατικό την πεπτιδογλυκάνη (με επιπλέον πολυσακχαρίτες για τα Gram (+) και πρωτεΐνες και λιποπρωτεΐνες για τα Gram (-))
- Διαχωρισμός περιεχομένου σε κυτόπλασμα και πυρηνόπλασμα (κυκλικό διπλής περιελίξεως DNA, χωρίς μεμβράνη και οργανίδια)
- Πλασμίδια
- Έλλειψη γένους και μείξη κληρονομικής ουσίας μέσω συζευκτικών μηχανισμών
- Έλυτρο: πηκτώδης περιβάλλουσα πολυσακχαρική μάζα με γλοιώδη υφή (χαρακτηριστική στα χαλασμένα από βακτήρια τρόφιμα)
- Βλεφαρίδες (ή μαστίγια): Εκφύσεις χαρακτηριστικές του βακτηρίου
- Σπόρια: συμπύκνωση κυτταρικού υλικού, που αποτελεί ένα μέσο άμυνας των κυττάρων. Τα σπόρια αντέχουν σε υψηλές θερμοκρασίες, ενώ κάτω από ευνοϊκές συνθήκες δίδουν εκ νέου βλαστικά βακτήρια (germination).

Όσον αφορά την ταξινόμηση των βακτηρίων, η πιο πρόσφατη και περισσότερο αποδεκτή καλύπτεται από αυτήν των προκαρυωτικών κατά Bergey (1984) σε 17 ομάδες. Πρόκειται για μια εμπειρική ταξινόμηση με βάση τη μορφολογία, τη χρώση κατά Gram, την παθογένεια και το άθροισμα αζωτούχων βάσεων στο DNA. Από το σύνολο των βακτηρίων μόνο ορισμένα είδη αφορούν τη βιομηχανία τροφίμων. Βάσει της δράσης τους μπορούν πρακτικά να κατηγοριοποιηθούν σε:

- Παράγοντες παθογόνου μόλυνσης : εκδήλωση παθογένειας δια προσβολής του δέκτη ή μέσω τοξίνης

Παράγοντες αλλοιώσεων : ανεπιθύμητες αλλαγές οργανοληπτικών χαρακτηριστικών, μη παθογόνες

- Παράγοντες ωφελιμιστικής χρήσης : για την παραγωγή χρήσιμων για τον άνθρωπο προϊόντων του μεταβολισμού τους όπως γαλακτικό οξύ (σε τρόφιμα όπως γιαούρτια, τυριά, βουτυρόγαλα, ελιές, τουρσιά, πίκλες, σαλάμι αέρος) και προπιονικό οξύ (σε τυριά ελβετικού τύπου Emmenthaler), οξικό οξύ (παραγωγή ξυδιού).

Τα βακτήρια είναι η κυριότερη πηγή μόλυνσης και αλλοίωσης των τροφίμων. Η συγκριτική “υπεροχή” τους αυτή έναντι των άλλων μικροβίων οφείλεται (Μικροβιολογία τροφίμων, Μπαλατσούρας Γεώργιος):

- I. Στη μεγάλη παραλλακτικότητα των διαφόρων ειδών τους ως προς τις απαιτήσεις σε pH, θρεπτικά συστατικά και θερμοκρασία
- II. Στη δυνατότητα σχηματισμού ενδοσπορίων
- III. Στη δυνατότητα αναερόβιας ανάπτυξης
- IV. Στην έκκριση τοξινών

Παθογόνα βακτήρια

Ισχύει ο παρακάτω εμπειρικός κανόνας για την εύκολη κατηγοριοποίηση των βακτηρίων σε Gram (-) και Gram (+) (Μικροβιολογία τροφίμων, Μπαλατσούρας Γεώργιος):

- Τα Gram (-) βακτήρια εκδηλώνουν παθογένεια δια προσβολής του δέκτη (ανθρώπου). Η εκδήλωση των συμπτωμάτων συμβαίνει μετά από τουλάχιστον είκοσι τέσσερις ώρες. Τα συμπτώματα διαρκούν και καταπονούν αλλά είναι σπανίως θανατηφόρα όπως στην περίπτωση της *Salmonella* spp. Εξαιρεση αποτελεί το βακτήριο *Escherichia coli*, το οποίο αν και είναι Gram (-) βακτήριο, εντούτοις παράγει τοξίνη. Παραδείγματα τέτοιων βακτηρίων είναι τα εξής: *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni*, *Vibrio parahaemolyticus*, τα οποία απαντώνται σε έντερα, κόπρανα, έδαφος, γάλα, κρέας (πουλερικά) και θαλασσινά. Η ανίχνευση τους σε δείγματα τροφίμων αποτελούν δείκτες μη ορθής βιομηχανικής πρακτικής και καλής υγιεινής πρακτικής - Good Manufacturing Practices (GMP) και Good Hygiene Practices (GHP). Η ύπαρξη τους ελέγχεται με θερμική κατεργασία, διαχωρισμό των πρώτων υλών και ορθή βιομηχανική πρακτική.

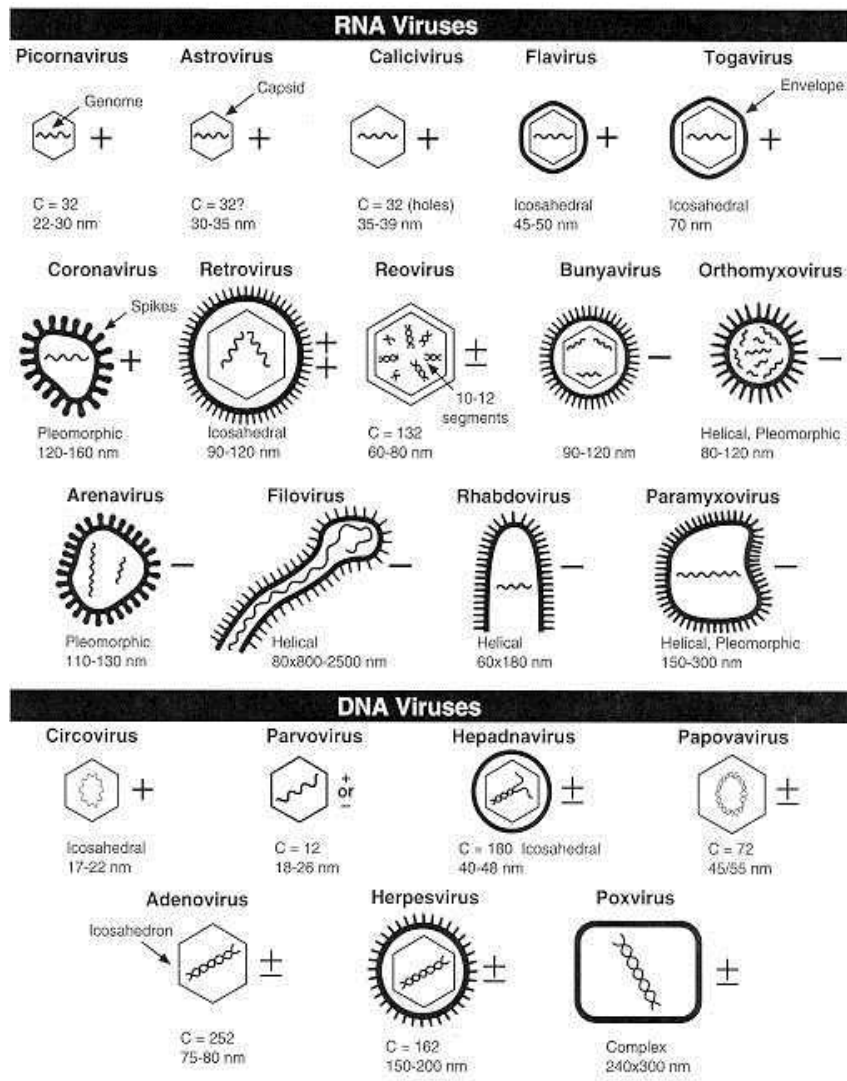
- Τα Gram (+) βακτήρια εκδηλώνουν παθογένεια μέσω τοξίνης. Η εκδήλωση των συμπτωμάτων συμβαίνει εντός μίας έως έξι ωρών. Τα συμπτώματα διαρκούν είκοσι τέσσερις έως σαράντα οκτώ ώρες και καταπονούν, χωρίς όμως να είναι επικίνδυνα όπως στην περίπτωση του *Staphylococcus aureus*. Σημαντική εξαίρεση στον κανόνα αυτό αποτελεί το Gram (+) *Clostridium botulinum*, το οποίο παράγει μια ισχυρότατη θανατηφόρο νευροτοξίνη. Παραδείγματα τέτοιων βακτηρίων είναι τα εξής: *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus subtilis*.
- Emerging pathogens τα οποία χαρακτηρίζονται ως “αναδυόμενα” παθογόνα βακτήρια και μπορεί να είναι Gram (+) ή Gram (-). Η επικινδυνότητα και η επιδημιολογική σημασία των εν λόγω βακτηρίων καθώς και η ανάγκη λήψης ειδικών μέτρων κατά την παραγωγή των σχετικών τροφίμων αναγνωρίστηκε πρόσφατα. Παραδείγματα τέτοιων βακτηρίων είναι τα παρακάτω: *Yersinia enterocolitica*, *Aeromonas hydrophila*, *Plesiomonas shigelloides*, *Vibrio vulnificus*, *Escherichia coli* O157.

ΙΟΙ

Ο ιός δρα μολύνοντας τα κύτταρα ενός οργανισμού, ενσωματώνοντας το γενετικό του υλικό στο γονιδίωμα αυτών και χρησιμοποιώντας για τον πολλαπλασιασμό του, τους μηχανισμούς αντιγραφής, μεταγραφής και μετάφρασης του κυττάρου, όπως και τα περισσότερα ένζυμα που χρειάζεται για την επιβίωση του (EFSA REPORT 2013). Οι ιοί χαρακτηρίζονται, κατά συνέπεια, ως υποχρεωτικά ενδοκυτταρικά παράσιτα των οποίων το μέγεθος κυμαίνεται από 0,025 μm μέχρι 0,25 μm.

Ως προς τη δομή τους οι ιοί είναι σωματίδια που αποτελούνται από ένα πρωτεϊνικό περίβλημα, μέσα στο οποίο υπάρχει το γενετικό τους υλικό. Αυτό είναι συνήθως ένα μόριο νουκλεϊκού οξέος, (DNA ή RNA) που μπορεί να είναι με μονό ή διπλό κλώνο, κυκλικό (αλυσίδα), γραμμικό ή και σε χωριστά τμήματα. Το πρωτεϊνικό περίβλημα ονομάζεται καψίδιο, είναι ποικίλου σχήματος (ελικοειδές, ραβδοειδές, πολυεδρικό ή συνδυασμός) και αποτελείται από πολλές υπομονάδες ενός είδους πρωτεΐνης, ενώ η διάμετρός του ποικίλλει μεταξύ 10 και 300 νανομέτρων. Μερικοί ιοί που προσβάλλουν ζωικά κύτταρα έχουν εξωτερικά του καψιδίου ένα μεμβρανώδη φάκελο, περίβλημα, που αποτελείται τόσο από υλικό του ιού όσο και του ξενιστή, δηλαδή από λιπίδια, πρωτεΐνες και υδατάνθρακες, όπου σε μερικά συνυπάρχουν και προεξοχές που μοιάζουν με αγκάθια. Μερικοί από τους ιούς που προσβάλλουν κύτταρα βακτηρίων (βακτηριοφάγοι, ή απλά φάγοι, έχουν πιο περίπλοκα καψίδια, που αποτελούνται από πολύπλοκες κεφαλές και ουρές, με τις οποίες προσκολλώνται στα βακτήρια.

Στην παρακάτω εικόνα φαίνονται οι ιοί κατηγοριοποιημένοι, σύμφωνα με το περιεχόμενο του πρωτεϊνικού τους περιβλήματος, σε DNA και RNA ιούς (Εικόνα 1.3.2). Οι εν λόγω ιοί είναι διατεταγμένοι κατά σειρά αυξανόμενου μεγέθους:



ΕΙΚΟΝΑ 1.3.2, Οι ιοί κατηγοριοποιημένοι ανά περιεχόμενο πρωτεϊνικού περιβλήματος και κατά σειρά αυξανόμενου μεγέθους (Hans R. Gelderblom Medical Microbiology 4th Edition).

Σε αυτό το σημείο αξίζει να αναφερθεί πως οι ιοί δεν χρειάζονται τρόφιμα, νερό ή αέρα για να επιβιώσουν και ως εκ τούτου δεν προκαλούν καμία αλλοίωση στα τρόφιμα στα οποία παρασιτούν. Επιβιώνουν στο νερό, στα τρόφιμα ή στον εντερικό σωλήνα του ανθρώπου, ενώ η εμφάνισή τους σχετίζεται με την κακή υγιεινή του ατόμου. Η διάδοση του ιού γίνεται είτε μέσω απ' ευθείας μόλυνσης από άτομο ήδη μολυσμένο είτε έμμεσα μέσω τροφίμου το οποίο έχει έρθει σε επαφή με απόβλητα.

ΠΑΡΑΣΙΤΑ

Ανάλογα με το είδος του ξενιστή διακρίνονται σε ζωοπαράσιτα και σε φυτοπαράσιτα. Τα παράσιτα από βιολογική άποψη διακρίνονται σε μονοξενικά (που παραμένουν σε ένα ξενιστή) και σε πολυξενικά (όταν στη διάρκεια της ζωής τους εναλλάσσουν ξενιστές). Επίσης διακρίνονται και σε προαιρετικά ή υποχρεωτικά τα οποία και επιφέρουν μια σειρά από επιπτώσεις, που μπορεί να είναι η ελάχιστη πρόκληση βλάβης στον ξενιστή που συνεχίζει

να ζει και να αναπαράγεται φυσιολογικά, (μια τέτοια περίπτωση προσαρμογής αποτελούν οι ταινίες), που καταχρηστικά λέγονται αβλαβή, σε αντιδιαστολή εκείνων που μπορεί να επιφέρουν ακόμη και τον θάνατο του ξενιστή (όπως λόγου χάρη. το παράσιτο της ελονοσίας), που λέγονται επιβλαβή ή επικίνδυνα. Μεταξύ ξενιστή και παρασίτου μπορεί να υπάρξει συνεξέλιξη. Τέλος, τα παράσιτα αντλούν την τροφή τους από τον ξενιστή, ενώ αξίζει να αναφερθούν δύο κυρίως τύποι αυτών, οι οποίοι αφορούν τα τρόφιμα και το νερό:

- Παρασιτικοί σκώληκες (νηματώδεις, κεστώδεις και τρηματώδεις σκώληκες)
- Παρασιτικά πρωτόζωα (*Cryptosporidium parvum*, *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*).

1.4 ΒΑΚΤΗΡΙΑ

Στην παρούσα μελέτη διεξήχθη έλεγχος των τροφίμων από **μικροβιολογικής** απόψεως με απώτερο σκοπό την αποτίμηση των βιολογικών κινδύνων που εγκυμονούν. Οι μικροοργανισμοί που παρατίθενται παρακάτω είναι ικανοί να προκαλέσουν σοβαρά προβλήματα υγείας στο καταναλωτικό κοινό, ανάλογα με τους πληθυσμούς τους στο εκάστοτε τρόφιμο και την ευαισθησία των καταναλωτών, ενώ δύνανται να αλλοιώσουν το παραγόμενο προϊόν (Κλινική Μικροβιολογία και Εργαστηριακή Διάγνωση Λοιμώξεων, Αρσένης Α.):

- ❖ **Coliforms:** ή αλλιώς κολοβακτήρια (κολίμορφα βακτήρια) (συμπεριλαμβανομένων και των κοπρανώδων βακτηρίων) / *E. coli* ανιχνεύονται σε στερεά ή υγρά τρόφιμα. Συνιστούν μια ευρύτερη ομάδα της οικογένειας των εντεροβακτηριοειδών και χαρακτηρίζονται από την ικανότητα τους να ζυμώνουν τη λακτόζη με παραγωγή οξέος και αερίου. Οι αντιπρόσωποι των κολοβακτηριοειδών ανήκουν στα γένη *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* και *Klebsiella*. Τα κολίμορφα είναι **αερόβια**, **μικροαερόφιλα** ή **δυσήτικα αναερόβια** (π.χ. τα κοπρανώδη βακτήρια), **Gram-αρνητικά**, **μη σπορογόνα βακτήρια**. Η *E. coli*, συνολικά και ειδικά οι συγκεκριμένοι ορολογικοί και τοξινογόνοι τύποι, προκαλούν πολλές λοιμώξεις, όχι μόνο εντερικές αλλά και λοιμώξεις που προσβάλλουν όλα τα συστήματα και τα όργανα του οργανισμού (εντερικές λοιμώξεις, ουρολοιμώξεις, αιμολυτικό σύνδρομο, ουραιμικό σύνδρομο, μηνιγγίτιδα, σηψαιμία, ευκαιριακές λοιμώξεις και ενδοτοξικό σοκ), αποτελώντας έτσι “δείκτη” της υγιεινής καταστάσεως ενός τροφίμου.
- ❖ **Ολική μικροβιακή χλωρίδα:** (σε θερμοκρασία 35° C) αναφέρεται στο σύνολο των μικροοργανισμών που απαντώνται κυρίως σε κρεατικά και αποτελεί την πιο συνηθισμένη μέθοδο ανάλυσης τροφίμων. Χαρακτηριστικά επικίνδυνα μεσόφιλα βακτήρια είναι τα ***Staphylococcus aureus*** και ***Escherichia coli***. Χαμηλή ΟΜΧ περιμένουμε σε ένα θερμικά επεξεργασμένο τρόφιμο (λόγου χάρη πίτσα, κονσέρβα, παστεριωμένο γάλα). Ένα νωπό προϊόν που έχει χαμηλή ΟΜΧ πιθανόν και να δείχνει καλές συνθήκες υγιεινής, όπως λόγου χάρη σε μία πράσινη σαλάτα

που έχει καλά πλυθεί, η ΟΜΧ θα είναι χαμηλή και αυτό θεωρείται θετικό. Υψηλή ΟΜΧ σε ένα τρόφιμο υποδηλώνει ότι οι συνθήκες επεξεργασίας και συντήρησης δεν ήταν ικανοποιητικές. Όμως, υψηλή ΟΜΧ θα μετρηθεί και σε ένα «ζωντανό» γιαούρτι που περιέχει υψηλή συγκέντρωση προβιοτικών μικροοργανισμών. Συνεπώς, δεν είναι πανάκεια η γενίκευση πως η χαμηλή ΟΜΧ προϋποθέτει και ικανοποιητικές συνθήκες υγιεινής.

- ❖ **Enterobacter:** αποτελεί γένος των κολίμορφων βακτηρίων. Εμφανίζουν **σχήμα ράβδου** και είναι **μη σποριογόνα** της οικογένειας Enterobacteriaceae. Αρκετά στελέχη αυτών των βακτηρίων είναι παθογόνα και προκαλούν ευκαιριακές λοιμώξεις για αυτό κρίνεται σημαντική η ανίχνευση τους στα τρόφιμα. Το γένος αυτό είναι **Gram αρνητικό** και **δυσνητικά αναερόβιο**.
- ❖ **Ζύμες:** αποτελούν μία ομάδα μονοκύτταρων μυκήτων. Πολλαπλασιάζονται ταχύτατα κάτω από **αερόβιες συνθήκες**, ενώ απουσία O₂ μετατρέπουν τη γλυκόζη σε αιθυλική αλκοόλη. Αποτελούν την πιο σημαντική και ευρύτερα χρησιμοποιούμενη κατηγορία μικροοργανισμών στη βιομηχανία. Βρίσκονται στον αέρα, στο έδαφος, στα φυτά, στα ζώα, στο νερό και σε μερικά τρόφιμα. Αναπτύσσονται καλά σε χαμηλής υγρασίας γλυκά και όξινα τρόφιμα, ενώ μερικά παράγουν επικίνδυνες χημικές ουσίες, τις μυκοτοξίνες όπως παραδείγματος χάρη τις αφλατοξίνες.
- ❖ **Salmonella:** Η σαλμονέλα είναι ένα γένος παθογόνων **ραβδόμορφων** κινητών βακτηρίων (εξαιρέσεις αποτελούν τα μη κινητά *Salmonella gallinarum* και *Salmonella pullorum*), που προκαλεί ποικίλες ασθένειες στα έντερα και το στομάχι. Οι ασθένειες αυτές ονομάζονται σαλμονέλλωση. Η σαλμονέλα είναι ένα **μη-σπορογόνο, μεσόφιλο, δυσνητικά αναερόβιο** βακτήριο. Οι δύο κυριότερες κατηγορίες σαλμονέλας είναι η τυφική και η μη τυφική σαλμονέλλωση. Η σαλμονέλλωση προκαλείται, όταν το μικρόβιο διεισδύσει στο επιθήλιο του λεπτού εντέρου και προκαλέσει φλεγμονή, με αποτέλεσμα -σύμφωνα με στοιχεία- να παραχθεί μια εντεροτοξίνη στα εντερικά κύτταρα. Η ασθένεια αυτή, προέρχεται συνήθως από το νερό, το χώμα, τα έντομα, τις επιφάνειες εργοστασίων και κουζινών, τα ζωικά περιττώματα και τα ακατέργαστα κρέατα, πουλερικά και θαλασσινά. Οι τροφογενείς λοιμώξεις από *Salmonella* (Σαλμονελώσεις) στον άνθρωπο χαρακτηρίζονται από διάφορα κλινικά σύνδρομα, όπως ο εντερικός (τυφοειδής) πυρετός, η εντοπισμένη εντεροκολίτιδα και η συστηματική μόλυνση. Η κύρια οδός μετάδοσης της Σαλμονέλας στον άνθρωπο είναι η εντεροστοματική οδός (κοπρανώδης μόλυνση, επιμόλυνση λόγω μη τήρησης υγιεινής). Ωστόσο, οι τρόποι μετάδοσης ποικίλλουν, περιπλέκοντας την ιχνηλασιμότητα και την αναγνώριση της οδού μόλυνσης σε ανθρώπινα περιστατικά. Στις κατηγορίες τροφίμων που πιθανώς διακρίνονται από μεγαλύτερη επικινδυνότητα για τη Δημόσια Υγεία, περιλαμβάνονται τα προϊόντα κρέατος και μερικά προϊόντα που καταναλώνονται ωμά ή ελαφρώς μαγειρεμένα, όπως προϊόντα κρέατος πουλερικών, αυγά και προϊόντα που περιέχουν, μη παστεριωμένο γάλα και προϊόντα αυτού. Τα λαχανικά, οι μη παστεριωμένοι χυμοί

και η σπιτική μαγιονέζα είναι επίσης επικίνδυνα. Σε γενικές γραμμές, τα τρόφιμα αυτά προέρχονται από την πρωτογενή παραγωγή χωρίς να υποστούν κάποιο στάδιο πλήρους θερμικής επεξεργασίας ή είναι δυνατή η επιμόλυνση τους εξαιτίας ακατάλληλων χειρισμών μετά τη θερμική επεξεργασία. Συμπερασματικά, ο κίνδυνος πρόκλησης Σαλμονέλλωσης εξαρτάται από τον έλεγχο της παρουσίας της στο ζωντανό ζώο ή στα φυτά, από τους ελέγχους που εφαρμόζονται κατά τη σφαγή ή τη συγκομιδή, από την επεξεργασία που εφαρμόζεται αλλά και από τον σωστό ή μη τρόπο διακίνησης και αποθήκευσης των τροφίμων. Σημαντικός είναι επίσης και ο σωστός χειρισμός κατά την επεξεργασία και προετοιμασία των τροφίμων, όπου τυχόν λανθασμένοι χειρισμοί και μη τήρηση κανόνων υγιεινής από πλευράς των χειριστών δύνανται να επιφέρουν επιμόλυνση του καθαρού τροφίμου ή επιμόλυνση του εξυγιανθέντος από προηγούμενες θερμικές επεξεργασίες.

- ❖ **Listeria monocytogenes:** αποτελεί ένα **μη-σποριογόνο**, κοντό, ίσιο, **αερόβιο και εκλεκτικά αναερόβιο**, βακτήριο. Το γένος αυτό είναι **Gram-θετικό** ανήκει στα ψυχότροπα βακτήρια. Προκαλεί μία ασθένεια που ονομάζεται λιστερίωση και αποτελεί την τρίτη κατά σειρά αιτία ποθογόνου μικροοργανισμού που οδηγεί στον θάνατο. Προσβάλλει κυρίως τις εγκύους και τα νεογέννητα. Η *Listeria* είναι μικρόβιο διεισδυτικό. Διαθέτει ισχυρή παθογόνο δράση με ειδικό τροπισμό προς τα κύτταρα του ΚΝΣ. Ο άνθρωπος και τα ζώα μολύνονται από μολυσμένες τροφές και νερό. Η λιστέρια αποικίζει τον εντερικό αυλό του ξενιστή και από εκεί τους ιστούς του. Στους υγιείς ενήλικες η λιστερίωση εμφανίζεται ως νόσος του ΚΝΣ (μηνιγγίτιδα, εγκεφαλίτιδα, μηνιγγοεγκεφαλίτιδα). Στις ευαίσθητες και ασθενείς ομάδες προκαλεί ποικίλες συστηματικές λοιμώξεις. Στην έγκυο γυναίκα εμφανίζεται ως ήπια νόσος με τη μορφή γρίπης. Έμβρυα που μολύνονται στη μήτρα αποβάλλονται ή γεννώνται πεθαμένα. Τα νεογέννητα που μολύνονται κατά τη διάρκεια του τοκετού ή αμέσως μετά, μπορεί να εκδηλώσουν μηνιγγίτιδα. Πηγή των λιστεριών συνιστά το **φυσικό περιβάλλον, το έδαφος, τα φυτά, οι σε αποσύνθεση φυτικές ουσίες, τα νερά**. Ο πιο συχνός τρόπος μόλυνσης του ανθρώπου είναι μέσω της τροφικής αλυσίδας (κατανάλωση **γαλακτοκομικών προϊόντων που προέρχονται από ζώα άρρωστα με μαστίτιδα, ή φυτικών και ζωικών τροφών που λιπάνθηκαν με κόπρανα ζώων**). Μόλυνση των τροφίμων με λιστερίες μπορεί να γίνει έμμεσα κατά την επαφή καθαρών τροφίμων με μολυσμένα (διασταυρούμενη μόλυνση), όπως αυτό συμβαίνει στα οικιακά ψυγεία όπου τα τρόφιμα επιμολύνονται πιο εύκολα (π.χ οι μαγειρεμένες τροφές που τυχάνει να μολυνθούν από νωπές μολυσμένες όπως από το κρέας, από τυριά κ.α.).
- ❖ **Οξυγαλακτικά:** είναι **Gram-θετικά, αρνητικά στην καταλάση, οξεόφιλα, μη-σπορογόνα**, δυνητικά **αναερόβια/μικροαερόφιλα** βακτήρια. Κυριότερο γένος αυτής της κατηγορίας βακτηρίων είναι το *Lactobacillus*. Σε αυτήν τη κατηγορία ανήκουν και η *Listeria* και ο *Στρεπτόκοκκος*.
- ❖ **Staphylococcus aureus:** αποτελεί ένα **μη-σπορογόνο, Gram-θετικό**, δυνητικά **αναερόβιο/μικροαερόφιλο** κόκκο. Αποτελεί φυσική χλωρίδα, μόνιμη ή περιστασιακή, του δέρματος και ορισμένων βλεννογόνων του σώματος. Προκαλεί

λοιμώξεις του δέρματος και των βλεννογόνων μετά από λύση της συνεχείας τους, καθώς και ακμή προσώπου στον άνθρωπο και τα ζώα. Παράγει διάφορες τοξίνες (A, B, C1, C2, C3, D, E, H, I) με διαφορές στην τοξικότητα και θερμοανθεκτικότητα. Οι χρόνοι που συνήθως μαγειρεύονται τα τρόφιμα δεν εξουδετερώνουν την τοξίνη (θερμοαντοχή). Ο *St. aureus* επειδή βρίσκεται σε **πρώτες ύλες τροφίμων, προσωπικό χειρισμού τροφίμων, περιβάλλον επεξεργασίας** κ.α., είναι φυσικό να συναντάται στα τρόφιμα. Συνεπάγεται λοιπόν ότι αποτελεί έναν καλό δείκτη ατομικής υγιεινής από την πλευρά του προσωπικού που χειρίζεται τα τρόφιμα. Στόχος λοιπόν είναι η μείωση του μικροβιακού φορτίου του, το οποίο σε χαμηλές συγκεντρώσεις δεν προκαλεί νόσο. Παράλληλα, σημαντική είναι και η εφαρμογή κατάλληλων θερμικών επεξεργασιών, η οποία με τη σειρά της οδηγεί στον μη πολλαπλασιασμό των σταφυλοκόκκων και στην μη παραγωγή επικίνδυνων τοξινών από αυτούς.

- ❖ **Staphylococcus spp:** ανήκει στην οικογένεια Micrococaceae και αποτελεί ένα **Gram-θετικό, αερόβιο** βακτήριο. Είναι θετικό στην καταλάση και εμφανίζει σχήμα κόκκων.

Περίληπτικά στον παρακάτω πίνακα αναγράφονται μερικοί από τους παθογόνους μικροοργανισμούς των οποίων η ανίχνευση απασχολεί την εν λόγω εργασία, λόγω της παρουσίας τους στα τρόφιμα (Ασφάλεια τροφίμων: εφαρμογή της ανάλυσης επικινδυνότητας και κρίσιμων σημείων ελέγχου (HACCP) στις βιομηχανίες τροφίμων και ποτών, Αρβανιτογιάννης Ι., Σάνδρου Δ., Κούρτης Λ.)

Βακτήριο	<i>Salmonella</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>
Φυσικό περιβάλλον	Πουλερικά, κατοικίδια και άγρια ζώα, άνθρωπος, έντομα, πουλιά.	Εδαφος, βλάστηση, άνθρωπος, λύματα, νερό, ζώα (ευρεία διάδοση).	Δέρμα, αμυχές, βλενογόνος.	Βοοειδή, κοπριά, κρέας, γάλα.
Τρόφιμα σχετιζόμενα	Γάλα, ωμά πουλερικά, αυγά, ωμό κρέας.	Γάλα, μαλακά τυριά, ωμό κρέας, παγωτά, λαχανικά.	Ψάρια, κρέας, γάλα, τυρί, ζυμαρικά, αλλαντικά.	Κιμάς, κρέατα, γάλα.
Σημαντικότητα	Συνήθης υπεύθυνος τροφικής παθογένειας λόγω κακής υγιεινής ή ανεπαρκούς επεξεργασίας. Έντονα συμπτώματα. Σπάνια θανατηφόρο.	Δυνατότητα ανάπτυξης σε θερμοκρασία ψυγείου. Μικροοργανισμός ευρείας διάδοσης. Θανατηφόρο σε 30% των προσβαλομένων.	Μπορεί εύκολα να περάσει από τους ανθρώπους στο τρόφιμο σε συνθήκες μη σωστών χειρισμών. Παράγει θερμοάντοχη τοξίνη.	Εντεροαιμορραγικό έντονα συμπτώματα-πιθανόν θανατηφόρο.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

2.1 ΕΠΙΚΙΝΔΥΝΟΤΗΤΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

Σύμφωνα με τη διεθνή ορολογία με τον όρο «**τρόφιμα**» αναφέρουμε όλα τα στερεά ή υγρά προϊόντα προς βρώση του ανθρώπου. Στην εποχή μας, όμως, μια εποχή όπου οι σύγχρονες συνθήκες παραγωγής τροφίμων, η χρήση φυτοφαρμάκων και ορμονών, αλλά κυρίως η αναγωγή της λογικής του κέρδους ως υπέρτατη αξία καταλαμβάνουν πρωταρχικό ρόλο, ο φόβος των καταναλωτών για την αγορά μη υγιεινών τροφίμων αυξάνεται συνεχώς. Κατά αυτόν τον τρόπο συνεπώς, καθίσταται πλέον σαφές πως οι τροφές που καταναλώνουμε ενδέχεται να επιφέρουν σοβαρές αρνητικές επιπτώσεις στην υγεία του εν δυνάμει καταναλωτή. Ως εκ τούτου με τον όρο «υγιεινά τρόφιμα» νοούνται τα τρόφιμα τα οποία από υγιεινή άποψη είναι κατάλληλα προς βρώση από τον άνθρωπο.

Στα πλαίσια αυτής της εργασίας θα τονισθεί ιδιαίτερα η ανάγκη διασφάλισης της υγιεινής των τροφίμων, η οποία καθίσταται δυνατή μέσω της ανίχνευσης και καταμέτρησης των εκάστοτε παθογόνων μικροοργανισμών τόσο στα ίδια τα τρόφιμα όσο και τις επιφάνειες που έρχονται σε επαφή με αυτά. Ένας βασικός πυλώνας ενός προγράμματος διασφάλισης της υγιεινής είναι η μικροβιολογική ανάλυση του εκάστοτε τροφίμου με βάση τα καθοριζόμενα κριτήρια για κάθε είδος. Κατ' αυτό τον τρόπο καθίσταται εφικτή η συχνή και αδιάλειπτη παρακολούθηση της κατάστασης της υγιεινής των τροφίμων τόσο σε κρατικό όσο και σε επιχειρησιακό επίπεδο με σκοπό την ανίχνευση τυχόν κινδύνων και κατ' επέκταση την αύξηση της ποιότητας των προς κατανάλωση αγαθών (Εφαρμογή και έλεγχος του συστήματος HACCP, Αμβροσιάδης Ι.).

Η ύπαρξη και επομένως η ανίχνευση μικροοργανισμών μέσω της μικροβιολογικής ανάλυσης είναι δυνατόν να επιτευχθεί με οπτικά, βιοχημικά, ανοσολογικά, ή γενετικά μέσα. Η ανάλυση μπορεί να γίνει είτε πριν από τον εμπλουτισμό (μέθοδοι απαρίθμησης ή ποσοτικές), είτε μετά από τον εμπλουτισμό (ποιοτικές μέθοδοι, γνωστές και ως τεστ παρουσίας/απουσίας). Ως εκ τούτου, μιας και η εξασφάλιση υψηλών προτύπων και επιπέδου ασφάλειας των τροφίμων συμβάλλει στην προστασία της υγείας των καταναλωτών και της Δημόσιας Υγείας γενικότερα, αποτελεί θεμελιώδη αρχή σε κάθε σύγχρονη κοινωνία. Η ασφάλεια αφορά όλα τα στάδια επεξεργασίας του τροφίμου από την πρώτη ύλη έως και την παρασκευή και εμπορία, γεγονός που περιλαμβάνει ένα τεράστιο φάσμα επεξεργασιών του τροφίμου αλλά και αρμοδιοτήτων και χειρισμών των εργαζομένων που δραστηριοποιούνται στον ανάλογο κλάδο. Τα κρούσματα τροφολητηριάσεων που κάνουν την εμφάνισή τους τα τελευταία χρόνια έχουν εγείρει την ανησυχία των καταναλωτών σχετικά με τα προϊόντα που φτάνουν συσκευασμένα ή όχι στα ράφια των πολυκαταστημάτων με αποτέλεσμα ο κλάδος της Υγιεινής Τροφίμων να κερδίζει όλο και περισσότερο έδαφος και οι τεχνικές του να εξελίσσονται συνεχώς με σκοπό την στοχευόμενη και μεθοδευμένη ανίχνευση των παθογόνων μικροοργανισμών με τυποποιημένες τεχνικές (π.χ. οι μέθοδοι ISO-International Standard Organization). Στις

περισσότερες περιπτώσεις, πρόκειται για τις παραδοσιακές μεθόδους καλλιέργειας που χρησιμοποιούν επιλεκτικά υγρά ή στερεά μέσα καλλιέργειας, για την αύξηση, την απομόνωση και την απαρίθμηση του μικροοργανισμού-στόχου και ταυτόχρονα εμποδίζουν την ανάπτυξη άλλων μικροοργανισμών που υπάρχουν στο τρόφιμο. Αξίζει να σημειωθεί ότι ύστερα από μία σειρά ερευνών παγκοσμίως έχει διαπιστωθεί πως οι αιτίες της πληθώρας των τροφιμογενών λοιμώξεων κυρίως σε περιπτώσεις ωμών λαχανικών και φρούτων είναι τα παρακάτω βακτήρια: *Escherichia coli*, *Salmonella* spp, *Listeria*, *Staphylococcus*.

Σε διάφορα επιστημονικά πεδία, όπως η ιατρική και η ασφάλεια τροφίμων, κρίνεται αναγκαία η ταχεία και αξιόπιστη ταυτοποίηση των μικροοργανισμών με αποτέλεσμα να έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι που πληρούν αυτά τα κριτήρια. Οι μέθοδοι για την ταυτοποίηση των βακτηρίων βασίζονται στην ανάλυση των μορφολογικών, φυσιολογικών, βιοχημικών ή γενετικών χαρακτηριστικών τους. Τυποποιημένα συστήματα ελέγχου (API) συμπληρώνονται από τις παραδοσιακές μεθόδους καλλιέργειας και μικροσκοπίας και χρησιμοποιούνται στα εργαστήρια για την ταυτοποίηση των μικροοργανισμών. Με αυτές τις μεθόδους ο μέσος χρόνος που απαιτείται για την αξιόπιστη και έγκυρη ταυτοποίηση ανέρχεται σε 6 έως 18 ώρες.

Τα τελευταία χρόνια, λόγω της ανάγκης μείωσης του χρόνου ανάλυσης των εκάστοτε δειγμάτων χρησιμοποιούνται μέθοδοι PCR, που βασίζονται στην ανάλυση της ακολουθίας της μικρής υπομονάδας του rRNA ή επιλεγμένων γονιδίων, καθώς επίσης και φασματομετρίας μάζας. Οι παραπάνω μέθοδοι μείωσαν σημαντικά τον χρόνο ανάλυσης αλλά συγχρόνως αύξησαν την ευαισθησία, την εξειδίκευση και την αυτοματοποίηση. Παρακάτω θα γίνει λόγος για την χρήση της φασματομετρίας μάζας με ιοντισμό εκρόφησης με λέιζερ υποβοηθούμενο από υλικό μήτρας και με χρήση αναλυτή μάζας τύπου χρόνου πτήσης (MALDI-TOF-MS: Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization - Time Of Flight Mass Spectrometry). Η μέθοδος αυτή παρέχει τη δυνατότητα ταυτοποίησης μικροοργανισμών και συλλογής πληροφοριών αναφορικά με το μοριακό βάρος πολικών βιοπολυμερών, των οποίων οι μοριακές μάζες κυμαίνονται από μερικές χιλιάδες έως αρκετές εκατοντάδες χιλιάδες Dalton, ταυτόχρονης ανίχνευσης επιμέρους στοιχείων σε ένα δείγμα προσμίξεων χάρη στο ευρύ φάσμα λόγων m/z , αλλά και γρήγορου προσδιορισμού των μοριακών βαρών των πρωτεϊνών, καθότι το δείγμα χρήζει περιορισμένης μεταχείρισης. Ενδεικτικά αξίζει να αναφερθούν και άλλοι μέθοδοι όπως η φασματομετρία μάζας (MS) με πυρόλυση, με βομβαρδισμό ταχέων ατόμων (FAB-MS), με αέρια χρωματογραφία (GC-MS), και ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό (ESI-MS), οι οποίες είχαν χρησιμοποιηθεί για τον χαρακτηρισμό βακτηρίων από το 1975.

Στο σημείο αυτό αξίζει να διασαφηνιστεί η έννοια του σχετιζόμενου με τα τρόφιμα κινδύνου, ο οποίος αποτελεί τον παράγοντα/ουσία που καθιστά το τρόφιμο ακατάλληλο ή επικίνδυνο για κατανάλωση. Όσες τεχνικές προαναφέρθηκαν αποσκοπούν στην εξάλειψη του εκάστοτε κινδύνου στην περίπτωση των τροφίμων. Οι κίνδυνοι διακρίνονται σε (Διαφάνειες μαθήματος <<Τεχνικές Ανάλυσης Τροφίμων>>, του τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης) :

- **Χημικούς**, οι οποίοι με τη σειρά τους ανιχνεύονται είτε ως φυσικά απαντώμενες ουσίες είτε ως χημικά πρόσθετα. Στην περίπτωση των φυσικά απαντώμενων ουσιών

ανήκουν οι μυκοτοξίνες καθώς επίσης και άλλα είδη τοξινών, ενώ στην περίπτωση των χημικών πρόσθετων κατατάσσονται τα γεωργικά φάρμακα, οι τοξικές ουσίες (μόλυβδος, υδράργυρος), πρόσθετα τροφίμων (συντηρητικά, βελτιωτικά γεύσης, χρωστικές), λιπαντικά, απολυμαντικά, απορρυπαντικά και υλικά συσκευασίας.

- **Φυσικούς**, οι οποίοι αναφέρονται συχνά ως ξένα αντικείμενα και περιλαμβάνουν οποιαδήποτε φυσικά υλικά, τα οποία δεν βρίσκονται φυσιολογικά στα τρόφιμα και μπορούν να προκαλέσουν ασθένειες και τραυματισμούς σε αυτόν που τα καταναλώνει. Παραδείγματα φυσικών κινδύνων αποτελούν τα μεταλλικά, πλαστικά αντικείμενα και οι τρίχες.
- **Βιολογικούς**, οι οποίοι διακρίνονται σε μακροβιολογικούς και μικροβιολογικούς. Οι μακροβιολογικοί κίνδυνοι περιλαμβάνουν τα έντομα και δεν αποτελούν άμεσο κίνδυνο για τον άνθρωπο αλλά έμμεσο διότι συμβάλλουν στη μεταφορά μικροοργανισμών στα τρόφιμα. Οι μικροοργανισμοί που αποτελούν μικροβιολογικούς κινδύνους για τα τρόφιμα διακρίνονται σε βακτήρια, ιούς, παράσιτα και prions.

Η κατάταξη των βιολογικών κινδύνων κατά τη Διεθνή Επιτροπή για τις Μικροβιολογικές Προδιαγραφές των Τροφίμων (International Committee for Microbiological Specifications of Foods- ICMSF) είναι η εξής:

- I. Σοβαροί κίνδυνοι
- II. Μέτριοι κίνδυνοι εκτεταμένης διάδοσης
- III. Μέτριοι κίνδυνοι περιορισμένης διάδοσης

2.2 ΠΟΙΟΤΗΤΑ – ΔΙΑΣΦΑΛΙΣΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

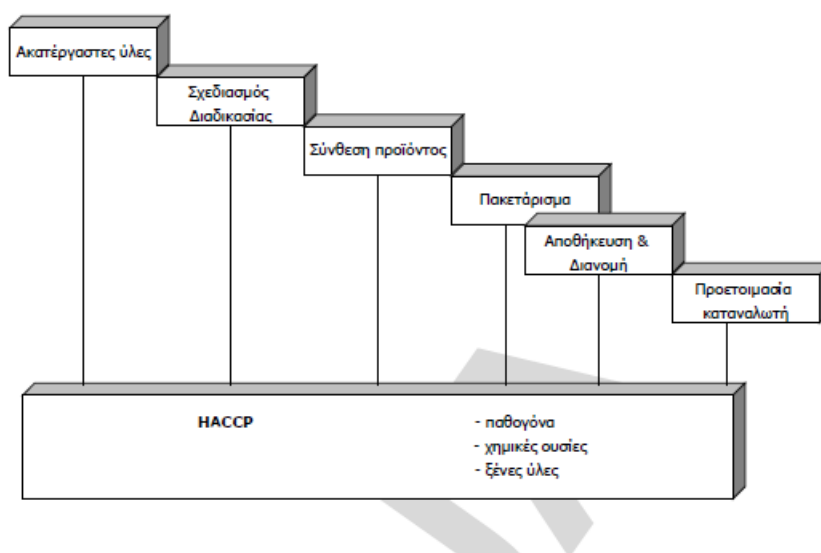
2.2.1 HACCP:ΣΥΣΤΗΜΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ

Σύμφωνα με την ανάγκη ελέγχου τροφίμων από τους αρμόδιους φορείς η νομοθεσία των τροφίμων είναι ένα θέμα με μεγάλο δημόσιο ενδιαφέρον. Σήμερα, όλες οι αναπτυγμένες χώρες έχουν διαμορφώσει ένα ουσιαστικό νομικό πλαίσιο που αποβλέπει στο να διασφαλιστεί ότι τα τρόφιμα είναι ασφαλή, υγιεινά και κατάλληλα για ανθρώπινη κατανάλωση, ότι οι εμπορικές συναλλαγές διεξάγονται με θεμιτό τρόπο και ότι υπάρχουν τα αναγκαία συστήματα επίσημου ελέγχου και επιθεώρησης. Στις μέρες μας, προκειμένου να διασφαλιστεί η ασφάλεια των τροφίμων και κατ' επέκταση η υγεία των καταναλωτών, η Ευρωπαϊκή και η Ελληνική νομοθεσία καθιστούν υποχρεωτική για όλες τις βιομηχανίες που εμπλέκονται στην αλυσίδα παραγωγής τροφίμων, την εφαρμογή του Συστήματος Ανάλυσης Κινδύνων και Κρίσιμων Σημείων Ελέγχου (Hazard Analysis and Critical Control Point - **σύστημα HACCP**).

Το σύστημα HACCP αποτελεί μια επιστημονική και συστηματική προσέγγιση για την αναγνώριση, εκτίμηση και έλεγχο των κινδύνων που σχετίζονται με όλα τα στάδια

παραγωγής ενός τροφίμου, από την ανάπτυξη και τη συγκομιδή των πρώτων υλών μέχρι τη διανομή και τελική κατανάλωση του προϊόντος (from farm to table)(Εικόνα 2.2.1). Χαρακτηρίζεται ως ένα προληπτικό σύστημα διασφάλισης της υγιεινής στα τρόφιμα, το οποίο προλαμβάνει και ελέγχει τους κινδύνους (βιολογικούς, φυσικούς, χημικούς) αναγνωρίζοντας τα Κρίσιμα Σημεία Ελέγχου(Εφαρμογή και έλεγχος του συστήματος HACCP, Αμβροσιάδης Ι.) (HACCP ΑΠΟ ΤΟ Η ΕΩΣ ΤΟ Ρ, Ζαμπετάκης Γ., Γδοντέλης Ν.).

Το εν λόγω σύστημα παίζει ενεργό ρόλο στη βιομηχανία τροφίμων όσον αφορά τον αδιάλειπτο έλεγχο και την επίλυση των εκάστοτε προβλημάτων. Παρ' όλα αυτά εμφανίζει τόσο πλεονεκτήματα όσο και μειονεκτήματα. Αρχικά εξασφαλίζεται η σωστή διαχείριση της ασφάλειας τροφίμων, η οποία πλέον αποκτά τη δέουσα βαρύτητα και προλαμβάνονται έτσι τα όποια προβλήματα. Ως εκ τούτου ο καταναλωτής επιδεικνύει μεγαλύτερη πια εμπιστοσύνη στα προϊόντα που καλείται να αγοράσει. Από την άλλη πλευρά τα μειονεκτήματα εστιάζονται κυρίως στην οικονομική διαχείριση, στην ατομική συμπεριφορά, τον εφησυχασμό και την επιμέρους λάθος διαχείριση των όσων πρεσβεύει.



ΕΙΚΟΝΑ 2.2.1,Ο σχεδιασμός του συστήματος HACCP σε σχέση με όλα τα στάδια του τροφίμου (Forsythe S.J. and Hayes P.R. "Food Hygiene, Microbiology and HACCP"- An Aspen Publication (3rd edition).

Το σύστημα HACCP βοηθά μέσω της εκπαίδευσης του προσωπικού με σκοπό την εφαρμογή των κατάλληλων χειρισμών και επεξεργασιών των τροφίμων και κατ' επέκταση την κατανομή αυτού σε ανάλογες θέσεις εργασίας. Πέραν τούτου όμως, διαθέτει μία ειδική ορολογία για τον σαφή ορισμό των όσων το αφορούν. Μερικοί από τους πιο σημαντικούς όρους παρατίθενται παρακάτω (Ανάλυση Επικινδυνότητας στα κρίσιμα σημεία ελέγχου (HACCP) στη βιομηχανία τροφίμων, Τζιά, Κ. και Τσιαπούρης, Α.) :

- ❖ **Hazard:** φυσική, χημική ή βιολογική ιδιότητα που μπορεί να καταστήσει το τρόφιμο μη ασφαλές για κατανάλωση.
- ❖ **Hazard Analysis:** η διαδικασία συλλογής και εκτίμησης πληροφοριών σχετικά με τους κινδύνους των τροφίμων και η επιλογή των πιο σημαντικών για ενσωμάτωση στο σχέδιο HACCP.
- ❖ **Control:** η διαχείριση των συνθηκών μιας διεργασίας με σκοπό τη συμμόρφωσή της σε καθορισμένα κριτήρια.
- ❖ **Control/Preventive Measure:** ενέργεια που πραγματοποιείται με σκοπό την πρόληψη, την εξάλειψη ή την μείωση του κινδύνου.
- ❖ **Control Point-CP:** στάδιο ή σημείο της παραγωγής στο οποίο μπορεί να γίνει έλεγχος φυσικού, χημικού ή βιολογικού κινδύνου.
- ❖ **Critical Control Point-CCP:** στάδιο ή σημείο της παραγωγής το οποίο μπορεί να ελεγχθεί και ο έλεγχος είναι απαραίτητος για την πρόληψη, την εξάλειψη ή την μείωση του κινδύνου.

2.2.2 ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΕΞΕΛΙΞΗ ΚΑΙ ΘΕΣΜΙΚΟ ΠΛΑΙΣΙΟ

Το σύστημα HACCP αναπτύχθηκε από την αμερικανική εταιρία τροφίμων Pillsbury σε συνεργασία με την NASA με στόχο τη μέγιστη δυνατή διασφάλιση της μικροβιολογικής ασφάλειας των τροφίμων των πρώτων επανδρωμένων διαστημικών πτήσεων. Βασίστηκε στις αρχές του συστήματος FMEA (Failure, Mode and Effect Analysis) που μελετά σε κάθε στάδιο μιας διεργασίας τι μπορεί να πάει στραβά, τις πιθανές αιτίες και το αναμενόμενο αποτέλεσμα, με σκοπό να εγκαταστήσει αποτελεσματικούς μηχανισμούς ελέγχου. Το HACCP χρησιμοποιεί την ίδια προσέγγιση αλλά με έμφαση στην ασφάλεια του προϊόντος. Πρωτοπαρουσιάστηκε επίσημα το 1971 στο Εθνικό Συνέδριο για την Ασφάλεια Τροφίμων των ΗΠΑ και από τότε οι αρχές και η αναγκαιότητα του συστήματος συνειδητοποιήθηκαν σταδιακά από τη βιομηχανία τροφίμων.

Από τα τέλη της δεκαετίας του 1980, περίοδο που συμπίπτει με την επικράτηση της φιλοσοφίας των συστημάτων ποιότητας που δίνουν έμφαση στην πρόληψη έναντι του ελέγχου του τελικού προϊόντος, η αναγνώριση αυτού του συστήματος, ως την πλέον αποτελεσματική προσέγγιση για τη διασφάλιση της ασφάλειας, αποκτά νέα δυναμική. Σήμερα το HACCP αποτελεί για την ασφάλεια των τροφίμων το διεθνές σύστημα αναφοράς. Με βάση την εμπειρία της εφαρμογής, όσον αφορά την μεθοδολογία εγκατάστασης του συστήματος και την αποτελεσματικότητά του, οι αρχές του HACCP κωδικοποιήθηκαν και αναπτύσσονται λεπτομερώς σε δύο δημοσιεύσεις που αποτελούν διεθνώς το σημείο αναφοράς. Η πρώτη από την Εθνική Επιτροπή για τα Μικροβιολογικά Κριτήρια στα Τρόφιμα των ΗΠΑ (National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods - NACMCF, 1992) και η δεύτερη από την Επιτροπή για την Υγιεινή Τροφίμων του Codex Alimentarius (Codex Alimentarius Committee on Food Hygiene, 1993).

Το σύστημα HACCP, όπως περιγράφεται παρακάτω, βασίζεται σε επτά Αρχές, που συνοψίζουν τον τρόπο εγκατάστασης, εφαρμογής και συντήρησής του στην υπό μελέτη μονάδα. Επιπροσθέτως, είναι συμβατό με τη σύγχρονη φιλοσοφία πρόληψης και διασφάλισης της ποιότητας μέσω κατάλληλων διαδικασιών και όχι με έλεγχο του τελικού προϊόντος. Αναφέρεται όχι μόνο στους μικροβιολογικούς, αλλά και στους φυσικούς και χημικούς κινδύνους, που πιθανόν να υπεισέλθουν στη διαδικασία παραγωγής του τροφίμου (Food hygiene, microbiology and HACCP, S.J. Forsythe and P.R. Hayes).

Όσον αφορά τη νομοθεσία των τροφίμων, την τελευταία δεκαετία εκδίδεται από την Ευρωπαϊκή Ένωση μια δέσμη κανονισμών και οδηγιών, υποχρεωτικών για τις βιομηχανίες παραγωγής, επεξεργασίας και διακίνησης τροφίμων των κρατών μελών. Η νέα ευρωπαϊκή νομοθεσία περιλαμβάνει τους εξής κανονισμούς (HACCP ΑΠΟ ΤΟ Η ΕΩΣ ΤΟ Ρ, Ζαμπετάκης Γ., Γδοντέλης Ν.) (Στοιχεία δικαίου-Δημόσιας υγιεινής, Δημητροπούλου-Θεοδώρου Ε) :

- 178/2002/ΕΚ, «για τον καθορισμό των γενικών αρχών και απαιτήσεων της νομοθεσίας για τα τρόφιμα, για την ίδρυση της Ευρωπαϊκής Αρχής για την Ασφάλεια των Τροφίμων (EFSA) και τον καθορισμό των διαδικασιών σε θέματα ασφάλειας των τροφίμων».
- 852/2004/ΕΚ «για την Υγιεινή των Τροφίμων», με τον οποίο καθιερώνεται ως υποχρεωτική η κατάρτιση και εφαρμογή προγραμμάτων και διαδικασιών ασφάλειας των τροφίμων βάσει των αρχών του συστήματος HACCP. Αυτός ο Κανονισμός είναι νόμος του Ελληνικού Κράτους από 1/01/2006 και μαζί με τον Κανονισμό 178/2002/ΕΚ είναι δύο κανονισμοί που περιγράφουν τις νομικές υποχρεώσεις των επιχειρήσεων ως προς την ασφάλεια και την υγιεινή των τροφίμων.
- 853/2004/ΕΚ «για τον καθορισμό ειδικών κανόνων υγιεινής για τα τρόφιμα ζωικής προέλευσης», ο οποίος περιλαμβάνει ειδικούς κανόνες υγιεινής για τρόφιμα ζωικής προέλευσης που πρέπει να τηρούνται σε συνδυασμό με όσα προβλέπονται στον Κανονισμό 852/2004/ΕΚ.
- 854/2004/ΕΚ «για τον καθορισμό ειδικών διατάξεων για την οργάνωση των επίσημων ελέγχων στα προϊόντα ζωικής προέλευσης που προορίζονται για κατανάλωση από τον άνθρωπο» (του κανονισμού 853/2004/ΕΚ).
- 882/2004/ΕΚ «για τη διενέργεια επίσημων ελέγχων της συμμόρφωσης προς τη νομοθεσία περί ζωοτροφών και τροφίμων και προς τους κανόνες για την υγεία και την καλή διαβίωση των ζώων».
- 2073/2005/ΕΚ «περί μικροβιολογικών κριτηρίων για τα τρόφιμα», στον οποίο καθορίζονται για πρώτη φορά τα μικροβιολογικά όρια για συγκεκριμένα τρόφιμα και δίνονται σαφείς οδηγίες για την εφαρμογή πλάνου δειγματοληψίας καθώς και για την αναλυτική μέθοδο αναφοράς για κάθε μικροοργανισμό. Επίσης, προτείνονται μέτρα σε περίπτωση μη αποτελεσματικών αποτελεσμάτων.

- 2074/2005/EK για θέσπιση μέτρων εφαρμογής για ορισμένα προϊόντα βάσει του Κανονισμού 853/2004/EK και για την οργάνωση επίσημων ελέγχων βάσει των Κανονισμών 854/2004/EK και 882/2004/EK, για την παρέκκλιση από τον Κανονισμό 852/2004/EK και για τροποποίηση των Κανονισμών 853/2004/EK και 854/2004/EK.
- 2075/2005/EK για τη θέσπιση ειδικών κανόνων σχετικά με τους επίσημους ελέγχους για ανίχνευση *Trichinella* στο κρέας.
- 2076/2005/EK για τη θέσπιση μεταβατικών διατάξεων σχετικά με την εφαρμογή των Κανονισμών 853/2004/EK, 854/2004/EK και 882/2004/EK και για την τροποποίηση των Κανονισμών 853/2004/EK και 854/2004/EK.
- 1662/2006/EK για την τροποποίηση του Κανονισμού 853/2004/EK για τον καθορισμό ειδικών κανόνων υγιεινής για τα τρόφιμα ζωικής προέλευσης.
- 1663/2006/EK για την τροποποίηση του Κανονισμού 854/2004/EK για τον καθορισμό ειδικών διατάξεων για την οργάνωση των επίσημων ελέγχων στα προϊόντα ζωικής προέλευσης που προορίζονται για κατανάλωση από τον άνθρωπο.
- 1664/2006/EK για την τροποποίηση του Κανονισμού 2074/2005/EK σχετικά με μέτρα εφαρμογής για ορισμένα προϊόντα ζωικής προέλευσης που προορίζονται για κατανάλωση από τον άνθρωπο και για την κατάργηση ορισμένων μέτρων εφαρμογής.
- 1665/2006/EK για την τροποποίηση του Κανονισμού 2075/2005/EK για τη θέσπιση ειδικών κανόνων σχετικά με τους επίσημους ελέγχους για ανίχνευση *Trichinella* στο κρέας.
- 1666/2006/EK για την τροποποίηση του Κανονισμού 2076/2005/EK για τη θέσπιση μεταβατικών διατάξεων σχετικά με την εφαρμογή των Κανονισμών 853/2004/EK, 854/2004/EK και 882/2004/EK.
- 1441/2007/EK για την τροποποίηση του Κανονισμού 2073/2005/EK περί μικροβιολογικών κριτηρίων για τα τρόφιμα.

Την 1/01/2006 έγινε η επίσημη έναρξη καθολικής εφαρμογής του Κανονισμού 852/2004/EK, ενώ την 31/03/2006 άρχισε να εφαρμόζεται το νέο διεθνές πρότυπο περί Συστημάτων Διαχείρισης Υγιεινής και Ασφάλειας των Τροφίμων ISO22000. Το νέο πρότυπο αντιμετωπίζει μόνο θέματα που σχετίζονται με την ασφάλεια των τροφίμων και όχι θέματα ποιότητας, με τα οποία ασχολείται το πρότυπο ISO9001. Το ISO22000 επιτρέπει σε μια επιχείρηση να εφαρμόζει ένα συνδυασμό μέτρων ελέγχου για να αντιμετωπίσει κινδύνους που αναπτύχθηκαν τόσο εκτός αλλά και εντός αυτής. Σκοπός του νέου προτύπου είναι να εναρμονιστούν σε παγκόσμια κλίμακα οι απαιτήσεις για την εφαρμογή ενός ολοκληρωμένου Συστήματος Διαχείρισης της Ασφάλειας των Τροφίμων (ΣΔΑΤ) από όλες τις επιχειρήσεις της αλυσίδας των τροφίμων. Το πρότυπο επιβάλλει, μέσω του ΣΔΑΤ, στην επιχείρηση να εφαρμόσει όλες τις νομικές και κανονιστικές απαιτήσεις, να εφαρμόσει σύστημα HACCP και να δώσει μεγαλύτερη προστιθέμενη αξία στα προϊόντα της, αυξάνοντας την ασφάλειά τους.

2.2.3 ΑΡΧΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ ΤΟΥ HACCP

Οι βασικές αρχές του συστήματος HACCP, οι οποίες χρησιμοποιούνται για το σχεδιασμό και την υλοποίηση του εκάστοτε προγράμματος ελέγχου μιας επιχείρησης αναγράφονται παρακάτω, όπως παρουσιάζονται από την Codex Alimentarius Commission (Μάρτιος 1993) (Ανάλυση Επικινδυνότητας στα κρίσιμα σημεία ελέγχου (HACCP) στη βιομηχανία τροφίμων, Τζιά, Κ. και Τσιαπούρης, Α.) (HACCP : a practical approach, Sara Mortimore and Carol Wallace) :

Αρχή 1^η: Προσδιορισμός των πιθανών κινδύνων που σχετίζονται με την παραγωγή των τροφίμων σε όλα τα στάδια, από την ανάπτυξη και συγκομιδή των πρώτων υλών, την παραγωγική διαδικασία, την επεξεργασία και τη διανομή των προϊόντων, μέχρι την τελική επεξεργασία και την κατανάλωσή τους. Αξιολόγηση της πιθανότητας εμφάνισης και της σοβαρότητας των κινδύνων και προσδιορισμός των προληπτικών μέτρων για τον έλεγχο αυτών.

Αρχή 2^η: Προσδιορισμός των σημείων, διεργασιών ή των φάσεων λειτουργίας που μπορούν να ελεγχθούν, για να εξαφανίσουν έναν κίνδυνο ή να ελαχιστοποιήσουν την πιθανότητα εμφάνισής του (Κρίσιμο Σημείο Ελέγχου CCP) (Εικόνα 2.2.3).

Αρχή 3^η: Καθορισμός των κρίσιμων ορίων, που πρέπει να ικανοποιούνται, ώστε να εξασφαλίζεται ότι κάθε CCP βρίσκεται υπό έλεγχο. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι τα κρίσιμα όρια μπορεί να σχετίζονται με τη μέγιστη επιτρεπτή διακύμανση στις συνθήκες θερμοκρασίας/χρόνου και το ελάχιστο μέγεθος μεταλλικών τεμαχίων για την ανίχνευσή τους.

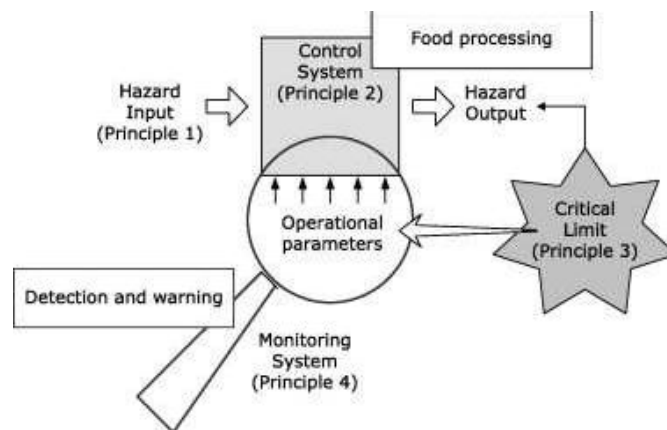
Αρχή 4^η: Δημιουργία και εγκατάσταση ενός συστήματος παρακολούθησης των CCPs και των κρίσιμων ορίων τους και εν συνεχεία καθιέρωση των διαδικασιών συλλογής και επεξεργασίας των αποτελεσμάτων της παρακολούθησης, με σκοπό τη ρύθμιση της παραγωγής και τη διατήρηση αυτής υπό έλεγχο. Η παρακολούθηση κάθε κρίσιμου σημείου ξεχωριστά μπορεί να γίνεται λόγου ανά παρτίδα προϊόντος, ανά ώρα, ή συνεχώς. Τα αποτελέσματα της παρακολούθησης πρέπει να καταγράφονται και να διατηρούνται σε αρχεία.

Αρχή 5^η: Καθορισμός των διορθωτικών ενεργειών, που πρέπει να πραγματοποιούνται, όταν το σύστημα παρακολούθησης δείχνει ότι ένα κρίσιμο σημείο ελέγχου (CCP) βρίσκεται εκτός ελέγχου, δηλαδή ότι εμφανίζεται απόκλιση από ένα καθορισμένο κρίσιμο όριο. Οι διορθωτικές ενέργειες πρέπει να προσδιορίζονται σαφώς στη μελέτη HACCP και να καθορίζονται οι υπευθυνότητες του αρμόδιου προσωπικού. Σε περίπτωση που δεν ληφθούν έγκαιρα οι απαραίτητες διορθωτικές ενέργειες, το προϊόν πρέπει να καταστραφεί.

Αρχή 6^η: Σχεδιασμός και εγκατάσταση ενός αποτελεσματικού συστήματος τεκμηρίωσης και αρχειοθέτησης του σχεδίου HACCP. Η διατήρηση αρχείων από την

εταιρεία είναι απαραίτητη, προκειμένου να διευκολύνεται η διαδικασία ανίχνευσης και ανάκλησης ενός προϊόντος, όταν αυτό κριθεί απαραίτητο για την προστασία της δημόσιας υγείας. Ακόμη, η σωστή αρχειοθέτηση διευκολύνει τη διεξαγωγή επιθεωρήσεων από τις Κρατικές Υπηρεσίες.

Αρχή 7^η: Προσδιορισμός των διαδικασιών επαλήθευσης, που επιβεβαιώνουν ότι το σύστημα HACCP λειτουργεί σωστά και αποτελεσματικά. Οι διαδικασίες επαλήθευσης διεξάγονται είτε εσωτερικά από την επιχείρηση, είτε και από τρίτους αρμόδιους φορείς και περιλαμβάνουν έλεγχο αρχείων, αλλά και επιτόπιο εργαστηριακό έλεγχο.



ΕΙΚΟΝΑ 2.2.3, Στοιχεία ενός συστήματος ελέγχου (Domenech et al. 2008).

2.2.4 ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ HACCP ΣΤΗ ΜΑΖΙΚΗ ΕΣΤΙΑΣΗ

Η εφαρμογή του συστήματος H.A.C.C.P. στη βιομηχανία παροχής τροφίμων (food service industry) είναι αναγκαία, καθώς ένα μεγάλο μέρος των επιδημιών των τροφικών δηλητηριάσεων προέρχεται από τις επιχειρήσεις που ανήκουν σε αυτή. Οι χώροι μαζικής εστίασης χαρακτηρίζονται ως χώροι υψηλής επικινδυνότητας, καθώς συνδέονται περισσότερο με επιδημίες τροφικών δηλητηριάσεων. Το γεγονός αυτό είναι απόρροια της μεγάλης προσέλευσης ατόμων όλων των ομάδων μιας κοινωνίας με αποτέλεσμα την εξάπλωση της οποίας τροφικής δηλητηρίασης από ένα τυχόν μολυσμένο τρόφιμο. Στις ευπαθείς ομάδες ανήκουν οι ηλικιωμένοι, τα παιδιά και οι ασθενείς, ενώ όλοι τους θα πρέπει να καταναλώνουν πλήρως ασφαλή τρόφιμα (Guzewich, 1986).

Εντούτοις, το σύστημα αυτό ελέγχου δεν έχει ακόμη βρει πλήρη εφαρμογή στις μικρές επιχειρήσεις, σε αντίθεση με τις βιομηχανίες παραγωγής τροφίμων. Απόδειξη αποτελεί η λειτουργία επιχειρήσεων τροφοδοσίας, όπου την ίδια χρονική μπορούν να προετοιμαστεί μια μεγάλη ποικιλία τροφίμων και συνήθως δεν υπάρχουν ομοιόμορφα πρότυπα διαδικασιών για τις διεργασίες. Υποστηρίζεται ότι συχνά εμφανίζεται ένα ευρύ φάσμα αλλαγών και βελτιώσεων στον τομέα της τροφοδοσίας και ότι οι διαδικασίες βασίζονται όχι μόνο στην επιθυμία να ικανοποιηθούν οι απαιτήσεις του πελάτη, αλλά και

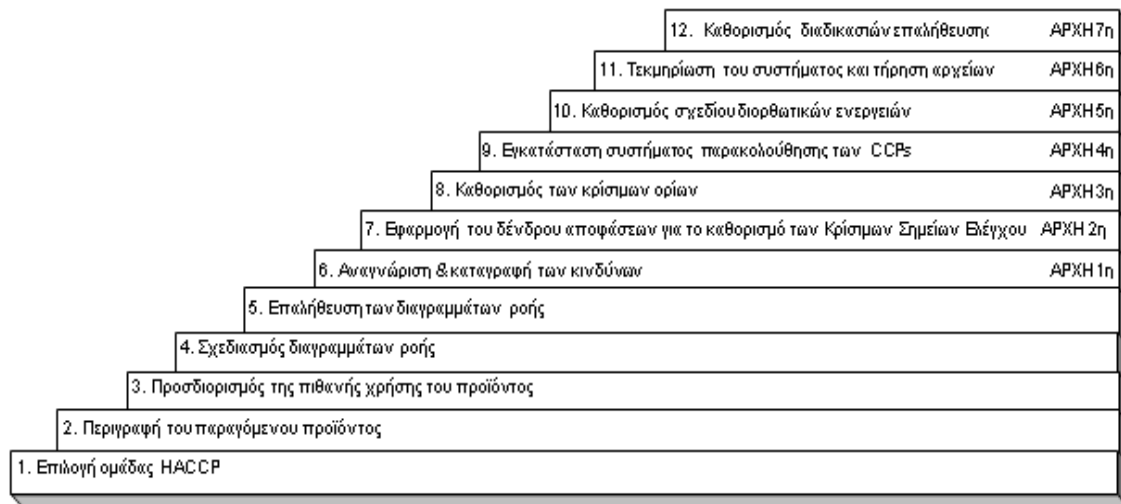
στις συνθήκες που επικρατούν εκεί και στις ικανότητες του προσωπικού που εργάζεται τη συγκεκριμένη στιγμή κατά την παρασκευή των τροφίμων (Ehiri, 1995).

Η εφαρμογή του συστήματος HACCP απαιτεί την υλοποίηση **δώδεκα βημάτων**, όπως αυτά προτείνονται από την επιτροπή Codex Alimentarius Commission (1993) (Ασφάλεια τροφίμων: εφαρμογή της ανάλυσης επικινδυνότητας και κρίσιμων σημείων ελέγχου (HACCP) στις βιομηχανίες τροφίμων και ποτών, Αρβανιτογιάννης Ι., Σάνδρου Δ., Κούρτης Λ.) (Εικόνα 2.2.4):

1. **Επιλογή ομάδας HACCP**, αποτελούμενη από ειδικούς σε εμπειρίες και γνώσεις περί του αντικειμένου.
2. **Περιγραφή** του παραγόμενου προϊόντος, με την πλήρη καταγραφή όσων αφορούν τα γενικά χαρακτηριστικά, τις ιδιότητές του, τον τρόπο επεξεργασίας, συσκευασίας και διάθεσης του προϊόντος.
3. **Προσδιορισμός της πιθανής χρήσης** του προϊόντος από τους τελικούς καταναλωτές.
4. Σχεδιασμός **διαγραμμάτων ροής**, όπου καταγράφονται όλες οι σχετικές διαδικασίες όπως η παραλαβή, η αποθήκευση τελικού προϊόντος, η διακίνηση, ο καθαρισμός και η απολύμανση, όλων επομένως των διαδικασιών που υφίσταται το εκάστοτε προϊόν. Με την χρήση των διαγραμμάτων ροής είναι δυνατοί ο σχεδιασμός και η ανάπτυξη του συστήματος HACCP με απώτερο σκοπό την μελλοντική του χρήση και τον έλεγχο από αρμόδιους φορείς.
5. Επιθεώρηση για την επιβεβαίωση **της τήρησης** των διαγραμμάτων ροής.
6. Βάση της Αρχής 1, όπου γίνεται **αναγνώριση και καταγραφή των κινδύνων** κάθε βήματος, η ομάδα του συστήματος αναλύει τους κινδύνους και **προσδιορίζει** τα σημεία εμφάνισής τους και συνάμα προτείνει μέτρα για την αποφυγή ή δυνατόν τον περιορισμό αυτών των κινδύνων εντός των νομοθετικών ορίων.
7. **Υλοποίηση του δένδρου αποφάσεων** για το καθορισμό των Κρίσιμων Σημείων Ελέγχου (CCPs) όπως ορίζεται από την Αρχή 2. Ο διαχωρισμός των Κρίσιμων Σημείων σύμφωνα με την ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods) είναι ο εξής: ως CCP1 αναφέρονται τα Κρίσιμα Σημεία στα οποία γίνεται έλεγχος με σκοπό την εξάλειψη του κινδύνου και ως CCP2 αναφέρονται τα Κρίσιμα Σημεία στα οποία γίνεται έλεγχος με σκοπό τη μείωση του κινδύνου εντός των επιτρεπτών ορίων.
8. **Καθορισμός των κρίσιμων ορίων** όπως υποδεικνύει η Αρχή 3, γεγονός που προϋποθέτει την άρτια εκπαίδευση των μελών της ομάδας με σκοπό τη γνώση της ύπαρξης όποιου κινδύνου στο εκάστοτε σημείο σε συνδυασμό με την πλήρη κατανόηση των παραγόντων που επηρεάζουν την πρόληψή του, ώστε να οριστούν τα κρίσιμα όρια. Αυτά μπορεί να είναι μικροβιολογικά, χημικά ή φυσικά, ανάλογα

με τον τύπο κινδύνου που το CCP έχει σχεδιαστεί να ελέγχει. Ειδικότερα ο μεγάλος χρόνος έκδοσης μικροβιολογικών αποτελεσμάτων καθιστά αδύνατον να έχουμε τα μικροβιολογικά όρια ως κρίσιμα όρια στην παρακολούθηση των CCPs. Αντίθετα όμως, σε περίπτωση προϊόντος μακράς διάρκειας σε σχέση με το χρόνο εξέτασής του όπως συμβαίνει με τα κονσερβοποιημένα τρόφιμα, αυτό καθίσταται δυνατόν. Τα χημικά όρια αφορούν τα αποδεκτά όρια μυκοτοξινών, pH και αλατιού και από την άλλη, τα φυσικά όρια είναι αυτά που σχετίζονται με την θερμοκρασία, τον χρόνο, την απουσία μετάλλων και άλλων παραγόντων.

9. **Εγκατάσταση συστήματος παρακολούθησης των CCPs** όπως ορίζεται από την Αρχή 4. Στο στάδιο αυτό απαιτείται ο εντοπισμός των πιθανών σφαλμάτων μέσω του ελέγχου και της παρατήρησης των επιλεγμένων κρίσιμων σημείων. Η ομάδα επομένως οφείλει να ορίσει έναν υπεύθυνο επί της παρακολούθησης με γνώσεις επί του θέματος έτσι ώστε να είναι σε θέση να λάβει διορθωτικά μέτρα σε περίπτωση αποκλίσεων. Οι δύο βασικοί τύποι μηχανισμών παρακολούθησης είναι οι εξής: **τα On-line συστήματα**, με χαρακτηριστικό παράδειγμα τον έλεγχο χρόνου-θερμοκρασίας και **τα Off-line συστήματα**, όπως ο έλεγχος της συγκέντρωσης αλατιού. Σε αυτό το σημείο αξίζει να αναφερθεί η πλεονεξία του On-line συστήματος σε σχέση με τον τύπο Off-line, χάρη στην μείωση του χρόνου ελέγχου και στην άμεση λήψη μέτρων σε περίπτωση αποκλίσεων. Στο σύστημα Off-line, ωστόσο, πρέπει να λαμβάνεται δείγμα από την γραμμή παραγωγής ανά τακτά χρονικά διαστήματα, με αποτέλεσμα την αύξηση του χρόνου ελέγχου, αλλά και τη συχνότητα αυτού. Τέλος, ο τρόπος παρακολούθησης πρέπει να είναι ιδιαιτέρως περιγραφικός και τα εμπλεκόμενα άτομα να είναι πλήρως και καταλλήλως εκπαιδευμένα.
10. **Καθορισμός σχεδίου διορθωτικών ενεργειών** όπως ορίζεται από την Αρχή 5. Η ομάδα HACCP πραγματοποιεί και καταγράφει τις διαδικασίες διορθωτικών ενεργειών, οι οποίες είναι απαραίτητες σε περιπτώσεις αποκλίσεων από τα κρίσιμα όρια. Οι διορθωτικές ενέργειες διακρίνονται σε δύο επίπεδα: Το πρώτο επίπεδο αφορά την εφαρμογή διορθωτικής ενέργειας με σκοπό την πρόληψη μιας ενδεχόμενης απόκλισης και το δεύτερο αφορά την εφαρμογή διορθωτικής ενέργειας για τη διόρθωση της απόκλισης.
11. **Τεκμηρίωση του συστήματος και τήρηση αρχείων** σύμφωνα με την Αρχή 6. Απαιτείται αυστηρή τήρηση των αρχείων με σκοπό την τεκμηρίωση της αποτελεσματικότητας του συστήματος, σε περίπτωση που μια εταιρία κλιθεί να αποδείξει ότι ουδεμία ευθύνη φέρει για τυχόν βλάβη σε ένα ελαττωματικό προϊόν.
12. **Καθορισμός διαδικασιών επαλήθευσης** σύμφωνα με την Αρχή 7. Σε αυτό το στάδιο εγκαθίσταται ένα σύστημα που σκοπό έχει την **επαλήθευση της αποτελεσματικότητας** του ήδη υπάρχοντος συστήματος.



ΕΙΚΟΝΑ 2.2.4, Στην εικόνα αναγράφονται σχηματικά τα δώδεκα βήματα εφαρμογής του συστήματος (Codex Committee on Food Hygiene (1993)).

Αξίζει να τονιστεί, ότι ο κύριος σκοπός της εφαρμογής του συστήματος σε χώρους μαζικής εστίασης είναι η καθιέρωση μέτρων ,σύμφωνα με τη σχετιζόμενη νομοθεσία, ικανών για τη διασφάλιση της ασφάλειας των επεξεργασμένων τροφίμων. Η ασφάλεια αυτή μπορεί να επιτευχθεί με την εφαρμογή των αρχών του εν λόγω συστήματος, καθώς επίσης και των προαπαιτούμενων προγραμμάτων σε συνδυασμό πάντοτε με την κατάλληλη εκπαίδευση του προσωπικού.

Η επιτυχία, ωστόσο, της εφαρμογής του συστήματος εξαρτάται από την ίδια την επιχείρηση, καθώς ο σχεδιασμός του βασίζεται στις ανάγκες της εκάστοτε επιχείρησης. Οι κουζίνες των εστιατορίων και γενικότερα οι επιχειρήσεις μαζικής εστίασης εμφανίζουν βασικές διαφορές έναντι των εργοστασίων παραγωγής τροφίμων:

- Αλλαγή προσωπικού ανά τακτά χρονικά διαστήματα
- Περιθώρια εξαγωγής υψηλού κέρδους
- Συχνή αλλαγή των προμηθευτών, πρώτων υλών, προδιαγραφών και μενού. Ακόμη, υπάρχει μεγάλη ποικιλία προϊόντων, συστατικών και μεθόδων επεξεργασίας που μπορούν να χρησιμοποιηθούν. Στον παρακάτω πίνακα αναγράφονται οι αρχές του HACCP αναπροσαρμοσμένες στις επιχειρήσεις μαζικής εστίασης (“Ανάλυση Επικινδυνότητας στα Κρίσιμα Σημεία Ελέγχου (HACCP) σε Χώρους Μαζικής Εστίασης”, Τζιά Κωνσταντίνα και Παππά Φλωρεντία) (Η ασφάλεια τροφίμων στη μαζική εστίαση: προβλήματα και προοπτικές, Μπόσκου Γ.) :

ΑΡΧΕΣ ΤΟΥ HACCP	ΠΡΟΣΑΡΜΟΓΗ ΣΤΙΣ ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΕΙΣ ΜΑΖΙΚΗΣ ΕΣΤΙΑΣΗΣ
1. Ανάλυση Επικινδυνότητας	Ανάλυση και ταξινόμηση ανά διεργασία Μέθοδος «Προσέγγιση Διεργασίας» (Process Approach)
2. Καθορισμός Κρίσιμων Σημείων Ελέγχου	Καμία διαφοροποίηση
3. Καθιέρωση Κρίσιμων	Συμμόρφωση με τις απαιτήσεις της νομοθεσίας
4. Παρακολούθηση	Απλούστευση των διαδικασιών παρακολούθησης με έλεγχο των τυποποιημένων διεργασιών (διασφάλιση της ασφάλειας των τροφίμων, έγκαιρη ανίχνευση προβλημάτων & περιορισμός της συχνότητας των προβλεπόμενων ελέγχων)
5. Διορθωτικές Ενέργειες	Καμία διαφοροποίηση
6. Επαλήθευση	Καμία διαφοροποίηση
7. Τήρηση Αρχείων	Απλούστευση της διαδικασίας χρησιμοποιώντας τα αρχεία που ήδη τηρούνται από την επιχείρηση (τιμολόγια, προγράμματα εργασίας, συνταγές)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

3.1 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ, ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ

ΤΡΟΦΟΓΕΝΩΝ ΠΑΘΟΓΟΝΩΝ

Η ανίχνευση και η απαρίθμηση των παθογόνων στα τρόφιμα και στις επιφάνειες που έρχονται σε επαφή με αυτά είναι ο βασικότερος στόχος κάθε ολοκληρωμένου προγράμματος διασφάλισης της ποιότητας των τροφίμων. Τόσο οι κυβερνητικές αρχές όσο και οι επιχειρήσεις τροφίμων προβαίνουν σε μικροβιολογικές αναλύσεις με σκοπό την πρόβλεψη και ανάλυση των εκάστοτε αναδυόμενων κινδύνων. Η μικροβιολογική ανάλυση αποτελεί το απαραίτητο μέσο για τον καθορισμό των ορίων των παθογόνων μικροοργανισμών για κάθε είδος τροφίμων, καθώς επίσης και για την αξιολόγηση των διαφορετικών στρατηγικών διαχείρισης με βάση την Ανάλυση Επικινδυνότητας και τα Κρίσιμα Σημεία Ελέγχου (HACCP). Η εφαρμογή προληπτικών συστημάτων, όπως το HACCP έχει βελτιώσει σημαντικά την ασφάλεια των τροφίμων, αλλά δεν δύναται να είναι πλήρως αποτελεσματικό έως ότου αναπτυχθούν και άλλες μέθοδοι, οι οποίες θα συμπεριλάβουν το σύστημα HACCP (Stannard C, 1997) (Foodborne pathogens: hazards, risk analysis and control, Betts R, Blackburn CW).

Η μικροβιολογική ανάλυση των τροφίμων βασίζεται στην ανίχνευση των μικροοργανισμών με οπτικά, βιοχημικά, ανοσολογικά ή γενετικά μέσα, είτε προ εμπλουτισμού (ποσοτικές ή enumerative μέθοδοι) ή μετά από τον εμπλουτισμό (ποιοτικές μέθοδοι, επίσης γνωστή ως τεστ παρουσίας / απουσίας).

Οι παραδοσιακές μέθοδοι καλλιέργειας για την ανίχνευση μικροοργανισμών σε τρόφιμα βασίζονται στην ενσωμάτωση του δείγματος τροφής σε ένα θρεπτικό μέσο στο οποίο οι μικροοργανισμοί μπορούν να πολλαπλασιαστούν, παρέχοντας έτσι την οπτική επιβεβαίωση της ανάπτυξής τους. Αυτές οι συμβατικές μέθοδοι δοκιμών είναι απλές, εύκολα προσαρμόσιμες, πολύ πρακτικές και γενικά ανέξοδες. Αν και δεν στερούνται ευαισθησίας, εντούτοις εξαρτώνται από την ανάπτυξη των μικροοργανισμών στα διάφορα μέσα καλλιέργειας με αποτέλεσμα να απαιτείται διάστημα αρκετών ημερών για την εξαγωγή αποτελεσμάτων. Από τα προϊόντα που υποβάλλονται σε ανάλογη επεξεργασία ελάχιστα έχουν εγγενώς μικρή διάρκεια ζωής, η οποία εμποδίζει τη χρήση πολλών από αυτές τις συμβατικές μεθόδους. Ως εκ τούτου, εκτενής έρευνα διεξάγεται τα τελευταία χρόνια έτσι ώστε να μπορέσει να μειωθεί ο χρόνος δοκιμασίας και να τυποποιηθεί η ανάλυση με την χρήση εναλλακτικών μεθόδων ανίχνευσης μικροοργανισμών, όποτε αυτό είναι δυνατό (Bhunia AK, 2008) (Jantzen MM et al, 2006a)

Παρά τη σπουδαιότητά της, η μικροβιολογική ανάλυση των τροφίμων φθάνει έως ένα σημείο (Rapid methods for the detection of foodborne pathogens: current and next-generation technologies, Feng P (2007). Αναμφισβήτητα τα αποτελέσματά της θα πρέπει να λαμβάνονται σοβαρά υπ' όψιν κατά τον καθορισμό μικροβιολογικών κριτηρίων, συμπεριλαμβανομένων των αποκλίσεων που σχετίζονται με το σχέδιο δειγματοληψίας, της μεθόδου ανάλυσης και της απόδοσης των εργαστηρίων. Συμπερασματικά, η

μικροβιολογική ανάλυση των τροφίμων εξακολουθεί να αποτελεί πρόκληση για όλες σχεδόν τις δοκιμασίες και τις τεχνολογίες, ειδικότερα για συγκεκριμένα παθογόνα είδη. Τυχόν προβλήματα εντούτοις μπορεί να οφείλονται σε (Wu VCH, 2008) :

- Πολυπλοκότητα των μητρών τροφίμων και σύνθεση
- Ετερογενή κατανομή των χαμηλών επιπέδων των παθογόνων παραγόντων
- Άγχος των μικροοργανισμών κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας των τροφίμων
- Παρουσία των βακτηρίων ως φυσιολογική χλωρίδα, ειδικά σε ωμά τρόφιμα

Η πολυπλοκότητα των μητρών τροφίμων παραμένει το μεγαλύτερο εμπόδιο για την ανάπτυξη αποτελεσματικών δειγματοληψιών και ταχείων μεθόδων δοκιμής. Τα μακράς διάρκειας εμπλουτιστικά χρησιμοποιούνται συχνά λόγω του μικρού αριθμού των παθογόνων μικροοργανισμών που τείνουν να είναι παρόντες σε δείγματα τροφίμων. Ωστόσο, αν και τα εμπλουτιστικά περιορίζουν την ταχύτητα ανάλυσης και δυσχεραίνουν την ποσοτικοποίηση του αρχικού μολυσματικού δείγματος, εν τούτοις παρέχουν σημαντικά οφέλη, όπως την αραιώση και τη μείωση της δράσης των αναστολέων, επιτρέποντας τη διαφοροποίηση των βιώσιμων από μη βιώσιμων κυττάρων και την αναδόμηση των κυττάρων που έχουν υποστεί στρες ή τυχόν τραυματισμό κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας των τροφίμων. Ως εκ τούτου, θα ήταν δύσκολο να εξαλειφθεί εντελώς η χρήση τους κατά τη διαδικασία ανίχνευσης παθογόνων μικροοργανισμών σε τρόφιμα (Jasson V et al, 2010) (Jantzen MM et al, 2006b).

3.2 ΣΥΜΒΑΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΛΑΣΣΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

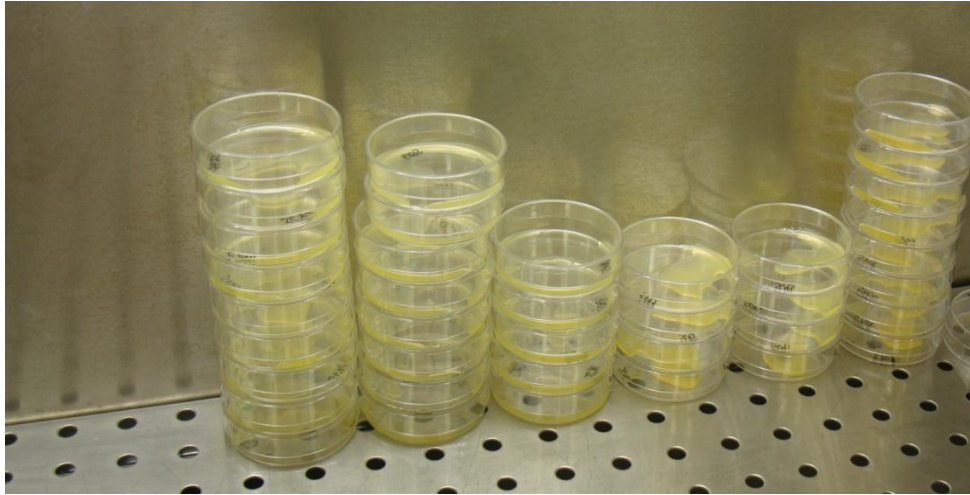
Κατ' αρχήν σημαντικό κριτήριο για την εφαρμογή των συμβατικών μεθόδων κλασσικής μικροβιολογίας είναι ο διαχωρισμός και η συγκέντρωση των μικροοργανισμών που υπάρχουν στα τρόφιμα. Το πρόβλημα μικρού αριθμού κυττάρων που πιθανώς να υπάρχουν στο δείγμα επιλύεται με τον διαχωρισμό και τη συμπύκνωση μικροοργανισμών με απώτερο σκοπό τη διάκριση των παθογόνων από των μη παθογόνων κυττάρων σε μία κατάλληλη συγκέντρωση για το επίπεδο ευαισθησίας της μεθόδου ανίχνευσης (Jasson V et. al, 2010). Τα υλικά που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μήτρα τροφίμων είναι δυνατόν να επιφέρουν ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα. Λόγω αυτού έχουν αναπτυχθεί αρκετές τεχνικές, όπως αυτή των αντισωμάτων, φυσικές αλλά και χημικές, για το διαχωρισμό και τη συγκέντρωση των παθογόνων από διάφορες μήτρες δείγματος. Στην περίπτωση των ποτών και υγρών τροφίμων, η συγκέντρωση μπορεί να επιτευχθεί εύκολα με διήθηση ή υπερδιήθηση. Ωστόσο, αυτές οι τεχνικές δεν επιτρέπουν την επιλεκτική απομόνωση των οργανισμών από ένα μικτό πληθυσμό (Stevens KA, et al, 2004).

Ως τυποποιημένες μέθοδοι (μέθοδοι ISO) θεωρούνται οι αναλυτικές μέθοδοι αναφοράς των επίσημων ελέγχων. Στις περισσότερες περιπτώσεις, πρόκειται για παραδοσιακές μεθόδους καλλιέργειας που χρησιμοποιούν εκλεκτικά υγρά ή στερεά υλικά καλλιέργειας, για να αναπτυχθεί και να απομονωθεί ο μικροοργανισμός στόχος, ενώ

ταυτόχρονα εμποδίζεται η ανάπτυξη άλλων μικροοργανισμών ,πέραν των επιθυμητών, που περιέχονται στα τρόφιμα.

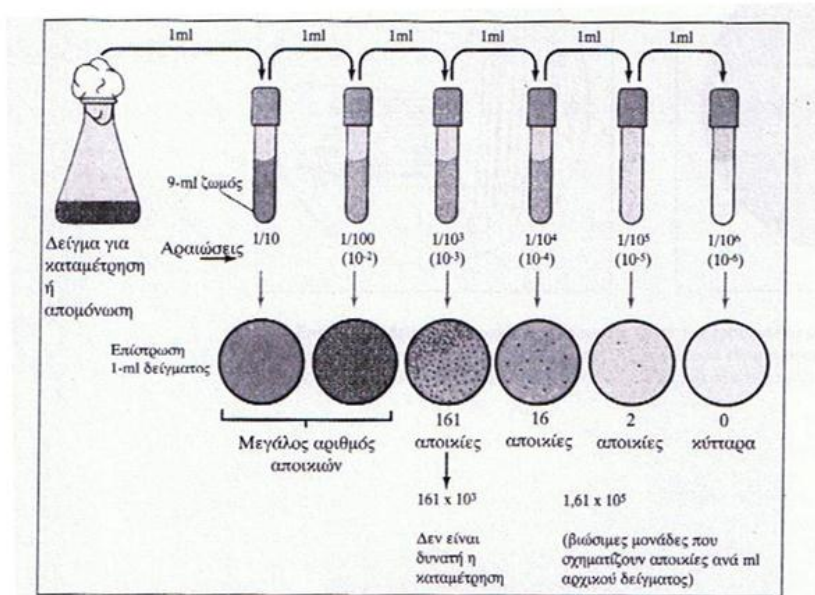
Μέθοδοι που χρησιμοποιούνται στα πλαίσια του μικροβιολογικού ελέγχου :

- ❖ **Μέθοδος ηθμομεμβράνης (διήθηση):** με τη τεχνική αυτή γίνεται ποσοτική εκτίμηση του βακτηριακού πληθυσμού, χρησιμοποιώντας ηθμομεμβράνες οι οποίες έχουν πολύ μικρούς πόρους και δεν επιτρέπουν στα βακτηριακά κύτταρα να διέλθουν διαμέσου αυτών. Είναι η κύρια χρησιμοποιούμενη μέθοδος μικροβιολογικών αναλύσεων και συνίσταται στη διήθηση μεγάλης ποσότητας δείγματος (συνήθως ≥ 5 ml). Όταν γίνεται διήθηση ρευστών μέσα από μεμβράνη, όλα τα σωματίδια, βακτήρια ή κύτταρα, που είναι μεγαλύτερα από τους πόρους της μεμβράνης, κατακρατούνται στην επιφάνειά της. Οι μικροοργανισμοί που έχουν κατακρατηθεί μπορούν να καλλιεργηθούν αν η μεμβράνη μεταφερθεί ασηπτικά σε ένα αποστειρωμένο τρυβλίο Petri που περιέχει το κατάλληλο υγρό ή στερεό θρεπτικό υπόστρωμα (Chen WT et al, 2005) (Hunter DM et al, 2011).
- ❖ **Μέθοδος ενσωμάτωσης (Pour Plate):** Η μέθοδος χρησιμοποιείται κυρίως στις περιπτώσεις δειγμάτων που δεν μπορούν να αναλυθούν με τη μέθοδο της διήθησης με μεμβράνη λόγω της σύστασής τους (περιέχουν μεγάλα σωματίδια) ή στις περιπτώσεις που ο μικροοργανισμός προς εξέταση είναι αναερόβιος ή μικροαερόφιλος. Η τεχνική της αραιώσεως του δείγματος των μικροοργανισμών με θρεπτικό υπόστρωμα σε τρυβλίο εφαρμόζεται συνήθως μετά τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων που υφίσταται το δείγμα. Μικρός γνωστός όγκος αραιωμένου δείγματος εμβολιάζεται σε άδειο αποστειρωμένο τρυβλίο και στη συνέχεια υγρό θρεπτικό άγαρ θερμοκρασίας περίπου 45°C αναμιγνύεται με το εμβόλιο εντός του τρυβλίου. Στη συνέχεια γίνεται ανάκτηση και ανάμιξη εντός του τρυβλίου δια περιστροφής αυτού (δεξιά, αριστερά, κάθετα και οριζόντια). Εναλλαγή του σταδίου είναι η ανάμιξη του εμβολίου εντός της κωνικής φιάλης η οποία περιέχει το υγρό θρεπτικό άγαρ των 45°C , το οποίο στη συνέχεια διαμοιράζεται σε αποστειρωμένα τρυβλία. Τα περισσότερα βακτήρια και οι περισσότεροι μύκητες επιβιώνουν σε αυτή τη σύντομη έκθεσή τους στο άγαρ των 45°C . Μετά τη στερεοποίηση το άγαρ κάθε κύτταρο αναπτύσσει στην θέση που θα βρεθεί μια αξενική αποικία. Ο ολικός αριθμός των αποικιών ισούται με τον αριθμό των βιώσιμων μικροοργανισμών στο αρχικό αραιωμένο δείγμα. Οι αποικίες που αυξάνονται στην επιφάνεια μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εμβόλια σε νέα θρεπτικά υποστρώματα για προετοιμασία νέων καθαρών μικροβιακών καλλιεργειών. Η μέθοδος γίνεται ακόμα πιο εύχρηστη για την παραγωγή αξενικών καλλιεργειών όταν χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με εκλεκτικά ή διαγνωστικά θρεπτικά υποστρώματα. Στην επόμενη εικόνα απεικονίζονται τρυβλία με υγρό δείγμα προς ενσωμάτωση.



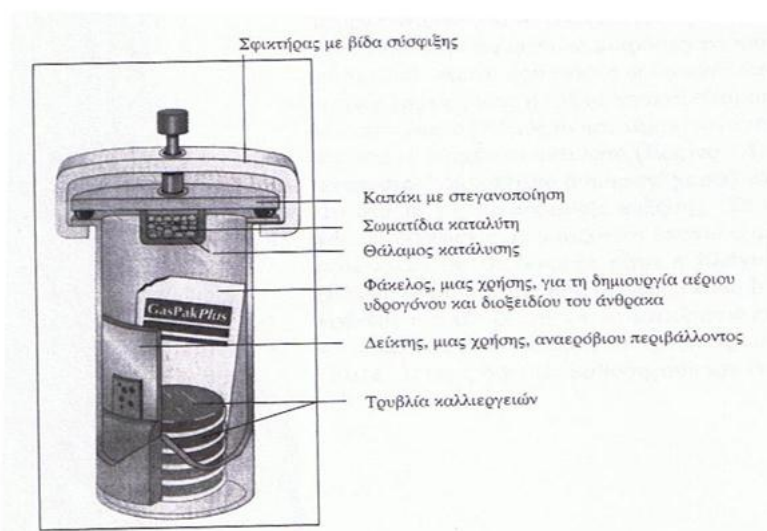
ΕΙΚΟΝΑ 3.2.1, Φωτογραφία από το εργαστήριο όπου απεικονίζεται η μέθοδος ενσωμάτωσης.

- ❖ **Μέθοδος επίστρωσης (Spread Plate):** Η μέθοδος χρησιμοποιείται κυρίως στις περιπτώσεις δειγμάτων που δεν μπορούν να αναλυθούν με τη μέθοδο της διήθησης με μεμβράνη λόγω της σύστασής τους (περιέχουν μεγάλα σωματίδια), στις περιπτώσεις που ο μικροοργανισμός προς εξέταση είναι αερόβιος και απαιτείται η παρουσία οξυγόνου για την ανάπτυξή του ή στις περιπτώσεις που ο μικροοργανισμός πρέπει να απομονωθεί για περαιτέρω ανάλυση και μελέτη. Κατά τη διασπορά των μικροοργανισμών σε τρυβλίο Petri εναιώρημα κυττάρων είναι δυνατόν να διασπαρθεί ομοιογενώς πάνω στη στερεοποιημένη επιφάνεια ενός θρεπτικού υλικού με την βοήθεια γυάλινης ράβδου κατάλληλου σχήματος η οποία καλείται ράβδος (spreader). Κατ' αυτό τον τρόπο είναι δυνατός ο διαχωρισμός και η απομάκρυνση των κυττάρων μεταξύ τους ώστε να αναπτυχθούν μεμονωμένες αποικίες. Κάθε αποικία αντιπροσωπεύει μια καθαρή καλλιέργεια. Αυτή η τεχνική είναι εύκολη με άμεσο αποτέλεσμα. Η διαδικασία έχει ως εξής: το δείγμα του μίγματος των μικροοργανισμών αραιώνεται με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων (περιγράφεται πλήρως στην εικόνα 3.2.2). Από συγκεκριμένη αραιώση λαμβάνεται μικρός όγκος εναιωρήματος ο οποίος πρέπει να περιέχει από 100 έως 200 κύτταρα περίπου και μεταφέρεται στο κέντρο στερεοποιημένου με άγαρ θρεπτικού υλικού το οποίο βρίσκεται μέσα σε τρυβλίο Petri. Το εναιώρημα των κυττάρων διασπείρεται πάνω στην επιφάνεια με τη βοήθεια αποστειρωμένης κεκαμένης γυάλινης ράβδου ή διανομέα και τα τρυβλία επωάζονται σε κατάλληλο επωαστικό κλίβανο για την ανάπτυξη των μεμονωμένων αποικιών. Εφόσον κάθε αποικία προέρχεται από ένα και μοναδικό κύτταρο είναι δυνατόν καταμετρώντας τις αποικίες να υπολογισθεί το μέγεθος του βιώσιμου μικροβιακού πληθυσμού.



ΕΙΚΟΝΑ 3.2.2, Μέθοδος διαδοχικών αραιώσεων (Καραγκούνη – Κύρτσου, Αμαλία Δ.: Μικροβιολογία).

- ❖ **Μέθοδος αναερόβιας καλλιέργειας:** Για την επίτευξη αναερόβιων συνθηκών, το εμβολιασμένο υπόστρωμα τοποθετείται σε ειδική γυάλα κενού. Στη γυάλα προστίθεται ένζυμο δέσμευσης του οξυγόνου, καθώς και δείκτης αναερόβιων συνθηκών, ώστε να επιβεβαιώνεται ότι καθ' όλη τη διάρκεια της επώασης οι συνθήκες παραμένουν αναερόβιες. Η γυάλα δεν ανοίγεται πριν την ολοκλήρωση του χρόνου επώασης των περιεχόμενων καλλιεργείων. Στην περίπτωση αναερόβιων ή μικροαερόφιλων μικροοργανισμών προτιμάται η μέθοδος της ενσωμάτωσης για τον εμβολιασμό του υποστρώματος. Στην εικόνα 3.2.3 που ακολουθεί απεικονίζεται η ειδική γυάλα κενού.



ΕΙΚΟΝΑ 3.2.3, Ειδική γυάλα νερού (Καραγκούνη – Κύρτσου, Αμαλία Δ.: Μικροβιολογία).

3.3 ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΔΙΑΚΡΙΣΗΣ ΤΡΟΦΟΓΕΝΩΝ ΠΑΘΟΓΟΝΩΝ

Η επιτήρηση των τροφιμογενών παθογόνων στις βιομηχανίες τροφίμων έχει αναδείξει την επιτακτική ανάγκη για την επίτευξη ταχέων και ανεξάρτητων μεθόδων με σκοπό την απομόνωση και τον χαρακτηρισμό των μικροοργανισμών που βρίσκονται στα τρόφιμα και χρήζουν κλινικής και επιδημιολογικής προσοχής. Πρόσφατες έρευνες σχετικά με τις ταχείες μικροβιολογικές μεθόδους έχουν επικεντρωθεί στο βιοχημικό χαρακτηρισμό, στην ανοσολογία και τις μοριακές μεθόδους (Bruce, J. 1996). Πολλές από τις μοριακές μεθόδους έχουν αναπτυχθεί κατά την προσπάθεια ανίχνευσης και χαρακτηρισμού των παθογόνων μικροοργανισμών σε εργαστήρια ή σε βιομηχανίες τροφίμων. Μπορούν να χωριστούν κυρίως σε αυτές που αφορούν τα τεστ στις ζώνες του DNA και σε εκείνες που αφορούν τεστ στην αλληλουχία των βάσεων του DNA (A. K. Leung et al, 2006) (N. Johansson et al 2008) (P. G. Klein and V. K. Juneja, 1997) (F. Han, B. Ge, 2008) (A. K. Bhunia, 2008) (A. K. Bej, S. C. McCarty, R. M) (K. T. Lu, H. Y. Cheng et al) (C. S. Teh, K. H. Chua, S. D. Puthuchery, K. L. Thong) (D. Kim, S. R. Kim, K. S. Kwon et al).

Τα τροφιμογενή παθογόνα έχουν εδώ και αρκετά μεγάλο χρονικό διάστημα αναγνωριστεί ως ένα από τα σημαντικότερα αίτια τροφικών δηλητηριάσεων ανά τον κόσμο και σε ορισμένες μάλιστα περιπτώσεις μπορεί να οδηγήσουν ακόμη και στον θάνατο. Οι κλασικές μέθοδοι μικροβιολογίας είναι χρονοβόρες και απαιτούν διάστημα πέντε έως έξι ημερών για την περαίωση αυτών. Οι μοριακές μέθοδοι ανάλυσης είναι ζωτικής σημασίας όχι μόνο σε ότι αφορά τις βιομηχανίες τροφίμων για λόγους υγιεινής, καθώς επίσης και για τις κυβερνήσεις, οι οποίες στοχεύουν στην αύξηση των επιπέδων της προστασίας της δημόσια υγείας και της εμπιστοσύνης και της σιγουριάς των καταναλωτών. Οι σύγχρονες μέθοδοι βασίζονται κυρίως σε τεχνικές ανάλυσης του νουκλεϊκού οξέος και όχι των πρωτεϊνών, έτσι ώστε να μειώνεται αισθητά ο χρόνος ανάλυσης. Ωστόσο, υπάρχει μια μεγάλη πιθανότητα οι τεχνικές που βασίζονται στο DNA να δώσουν θετικά αποτελέσματα κατά την ανίχνευση είτε νεκρών είτε ανενεργών βακτηριακών κυττάρων, γεγονός που αποτελεί το κύριο πρόβλημα στην άμεση εφαρμογή των τεχνικών PCR για την ανάλυση των τροφίμων, ιδιαίτερα όσον αφορά δοκιμασίες που δεν περιλαμβάνουν βήματα προ- εμπλουτισμού. Από την άλλη πλευρά το mRNA, αν και είναι λιγότερο σταθερό σε σύγκριση με το DNA, προσφέρει μια μεγαλύτερη δυνατότητα σε ότι αφορά την πιο εξειδικευμένη ανίχνευση των ζωντανών κυττάρων των τροφογενών παθογόνων. Συμπερασματικά, μπορεί να χρησιμοποιηθούν εξίσου και τα δύο είδη γονιδιώματος ανάλογα με τον επιθυμητό στόχο (M. A. Moreira et al 2007) (A. Rompre et al, 2002) (J. A Swaminathan, B., Feng, P., 1994) (C. Vandenvelde, M. Verstraete, D. Van Beers) (S. D. Saroj, R. Shashidhar et al, 2008) (S. S. Klemsdal, O. Elen. Lett.)

Υβριδοποίηση νουκλεϊκού οξέος

Η τεχνική αυτή αποτελεί μία σχετικά γρήγορη εξέταση για την ανίχνευση των τροφιμογενών παθογόνων στόχων σε προεμπλουτιστικά μέσα. Η αρχή της αντίδρασης βασίζεται στην υβριδοποίηση των μορίων DNA ή RNA στον οργανισμό-στόχο με τη βοήθεια

ανιχνευτή DNA που έχει συμπληρωματική ως προς το στόχο αλληλουχία. Οι ανιχνευτές DNA περιέχουν συνήθως 15-30 νουκλεοτίδια και η διαδικασία ελέγχεται πλήρως από την αλληλουχία νουκλεοτιδίων του ανιχνευτή. Το πρώτο βήμα της εν λόγω διαδικασίας περιλαμβάνει την κυτταρική λύση με σκοπό να παραληφθεί το νουκλεϊκό οξύ και να μπορέσει να υβριδοποιηθεί από τον ανιχνευτή. Τα προϊόντα του υβριδισμού μπορούν να ανιχνευθούν με διάφορες τεχνικές. Η άμεση υβριδοποίηση αφορά τους ραδιενεργούς και φθορίζοντες ανιχνευτές για την υβριδοποίηση των νουκλεϊκών οξέων στο δείγμα, ενώ η έμμεση ανίχνευση γίνεται από ένζυμα προάγγελους σε στερεά υλικά-μεμβράνες (νιτροκυτταρίνης ή νάilon) και σε σωματίδια πολυμερούς. Σε αυτήν την περίπτωση, χρησιμοποιούνται οι τεχνικές Southern και Dot blot, κατά τις οποίες το στοχευόμενο νουκλεϊκό οξύ ακινητοποιείται επί της μεμβράνης μετά τον διαχωρισμό του με τη βοήθεια της ηλεκτροφόρησης γέλης (Southern blot) ή απευθείας από το διάλυμα (Dot blot). Σήμερα, υπάρχουν διάφορα εμπορικά συστήματα για την ανίχνευση των παθογόνων που διατίθενται στην αγορά, όπως είναι το Gene-Track, το οποίο χρησιμοποιεί ειδικούς σε παθογόνους μικροοργανισμούς ανιχνευτές για την ανάκτηση του βακτηριακού rRNA, καθώς επίσης και χρωματομετρικό σύστημα για την ανίχνευση των ειδικών ανιχνευτών rRNA υβριδίων. Τα μόρια RNA χρησιμοποιούνται συχνά ως στόχος για υβριδοποίηση λόγω του ότι προσφέρουν υψηλή ευαισθησία, καθώς υπάρχει ένας σημαντικός αριθμός αντιγράφων της αλληλουχίας στόχου (>1000) σε ένα μόνο βακτηριακό κύτταρο. Η έλλειψη των σχετιζόμενων με το rRNA μεθόδων έγκειται στην περιορισμένη εξειδίκευσή τους. Στενά συγγενικά είδη όπως λόγου χάρη η *Listeria monocytogenes* και η *Listeria innocua* παρουσιάζουν παρόμοιες αλληλουχίες rRNA και ως εκ τούτου η διακρισή τους δεν είναι δυνατή (Vos et al, 1995) (S. Kawasaki, P. M. Fratamico et al) (de Boer, Enne, Beumer, R.R. 1999) (Barbour, W.M., Tice, G., 1997) (K. Porter-Jordan, E. I. Rosenberg et al, 1990).

Μέθοδοι ανίχνευσης που χρησιμοποιούν την PCR

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης έχει καθιερωθεί ως η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδος από τότε που αναπτύχθηκε από τον Mullis. Το σύστημα της αντίδρασης στηρίζεται στην θέρμανση σε συνδυασμό με τη δράση της DNA-πολυμεράσης και των ολιγονουκλεοτιδικών primers που είναι συμπληρωματικά ως προς τον ένα κλώνο DNA του προς ανίχνευση παθογόνου μικροοργανισμού. Για την ολοκλήρωση της διαδικασίας απαιτούνται περίπου τριάντα με σαράντα κύκλοι με αποτέλεσμα την παραγωγή δισεκατομμυρίων κλώνων του τμήματος γενετικού υλικού του παθογόνου μικροοργανισμού. Κάθε κύκλος μιας PCR αποτελείται από την παροχή θερμοκρασίας μετουσίωσης όπου το τμήμα του δίκλωνου DNA αποδιατάσσεται σε μονόκλιωνα τμήματα DNA όπου προσδέονται ειδικά οι primers και με τη βοήθεια της DNA-πολυμεράσης δημιουργείται ο δεύτερος κλώνος συμπληρωματικός ως προς τον πρώτο. Αυτός ο τρόπος έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για την ανίχνευση και τον χαρακτηρισμό των παθογόνων μικροοργανισμών των τροφίμων (Hoorfar, J. et al, 2004) (Wiedmann, M., 2002) (Powledge, Tabitha M., 2004) (M. M. Picken, R. N. Picken et al, 1996).

Παρακάτω περιγράφονται οι μέθοδοι της PCR :

- Multiplex PCR

Το κόστος και ο περιορισμένος όγκος των δειγμάτων είναι τα κυριότερα σημεία για την ανίχνευση των παθογόνων στις βιομηχανίες τροφίμων. Μια διαδικασία η οποία παρουσιάζει πλεονεκτήματα σχετικά με τις δύο αυτές παραμέτρους είναι η πολλαπλή PCR, κατά την οποία περισσότεροι εκκινητές περιλαμβάνονται σε ένα μόνο σωλήνα αντίδρασης. Στη διαδικασία αυτή, περισσότερες από μία αλληλουχίες DNA λειτουργούν ως στόχος σε ένα σύστημα αντίδρασης, συμπεριλαμβανομένων περισσότερων από ένα ζεύγος εκκινητών. Η πολλαπλή PCR έχει εφαρμοστεί με επιτυχία σε πολλούς τομείς διάγνωσης νουκλεϊκού οξέος. Το βασικότερο ζήτημα για τη λειτουργία της δεδομένης μεθόδου είναι ο σχεδιασμός των εκκινητών (V. K. Sharma, 2006) .

- Nested PCR

Η ευαισθησία και η εξειδίκευση είναι οι πιο σημαντικές παράμετροι για την εφαρμογή μιας μεθόδου ανίχνευσης και η ένθετη PCR έχει αναπτυχθεί για το σκοπό αυτό. Κατά τη διαδικασία αυτή χρησιμοποιούνται διαδοχικά δύο ζεύγη εκκινητών PCR. Η πρώτη ομάδα εκκινητών χρησιμοποιείται για την επιμήκυνση του συμπληρωματικού κλώνου ενός μεμονωμένου τμήματος DNA, ο οποίος στη συνέχεια θα χρησιμεύσει ως εκμαγείο για μία δεύτερη επιμήκυνση. Η δεύτερη ομάδα εκκινητών βρίσκεται εσωτερικά της πρώτης επιμήκυνσης. Αυτή η δευτερεύουσα επιμήκυνση δεν θα συμβεί εάν η κύρια ήταν μη ειδική. Πολλά τα τροφογενή παθογόνα έχουν εντοπιστεί και χαρακτηριστεί από τη μέθοδο αυτή. Ένα σημαντικό μειονέκτημα της ένθετης PCR είναι ότι πρέπει να ανοιχτεί η συσκευή με σκοπό την εισαγωγή του δεύτερου ζεύγους εκκινητών, γεγονός που αυξάνει την πιθανότητα επιμόλυνσης από το εκάστοτε εργαστηριακό περιβάλλον (M. Gilgen, B. Wegmulleret al, 1995) (C. Arnal, V. Ferre-Aubineau et al, 1999).

- PCR αντίστροφης μεταγραφής

Η PCR αντίστροφης μεταγραφής είναι μια τροποποιημένη μέθοδος PCR στην οποία χρησιμοποιείται το RNA αντί του DNA ως αρχικό εκμαγείο. Σε αντίθεση με την ανίχνευση του DNA από μη βιώσιμους οργανισμούς χρησιμοποιώντας την πρότυπη PCR, η ανίχνευση του cDNA από το αγγελιοφόρο RNA που κωδικοποιείται από ένα παθογόνο μικροοργανισμό χρησιμοποιώντας την PCR αντίστροφης μεταγραφής θα μπορούσε να είναι ένδειξη ενεργών κυττάρων. Στην PCR αντίστροφης μεταγραφής το RNA στόχος αρχικά μετατρέπεται σε ένα συμπληρωματικό αντίγραφο DNA (cDNA) από την αντίστροφη μεταγραφή. Αυτό το cDNA χρησιμοποιείται ως μήτρα και επιμηκώνεται συμπληρωματικά σύμφωνα με τις πρότυπες μεθόδους PCR. Η μέθοδος αυτή δεν χρησιμοποιείται μόνο για την ανίχνευση γονιδίων των παθογόνων μικροοργανισμών μέσω του RNA, αλλά και για την ενίσχυση συγκεκριμένης έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης ή μόλυνσης, δεδομένου ότι η επιμήκυνση συμπληρωματικά γίνεται σε πολύ μεγαλύτερο βαθμό στο αγγελιοφόρο ή ριβοσωμικό RNA σε σχέση με τα αντίγραφα DNA που υπάρχουν στο τροφιμογενή παθογόνα. Ωστόσο, το RNA είναι ασταθές, και

η PCR αντίστροφης μεταγραφής είναι επομένως πιο επιδέξια στο χειρισμό όταν απαιτείται η ποσοτικοποίηση για την ανίχνευση τροφιμογενών παθογόνων μικροοργανισμών (J. Hewitt, G. E. Greening, 2006) (S. T. Lambertz et al, 2008) (A. Houde, E. Guevremont et al, 2007) (S. Sandhya, W. Chen et al, 2008) (E. Churrucá, C. Girbau, I. Martinez et al, 2007) (S. H. Aliyu, M. H. Aliyu et al, 2004).

- PCR – πραγματικού χρόνου

Η Real-time PCR είναι μία πολύ ελκυστική μέθοδος όσον αφορά την ανίχνευση των τροφιμογενών παθογόνων μικροοργανισμών, καθώς προσφέρει μια συνεχή τεχνική παρακολούθησης για τα προϊόντα της PCR καθ' όλη τη διάρκεια της αντίδρασης, γεγονός εξαλείφει την όποια διαδικασία ανάλυσης μετά την PCR, μειώνει το χρόνο ανίχνευσης σε σύγκριση με την πρότυπη PCR και μειώνει τον κίνδυνο επιμόλυνσης από το εργαστηριακό περιβάλλον. Επιπλέον, η PCR–πραγματικού χρόνου είναι μία ποσοτική μέθοδος και χρησιμοποιείται συχνά για να προσδιορίσει τον αριθμό των παθογόνων σε διάφορα δείγματα. Τέσσερις τύποι δεικτών χρησιμοποιούνται πιο συχνά για την ανίχνευση παθογόνων είναι οι εξής: ανιχνευτές TaqMan, μοριακοί φάροι, ανιχνευτές υβριδισμού (FRET) και χρώσεις SYBR Green. Εκτός από το συγκεκριμένο σύνολο εκκινητών, ένα ή δύο ανιχνευτές απαιτούνται στα τρεις περιπτώσεις μεθόδων PCR πραγματικού χρόνου, όπου πρόκειται να γίνει σύζευξη με φωσφορίζουσες βαφές για τη βελτίωση των σημάτων ανίχνευσης, τα οποία χρησιμοποιούνται για την αύξηση της εξειδίκευσης της ανίχνευσης και για το σχεδιασμό των πολλαπλών μεθόδων ανίχνευσης (D. Wang, Q. Wu, L. Yao et al, 2008) (C. A. Heid, J. Stevens, K. J. Livak, et al, 1996) (F. Long, X. N. Zhu et al, 2008) (G. J. Rensen, W. L. Smith et al, 2006) (S. Zhou, Z. Hou, N. Li et al, 2007) (N. Casas, F. Amarita et al 2007) (H. M. Nam, V. Srinivasan, S. E. Murinda et al, 2005).

3.4 ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΕΣ ΕΛΕΓΧΟΥ ΤΡΟΦΟΓΕΝΩΝ ΠΑΘΟΓΟΝΩΝ

Οι συμβατικές μέθοδοι οι οποίες χρησιμοποιούνταν αποκλειστικά έως και πρόσφατα για την ανίχνευση τυχόν παθογόνων μικροοργανισμών στα τρόφιμα, είχαν να υπερπηδήσουν μεγάλα προβλήματα όπως ο χρόνος και η προσέγγιση με τη μέγιστη δυνατή ακρίβεια του στόχου προς ανεύρεση. Οι μέθοδοι αυτοί συχνά περιλαμβάνουν την χρήση κατάλληλων μέσων για τον προεμπλουτισμό και τον εμπλουτισμό, την απομόνωση των παθογόνων σε εκλεκτικά θρεπτικά υλικά και την επιβεβαίωση των ευρημάτων με μορφολογικές, βιοχημικές και/ή δοκιμές ορού (Pimbley, D.W., Patel, P.D., 1998). Αυτές οι μέθοδοι απαιτούν εντατική εργασία, περισσότερο χρόνο και παρ' όλα αυτά τα αποτελέσματα συχνά μπορεί να είναι και ψευδή, λαμβάνοντας υπ' όψιν την παρουσία των ζώντων, αλλά όχι των προς καλλιέργεια μικροοργανισμών. Η ανάπτυξη της βιοτεχνολογίας και της βιοπληροφορικής έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη νέων τεχνολογιών που

επιτρέπουν την πιο αξιόπιστη και ταχύτερη ανίχνευση των παθογόνων μικροοργανισμών στα τρόφιμα (Mandal, P.K., Biswas, A.K., Choi, K., Pal, U.K. 2011) . Επιπλέον, οι μέθοδοι μοριακής βιολογίας, αν και εξακολουθούν να μην εφαρμόζονται συστηματικά σε καθημερινή συχνότητα, είναι οι πολλά υποσχόμενες εναλλακτικές λύσεις που μπορεί να αντικαταστήσουν ή να δοκιμαστούν σε σχέση με τις τρέχουσες μεθόδους αναφοράς στον τομέα αυτό (Lu, H., Zhao et al, 2000) (Swaminathan, B., Feng, P., 1994) (Novel food pathogen testing technologies: molecular biology methods, Aleksandra Martinovic, Hilde Marit Ostlie, Siv Borghild Skeie). .

Τέτοιες μέθοδοι είναι:

- **NASBA (Nucleic Acid Sequence Based Amplification)**

Η δημιουργία συμπληρωματικού κλώνου μονόκλωνων νουκλεϊνικών οξέων περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1991. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για τη συνεχή δημιουργία συμπληρωματικών κλώνων των πυρηνικών οξέων σε ισόθερμες συνθήκες. Η μέθοδος NASBA αποτελεί ένα ευαίσθητο σύστημα που βασίζεται στην αντιγραφή για την ανίχνευση των μορίων RNA. Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης NASBA 10-100 αντίγραφα της αλληλουχίας του στόχου RNA παράγονται σε κάθε έναν από τους κύκλους και μετά το πέρας 4-5 κύκλων δημιουργούνται περίπου 1 εκατομμύριο αντίγραφα της αλληλουχίας στόχου (Compton, J. 1991) (Deiman, B. et al, 2002). Ο αριθμός των κύκλων στην αντίδραση NASBA είναι σημαντικά χαμηλότερος σε σύγκριση με τις συμβατικές μεθόδους PCR, όπου είναι απαραίτητο να γίνουν περίπου 20 κύκλοι. Λαμβάνοντας υπ' όψιν το γεγονός ότι η NASBA, όπως και άλλες μοριακές τεχνικές, μπορεί επίσης να δώσει ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Τα πιο πιθανά αίτια της εμφάνισης ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων είναι η εξέταση τυχαίου δείγματος ή η μόλυνση των αντιδραστηρίων (διασταυρούμενη μόλυνση) στο εργαστήριο. Αυτό το πρόβλημα μπορεί να ξεπεραστεί με την εφαρμογή εσωτερικών ελέγχων IAC (Internal Amplification Controls). Η τεχνική NASBA αποτελεί ένα πολλά υποσχόμενο διαγνωστικό εργαλείο για την ανίχνευση των βιώσιμων μικροοργανισμών. Η NASBA διαθέτει τη ταχύτητα και την ακρίβεια της PCR και επιπλέον έχει το πλεονέκτημα εντοπισμού των ζωντανών παθογόνων μικροοργανισμών γεγονός που δύναται να συμβάλλει σημαντικά στην εξέλιξη της μικροβιολογίας τροφίμων (Chan, A.B., Fox, J.D., 1999) .

- **Μοριακές μέθοδοι εύρεσης υπο-τύπων (στελεχών)**

Οι μέθοδοι αυτές χρησιμοποιούνται για τη ταυτοποίηση του στελεχούς και συχνά χρησιμοποιούνται σε εργαστηριακό επίπεδο, καθώς είναι γρήγορες, ακριβείς, αποτελεσματικές και αποφέρουν σημαντικά ευρήματα στη διαδικασία παρακολούθησης της τροφικής μετάδοσης μιας νόσου (Rodríguez-Lázaro, D., Hernández, M., 2006). Γενικά, οι μέθοδοι αυτές διακρίνονται ανάλογα με το αν

εξετάζουν το φαινότυπο ή τη μοριακή γενετική. Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες μέθοδοι με βάση το πλάσμιδιο είναι οι Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE), Ribotyping, Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP), Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD). Αυτές οι μέθοδοι επιτρέπουν την ευαίσθητη διάκριση των στελεχών και επιτυγχάνουν υψηλά επίπεδα τυποποίησης και αναπαραγωγιμότητας σε σύγκριση με τις μεθόδους που βασίζονται στην φαινοτυπική εξέταση (serotyping, biotyping, multilocus enzyme electrophoresis). Ορισμένες από τις μεθόδους αναλυτικότερα είναι οι (Kavita Arora, Subhash C., Malhotra, B. D. 2006) :

Pulsed Gel Field Electrophoresis- PFGE: χαρακτηρίζει τα στελέχη των βακτηρίων σύμφωνα με τις κατάλληλες αλληλουχίες του DNA ύστερα από την κοπή του βακτηριακού γενετικού υλικού από περιοριστικά ένζυμα, όπου το DNA κόβεται σε συγκεκριμένα σημεία με αποτέλεσμα τη δημιουργία θραυσμάτων. Ο διαχωρισμός των θραυσμάτων αυτών γίνεται με την χρήση ειδικής ηλεκτροφόρησης κατά τη διάρκεια της οποίας η κατεύθυνση του ηλεκτρικού πεδίου μεταβάλλεται και έτσι επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός. Στη συνέχεια, τα θραύσματα συγκρίνονται με την υπάρχουσα βάση δεδομένων με σκοπό την διαπίστωση του βαθμού ομοιότητας των εξεταζόμενων και των ταυτοποιημένων στελεχών. Η μέθοδος αυτή αποτελεί μία γρήγορη και εύκολη διάκριση σε ότι αφορά την ανίχνευση των παθογόνων μικροοργανισμών και ως εκ τούτου αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη τεχνική στο πεδίο της εργαστηριακής διάγνωσης.

Ribotyping: είναι άλλη μία μέθοδος ταυτοποίησης στελεχών που βασίζεται στην εξέταση του DNA, κατά την οποία το βακτηριακό γενετικό υλικό αρχικά κόβεται σε θραύσματα από τα περιοριστικά ένζυμα σε μικρότερα και περισσότερα θραύσματα από ότι στην περίπτωση της PFGE. Τα θραύσματα διαχωρίζονται βάση του μεγέθους τους με ηλεκτροφόρηση αгарόζης.

Amplified Fragment Length Polymorphism- AFLP: αντιπροσωπεύει μία ακόμη γενετική τεχνική, η οποία βασίζεται στην δημιουργία πανομοιότυπων κλώνων επιλεγμένων τμημάτων DNA που έχουν κοπή από τα περιοριστικά ένζυμα.

• Βιοαισθητήρες

Οι βιοαισθητήρες είναι συσκευές που ανιχνεύουν βιολογικά ή χημικά σύμπλοκα και βασίζονται στη σύνδεση αντιγόνου-αντισώματος, ενζύμου-υποστρώματος ή υποδοχέα- υποκαταστάτη. Οι περισσότεροι από τους βιοαισθητήρες έχουν σχεδιαστεί για την ανίχνευση των παθογόνων μικροοργανισμών στα τρόφιμα και έχουν δοκιμαστεί σε καθαρές βακτηριακές καλλιέργειες. Οι βιοαισθητήρες DNA εφαρμόζονται μετά την ανακάλυψη των πολύ ενδιαφερουσών χημικών και φυσικών ιδιοτήτων του μορίου του DNA. Αποτελούν διαγνωστική συσκευή που ακινητοποιεί το μονόκλωνο DNA σε κατάλληλη μήτρα με στόχο την ανίχνευση του σήματος υβριδοποίησης μετά την έκθεσή του σε συμπληρωματικό κλώνο DNA

(Lazcka et al, 2007) (Davis, F., Nabok, A.V., Higson, S.P.J. 2005). H. Schonenbrucher, A. Abdulmawjood, K. Failing, M. Bulte. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 2751 (2008) (E. O'Regan, E. McCabe et al, 2008) (P. G. Klein, V. K. Juneja. 1997).

- Μικροσυστοιχίες DNA και ανάλυση αλληλουχίας επόμενης γενιάς

Η ανάπτυξη μικροσυστοιχιών DNA ξεκίνησε μια νέα φάση στον τομέα της ανίχνευσης των παθογόνων μικροοργανισμών, καθώς παρέχει μία ακριβή και ευαίσθητη ανάλυση. Ανάλογα με την τεχνική που θα εφαρμοστεί στοχεύει είτε την έκφραση rRNA ή DNA (συστοιχίες cDNA) είτε την πληθώρα των αλληλουχιών DNA (μικροσυστοιχίες ολιγονουκλεοτίδων). Ο Wilson ανέπτυξε την τεχνική (MPID), χάρη στην οποία μπορούν να αναγνωριστούν δεκάοχτώ είδη διαφορετικών παθογόνων μικροοργανισμών (Tillib, S.V. and Mirzabekov, A.D. 2001).

Η τεχνολογία DNA Microarray (DNA chip) είναι ένα πολλά υποσχόμενο εργαλείο για την ανίχνευση των παθογόνων και μπορεί να βρει εφαρμογή σε διάφορους τομείς, μεταξύ των οποίων είναι η μικροβιολογία τροφίμων, ανιχνεύοντας είτε την έκφραση γονιδίων μολυσματικότητας ή ειδικές ποικίλες αλληλουχίες του DNA.

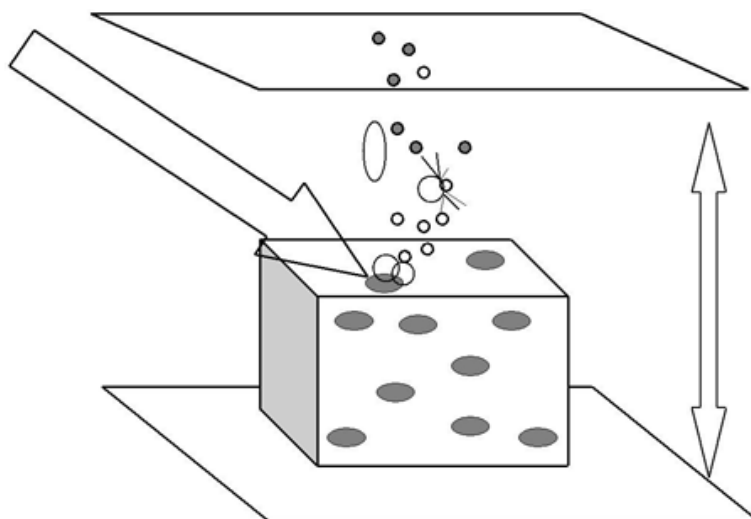
Μια άλλη επαναστατική ανακάλυψη στη βιοπληροφορική είναι η ανάλυση αλληλουχίας επόμενης γενιάς – Pyrosequencing, η οποία δίνει τη δυνατότητα εκατομμυρίων αλληλουχιών DNA συγχρόνως και την ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών σε σύνθετα δείγματα (Adams, I.P., Glover, R.H. et al, 2009) (Yoo, S. M., Keum, K. C et al, 2004).

3.5 MALDI – TOF ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΡΟΦΟΓΕΝΩΝ ΠΑΘΟΓΟΝΩΝ

Τα τελευταία χρόνια η τεχνική MALDI-TOF MS έχει φέρει την επανάσταση στο τομέα της ταυτοποίησης των βακτηρίων, καθώς επιτυγχάνεται η ταχεία και αξιόπιστη ταυτοποίηση αυτών. Οι προκλήσεις για τα εργαστήρια ανάλυσης τροφίμων είναι τόσο ποικίλες και πολυάριθμες, γεγονός που αυξάνει τις απαιτήσεις των μεθόδων αναγνώρισης. Μόνο μέσω της ανίχνευσης των παθογόνων τροφιμογενών και των προβιοτικών μπορεί να επισφραγιστεί η υγιεινή των τροφίμων. Οι απαιτήσεις για τη ταυτοποίηση και την ευαισθησία είναι αρκετά υψηλές και ως εκ τούτου έχουν αναπτυχθεί σύνθετες τεχνικές. Επί του παρόντος, οι παραδοσιακές μέθοδοι χρησιμοποιούνται για την πλειοψηφία των βακτηρίων και αποτελούν ρουτίνα για τα μικροβιολογικά εργαστήρια τροφίμων (Decristophoris P, Fasola A, Benagli C, Tonolla M, Petrini).

Η μέθοδος MALDI-TOF MS αποτελεί μία μέθοδο ταξινόμησης των βακτηρίων και σε αντίθεση με τις γενεοτυπικές μεθόδους μπορεί εύκολα να ενταχθεί στις μεθόδους ρουτίνας ενός εργαστηρίου καθώς όλοι οι μικροοργανισμοί ταυτοποιούνται με το ίδιο πρωτόκολλο (Hijazin M, Hassan AA, Alber J et al).

Με τη μέθοδο αυτή καθίσταται δυνατή η ανίχνευση πολλών βιομορίων όπως είναι τα νουκλεϊκά οξέα, τα πεπτίδια, οι πρωτεΐνες, τα σάκχαρα και τα μικρομόρια, με την χρήση της γενιάς των πρωτεϊνικών αποτυπομάτων (Hinse D, Vollmer T, Erhard M et al) (Dieckmann R, Graeber et al). Η ταυτοποίηση των μικροοργανισμών επιτυγχάνεται μέσω της συσχέτισης του πρωτεϊνικού αποτυπώματος του προς ταυτοποίηση μικροοργανισμού με την βάση δεδομένων όλων των καταγεγραμμένων αποτυπωμάτων. Η βασική αρχή όλων των μεθόδων της φασματομετρίας μάζας είναι ο ιοντισμός των ουδέτερων μορίων και ένα τυπικό φασματόμετρο μάζας αποτελείται από τρία εξαρτήματα: τον ιονιστή, τον αναλυτή μάζας και τον ανιχνευτή. Στην παρακάτω εικόνα 3.5.1 απεικονίζεται η αρχή λειτουργίας της μεθόδου, κατά την οποία οι κρύσταλλοι της μήτρας διεγείρονται από την χρήση ενός παλμικού λέιζερ, γεγονός που οδηγεί στην εκρόφηση των μορίων αναλυόμενης ουσίας με τα πρωτόνια να μεταφέρονται από την μήτρα προς τον αναλύτη (Lartigue, M. F., Hery-Arnaud et al).



ΕΙΚΟΝΑ 3.5.1, Η εφαρμογή της μεθόδου MALDI (Lottspeich F et al. 1998).

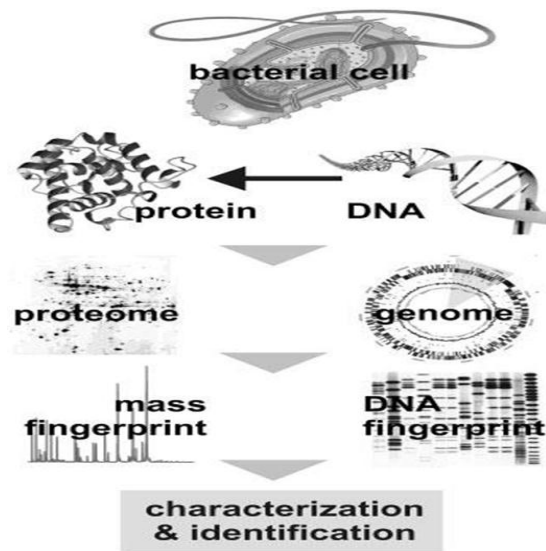
Η εφεύρεση του MALDI-TOF-MS συνέβαλε σημαντικά στην κατανόηση της χημείας των πρωτεϊνών και της κυτταρικής βιολογίας. Εκτός από την «πραγματική» πρωτεομική, η τεχνική MALDI-TOF-MS εφαρμόστηκε για την ανάλυση των μικροοργανισμών και το ταξινομικό χαρακτηρισμό τους από την αρχή. Αυτή η προσέγγιση έχει εξελιχθεί ως ένα διαγνωστικό εργαλείο άμεσα διαθέσιμο για αναλύσεις. Υποστηρίζεται από ολοκληρωμένες βάσεις δεδομένων ότι η αναγνώριση MALDI-TOF που βασίζεται στην τεχνική MS έχει γίνει ευρέως αποδεκτή σε κλινικά εργαστήρια μέσα σε λίγα μόνο χρόνια (Munoz R, López-López A et al).

Παράλληλα με ένα ευρύ πεδίο συμβατικών τεχνικών η πρωτεομική, MALDI-TOF-MS, εφαρμόζεται όλο και περισσότερο για κλινικές μικροβιακές διαγνώσεις για την ταυτοποίηση των παθογόνων ειδών. Πράγματι, η επιτυχία αυτής της τεχνολογίας θεωρείται ήδη ως μια επανάσταση της Βακτηριολογίας, προσφέροντας πολλά πλεονεκτήματα σε

σύγκριση με τη συμβατική βιοχημική ταυτοποίηση μικροοργανισμών. Η ταχεία αποδοχή της νέας τεχνολογίας στην κλινική μικροβιολογία - γενικά ένα πεδίο με ισχυρές παραδόσεις και αυστηρούς κανονισμούς - ήταν απρόβλεπτη μόνο πριν από λίγα χρόνια. Όπως ήταν αναμενόμενο, μέσα στα επόμενα λίγα χρόνια η τεχνική MALDI-TOF βασισμένη στην MS για την αναγνώριση των κλινικών και άλλων μικροοργανισμών θα αντικαταστήσει τις συμβατικές μεθόδους, με σημαντικό αντίκτυπο στη διαγνωστική ροή εργασίας και στην κατανόηση της μικροβιακής μόλυνσης (Bizzini, A., Greub G.).

Η μέθοδος MALDI-TOF-MS εκτελείται σήμερα με αυτοματοποιημένο τρόπο. Η εστίαση λέιζερ δηλαδή, σαρώνει το δείγμα με ένα προκαθορισμένο τρόπο και λαμβάνεται ένα φάσμα μάζας από ένα καθορισμένο αριθμό κύκλων παλμών λέιζερ, οι οποίοι είναι μερικές εκατοντάδες, για να προκύψει τελικά ένα αντιπροσωπευτικό φάσμα μάζας (Vanlaere, E., Sergeant, K., Dawyndt, P., Kallow, W. et al). Το φάσμα εφίσταται επεξεργασία για να δώσει το αποτύπωμα μάζας που περιέχει πληροφορίες σχετικά με το υψηλότερο σημείο της κορυφής με τιμές m/z , μειώνοντας έτσι τον αριθμό των δεδομένων. Το ουσιαστικό στάδιο για την ταυτοποίηση των ειδών είναι η σύγκριση των αποτυπωμάτων του δείγματος που πρόκειται να προσδιοριστεί με μία βάση δεδομένων που περιέχει αποτυπώματα μάζας αναφοράς γνωστών μικροοργανισμών. Παρόμοια με άλλες μεθόδους, η πληρότητα και η ποιότητα μιας τέτοιας βάσης δεδομένων είναι ζωτικής σημασίας για μία καλή ανάλυση. Αυτό απαιτεί, αφενός, τα αποτυπώματα μάζας όλων των ειδών ενδιαφέροντος και, αφετέρου, τα αποτυπώματα μάζας των πολλαπλών στελεχών ανά είδος. Το τελευταίο είναι επίσης εμφανές από το αξίωμα ταξινόμησης καθώς ένα είδος θα πρέπει να περιγράφεται με τη μελέτη τουλάχιστον 10 μεμονωμένων στελεχών (Sneath, P. H. A.).

Ως αποτέλεσμα της σύγκρισης ένας κατάλογος των προτεινόμενων ειδών διανέμεται με βάση την ομοιότητα των αποτυπωμάτων μάζας του δείγματος με τα αποτυπώματα μάζας αναφοράς έτσι ώστε ο χρήστης να μπορεί να συμπεράνει την πιθανή ταυτότητα του είδους του δείγματος. Διαφορετικές προσεγγίσεις έχουν ακολουθηθεί για να υπολογίσουμε την ομοιότητα μεταξύ του φάσματος μάζας ενός δείγματος και των φασμάτων μάζας αναφοράς για να επιτραπεί μία ειδική αναγνώριση. Παρακάτω δίνεται η σχηματική απεικόνιση της σχέσης του πρωτεόματος και του γενόματος και η δυνατότητα χρήσης των αποτυπωμάτων τους για την ταυτοποίηση των μικροοργανισμών (Welker, M., in Hays, J. P., van Leeuwen, W. B.) (Rossello'-Mo'ra, R., Amann, R. I.)



ΕΙΚΟΝΑ 3.5.2, Το πρωτέομα και το γένομα και η χρήση τους με σκοπό την ταυτοποίηση των μικροοργανισμών (Pukall, R et al. Heidelberg 2005).

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ – ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

4. ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Κατά τη διεξαγωγή της μελέτης κατέστη δυνατή η ανίχνευση και η ταυτοποίηση των παθογόνων μικροοργανισμών σε δείγματα τροφίμων που λήφθηκαν από διάφορα σημεία διανομής. Για την εξαγωγή των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκαν, τόσο οι κλασσικές μέθοδοι μικροβιολογίας, όσο και η σύγχρονη μοριακή μέθοδος MALDI-TOF MS. Μέσω της σύγκρισης των αποτελεσμάτων που προέκυψαν βάση των παραπάνω είναι δυνατόν να ελεγχθεί ο τρόπος εργασίας κατά την διεξαγωγή των κλασσικών μεθόδων, καθόσον η συγκεκριμένη μοριακή τεχνική εμφανίζει πλήρως αξιόπιστα αποτελέσματα μέσα σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα.

5. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

5.1 ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

Στα πλαίσια του μικροβιολογικού ελέγχου των τροφίμων στο εργαστήριο αρχικά τηρήθηκαν όλες οι απαιτούμενες αρχές για την ορθή λειτουργία του. Πιο συγκεκριμένα, το περιβάλλον του εργαστηρίου, στο οποίο πραγματοποιούνται οι μικροβιακές αναλύσεις, θα πρέπει να πληροί όλες τις προϋποθέσεις που απαιτούν οι μικροβιολογικές μέθοδοι, οι οδηγίες χρήσης των οργάνων και οι οδηγίες αποθήκευσης, χρήσης και διάθεσης των θρεπτικών υποστρωμάτων και αντιδραστηρίων, ώστε να διασφαλίζεται η ορθότητα των μετρήσεων. Στο χώρο αναλύσεων δεν επιτρέπεται η είσοδος ατόμων εκτός των αναλυτών, για λόγους υγιεινής. Επίσης, σύμφωνα με τους κανόνες ορθής εργαστηριακής πρακτικής, δεν επιτρέπεται η παρουσία τροφίμων και ποτών. Η ενδυμασία του εργαστηρίου πρέπει να αφαιρείται κατά την επίσκεψη χώρων χαμηλού επιπέδου υγιεινής (παραδείγματος χάρη καντίνα, τουαλέτα, αποθήκη). Στο μικροβιολογικό εργαστήριο πρέπει να εξασφαλίζονται οι κατάλληλες συνθήκες εργασίας (φωτισμό, θέρμανση, αερισμό) ώστε να μην επηρεάζεται η απόδοση του προσωπικού κατά την εκτέλεση των καθηκόντων του, να λαμβάνει όλα τα μέτρα ώστε να μειώνονται οι κίνδυνοι για την υγεία και την ασφάλεια του προσωπικού αλλά και να διασφαλίζει τη σωστή λειτουργία των οργάνων. Για την επιβεβαίωση της ορθής λειτουργίας των οργάνων που επηρεάζονται από τις συνθήκες περιβάλλοντος, γίνεται καθημερινά έλεγχος των θερμομέτρων που βρίσκονται τοποθετημένα στους κλιβάνους επώασης καθώς και στα ψυγεία των υποστρωμάτων και αντιδραστηρίων. Κατά την πρωινή βάρδια, συνιστάται επανεκκίνηση των θερμομέτρων μεγίστου-ελαχίστου (εφόσον το εργαστήριο διαθέτει τέτοια θερμομέτρα), αφού ελεγχθεί η ανώτερη και κατώτερη θερμοκρασία λειτουργίας του οργάνου.

Οι εργαστηριακές τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση των μικροοργανισμών που αφορούν το εργαστήριο αναλύθηκαν και στην ενότητα 3.2. Πιο συγκεκριμένα, στην περίπτωση ανίχνευσης ζυμών-μυκήτων λαμβάνονται δύο τρυβλία για κάθε εξεταζόμενη αραίωση, στο καθένα από τα οποία ενσωματώνεται συγκεκριμένη ποσότητα αναραιώτου δείγματος (εάν αυτό έχει υγρή σύσταση) ή αραίωσής του και συγκεκριμένο θρεπτικό υπόστρωμα. Στη συνέχεια, τα τρυβλία επωάζονται υπό αερόβιες συνθήκες, στους 25°C για 5 ημέρες και τέλος υπολογίζεται ο αριθμός των αποικιών που αναπτύχθηκαν σε κάθε τρυβλίο σύμφωνα με τον αριθμό των μικροοργανισμών ανά g ή ml τροφίμου.

Όσον αφορά την ανίχνευση του σταφυλόκοκκου λαμβάνεται διπλή σειρά τρυβλίων με υπόστρωμα Baird Parker (BP) agar. Ανά 2 τα τρυβλία ενοφθαλμίζονται:

- εάν το τρόφιμο είναι υγρό, με 0,1 ml τροφίμου, άλλως με 0,1 ml της πρώτης δεκαδικής του αραίωσης. Ο ενοφθαλμισμός γίνεται με σιφώνιο ολικής διανομής.
- από κάθε επόμενη δεκαδική αραίωση του τροφίμου, ποσότητα 0,1 ml ενοφθαλμίζεται σε καθένα από τα 2 τρυβλία της σειράς. Ο ενοφθαλμισμός γίνεται με τον ίδιο τρόπο, με νέο σιφώνιο.

Η ενοφθαλμισμένη ποσότητα εξαπλώνεται στην επιφάνεια του υποστρώματος το ταχύτερο δυνατό, με τη βοήθεια κεκαμμένης ράβδου, και προαιρετικά, με περιστροφή τρυβλίων. Να αποφεύγεται η επαφή της ράβδου με τα τοιχώματα του τρυβλίου. Τα τρυβλία αναστρέφονται και επωάζονται στους 35 +/- 1 °C ή 37 +/- 1 °C για 24 – 48 h. Οι τυπικές αποικίες είναι μαύρες, γυαλιστερές και κυρτές, διαμέτρου 1 - 1,5 mm μετά από επώαση 24 h και 1,5 - 2,5 mm μετά από επώαση 48 h, περιβαλλόμενες από διαυγή άλω, εν μέρει αδιαφανή. Μετά από επώαση 24 h, μέσα στη διαυγή άλω είναι δυνατόν να εμφανισθεί ιριδίζων δακτύλιος, επαπτόμενος με τις αποικίες. Οι μη τυπικές αποικίες έχουν παρόμοια εμφάνιση αλλά δεν έχουν διαφανή άλω. Θετικά στελέχη που απομονώνονται από γαλακτοκομικά προϊόντα, σχηματίζουν συχνά μη τυπικής μορφής αποικίες, όχι όμως και αυτά που απομονώνονται από άλλα είδη τροφίμων (Πρωτόκολλα εργαστηριακών μεθόδων εργαστηρίου).

Όσον αφορά την περίπτωση της **ολικής μικροβιακής χλωρίδας** λαμβάνεται διπλή σειρά τρυβλίων, στο καθένα από τα οποία ενσωματώνεται, συγκεκριμένη ποσότητα αναραιώτου δείγματος (εάν αυτό έχει υγρή σύσταση) ή αραίωσής του και συγκεκριμένο θρεπτικό υπόστρωμα. Τα τρυβλία επωάζονται υπό αερόβιες συνθήκες, στους 30 °C για 72 ώρες και τέλος ο αριθμός των μικροοργανισμών ανά g ή ml τροφίμου, υπολογίζεται με βάση τον αριθμό των αποικιών που αναπτύχθηκαν σε κάθε τρυβλίο (Πρωτόκολλα εργαστηριακών μεθόδων εργαστηρίου Πρωτόκολλα εργαστηριακών μεθόδων εργαστηρίου).

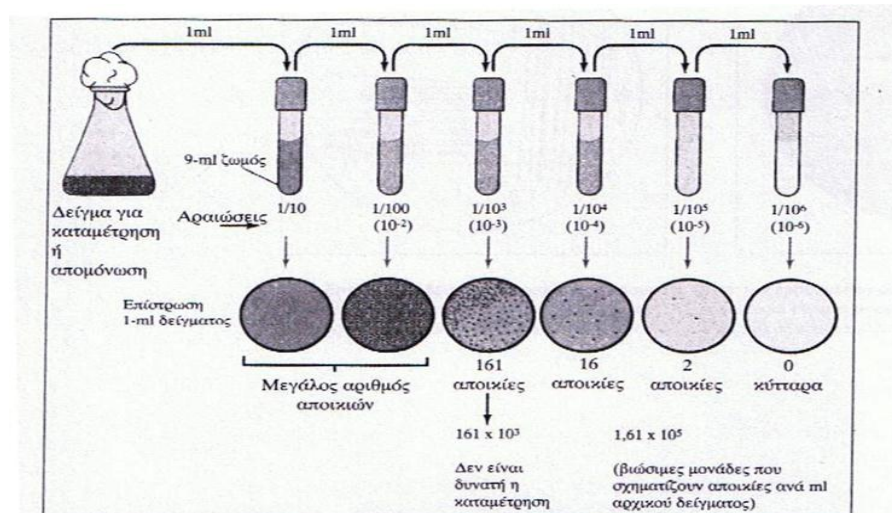
Σε αυτό το σημείο αξίζει να αναφερθεί πως κρίνεται απαραίτητη η **αποστείρωση** των θρεπτικών υποστρωμάτων με σκοπό την αποφυγή ανάπτυξης μικροοργανισμών σε αυτό και συνεπώς την επιμόλυνση της καλλιέργειας. Η αποστείρωση γίνεται με την χρήση ειδικού μηχανήματος, το οποίο ονομάζεται αυτόκαυστο. Μια αποδοτική αποστείρωση με υγρή θερμότητα απαιτεί θερμοκρασίες πάνω από εκείνη των 100°C. Αυτές οι υψηλές θερμοκρασίες επιτυγχάνονται συνηθέστερα με την χρήση ατμού κάτω από πίεση μέσα στο

αυτόκαυστο. Η χρήση του αποτελεί την ασφαλέστερη μέθοδο αποστείρωσης εκτός και αν το υλικό που πρόκειται να αποστειρωθεί μπορεί να υποστεί βλάβη λόγω θερμότητας ή υγρασίας.

Μία ακόμη σημαντική τεχνική στα πλαίσια του μικροβιολογικού ελέγχου είναι η **απομόνωση μικροοργανισμού σε καθαρή καλλιέργεια**. Είναι γνωστό ότι οι μικροοργανισμοί σε ένα φυσικό περιβάλλον αναπτύσσονται ως μικροί πληθυσμοί πολλών διαφορετικών ειδών. Αυτό δημιουργεί συγκεκριμένα προβλήματα στους μικροβιολόγους όταν θέλουν να μελετήσουν ένα μόνο είδος μικροοργανισμού. Είναι λοιπόν απαραίτητο αξενική ή καθαρή καλλιέργεια του συγκεκριμένου μικροοργανισμού. Κάθε κύτταρο που θα βρεθεί σε ένα αποστειρωμένο υπόστρωμα θα αναπτύξει έναν πληθυσμό κυττάρων σχηματίζοντας μία χαρακτηριστική αποικία του συγκεκριμένου μικροβιακού είδους. Οι τεχνικές για τη δημιουργία καθαρής καλλιέργειας στο εργαστήριο, που ανακαλύφθηκαν και προωθήθηκαν από τον Γερμανό βακτηριολόγο Robert Koch (1887), άλλαξαν την εξέλιξη της Μικροβιολογίας αφού μέσα σε διάστημα 20 ετών είχαν απομονωθεί τα περισσότερα παθογόνα μικρόβια για τον άνθρωπο. Υπάρχουν πάρα πολλοί τρόποι για να προετοιμάσει και να επιτύχει κάποιος μια καθαρή καλλιέργεια μικροοργανισμού. Παρακάτω παρατίθενται οι πλέον εύχρηστες μέθοδοι, των οποίων συνήθως απαιτείται συνδυασμός για την επίτευξη του καλύτερου αποτελέσματος.

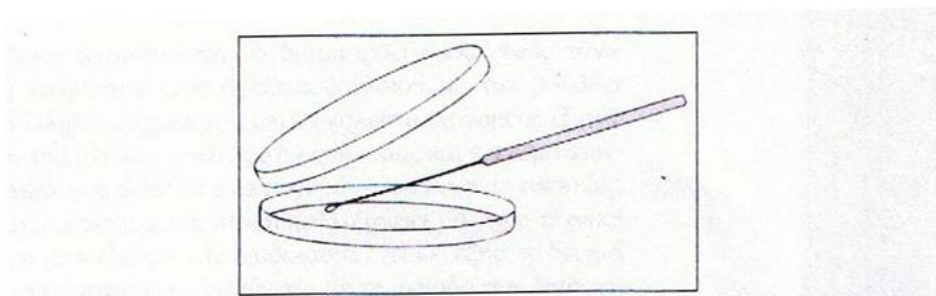
Μέθοδος παραλλήλων γραμμών σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα

Καθαρή καλλιέργεια είναι δυνατόν να επιτευχθεί και με τη μέθοδο των παραλλήλων γραμμών. Εφαρμόζεται πάντα σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα. Ποσότητα εναιωρήματος μικροοργανισμών τοποθετείται πάνω στο στερεοποιημένο με άγαρ θρεπτικό υλικό. Έτσι δημιουργείται μια πηγή μικροοργανισμών για την περαιτέρω διασπορά των μικροοργανισμών μέσα στο δοχείο καλλιέργειας. Στην εικόνα 5.2 αναφέρεται η αναγκαιότητα, σε πολλές περιπτώσεις καλλιέργειας, για αραιώση του δείγματος και η διαδικασία αυτής.

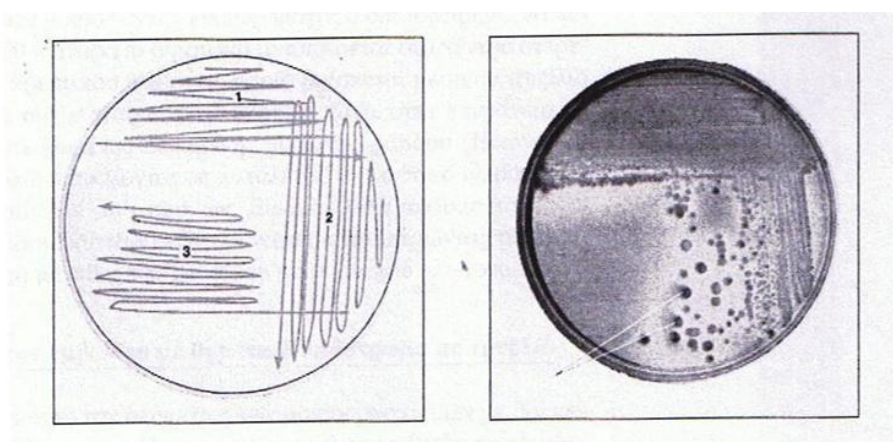


ΕΙΚΟΝΑ 5.2, Μέθοδος διαδοχικών αραιώσεων (Καραγκούνη – Κύρτσου, Αμαλία Δ.: Μικροβιολογία).

Ένα χρήσιμο εργαλείο για αυτή τη μέθοδο είναι ο κρίκος εμβολιασμού μέσω του οποίου μεταφέρονται οι μικροοργανισμοί σε όλη την επιφάνεια του τρυβλίου (Εικόνα 5.3). Σύροντας τον κρίκο πάνω στην επιφάνεια του τρυβλίου διαγράφονται ελικοειδείς παράλληλες γραμμές χωρίς να καταστρέφεται η στερεοποιημένη λεία επιφάνεια του θρεπτικού υποστρώματος. Όπως φαίνεται στην εικόνα 5.4 χρησιμοποιείται όλη η επιφάνεια του τρυβλίου και το αποτέλεσμα είναι η αραίωση και ο διαχωρισμός των κυττάρων μεταξύ τους, τα οποία θα δώσουν στο καθένα μια αξενική αποικία.



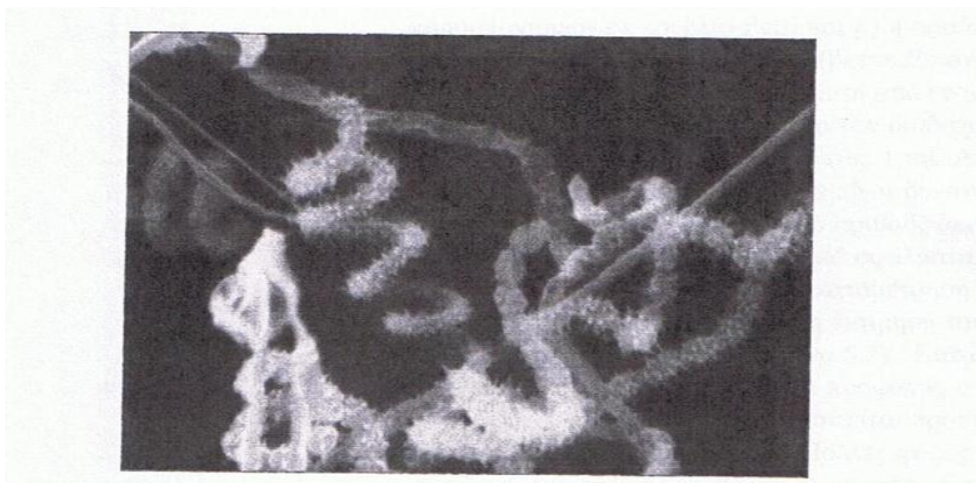
ΕΙΚΟΝΑ 5.3, Η χρήση του κρίκου εμβολιασμού (Καραγκούνη – Κύρτσου, Αμαλία Δ.: Μικροβιολογία).



ΕΙΚΟΝΑ 5.4, Μέθοδος παραλλήλων γραμμών. Κατά τον εμβολιασμό με κρίκο εμβολιασμού χρησιμοποιείται όλη η επιφάνεια του τρυβλίου και το αποτέλεσμα είναι η αραίωση και ο διαχωρισμός των κυττάρων μεταξύ τους, τα οποία θα δώσουν το καθένα μια αξενική καλλιέργεια (Καραγκούνη – Κύρτσου, Αμαλία Δ.: Μικροβιολογία).

- **Μορφολογία και αύξηση αποικιών**

Η ανάπτυξη των αποικιών πάνω σε στερεοποιημένο θρεπτικό άγαρ βοηθά τους μικροβιολόγους για τον προσδιορισμό και ταυτοποίηση των μικροοργανισμών διότι η μορφή των αποικιών είναι χαρακτηριστική για κάθε είδος. Όταν ένας μικρός πληθυσμός. Όταν ένας μικτός πληθυσμός αναπτυχθεί σε ένα τρυβλίο είναι δυνατόν να γίνει ένας εν μέρει προσδιορισμός, του κάθε μικροοργανισμού με βάση της συνολικής εμφάνισης και μορφής της αποικίας, η οποία έχει αναπτυχθεί στην καθαρή καλλιέργεια. Η μικροσκοπική τους όμως δομή εξαρτάται από τη διακριτική ικανότητα. Η δομή των μικροβιακών αποικιών εξετάζεται οπωσδήποτε και στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (ΗΜΣ), όπως φαίνεται στην εικόνα 5.8.



ΕΙΚΟΝΑ 5.8, Αέριες υφές και αλυσίδες σπορίων από αποικία Streptomyces sp όπως φαίνεται στο Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης (Καραγκούνη – Κύρτσου, Αμαλία Δ.: Μικροβιολογία).

Στη φύση οι περισσότεροι μικροοργανισμοί αναπτύσσουν τις αποικίες τους πάνω σε επιφάνειες. Ως εκ τούτου η κατανόηση της αύξησης των αποικιών είναι ουσιαστική για τη Μικροβιολογία Περιβάλλοντος. Τη ταχύτερη αύξηση τη συναντάμε στην περιφέρεια μιας αποικίας λόγω περίσσειας οξυγόνου και θρεπτικών υλικών. Στο κέντρο τα κύτταρα μεγαλώνουν πιο αργά και συγχρόνως παρατηρείται το φαινόμενο της αυτόλυσης των κυττάρων εξαιτίας της μεγάλης πυκνότητας, της δύσκολης διάχυσης θρεπτικών και της δημιουργίας τοξικών προϊόντων μεταβολισμού.

- **Εκτίμηση του Μικροβιακού Πληθυσμού**

Ο μικροβιακός πληθυσμός προσδιορίζεται ακολουθώντας τις αλλαγές του αριθμού των κυττάρων ή της συγκέντρωσης της βιομάζας η οποία εκφράζεται με την οπτική

πυκνότητα του εναιωρήματος της καλλιέργειας των μικροοργανισμών ή του ξηρού βάρους της βιομάζας ανά ml καλλιέργειας. Υπάρχουν πολλές τεχνικές για την καταμέτρηση του αριθμού των κυττάρων ή τον προσδιορισμό ανάλογα με το είδος του μικροοργανισμού.

- **Εκτίμηση του αριθμού βιώσιμων κυττάρων**

Σε πάρα πολλές περιπτώσεις, στη Μικροβιολογία, πρέπει να προσδιορισθεί ο αριθμός των βιώσιμων κυττάρων ενός πληθυσμού, ο οποίος καθορίζεται ως εκείνος ο αριθμός των κυττάρων τα οποία είναι ικανά να διπλασιαστούν και να δώσουν νέα θυγατρικά κύτταρα. Άρα πρέπει να προσδιοριστεί ο αριθμός των κυττάρων σ' ένα δείγμα, τα οποία είναι ικανά να σχηματίσουν αποικίες στην επιφάνεια στερεοποιημένου θρεπτικού υποστρώματος. Ως εκ τούτου, ο αριθμός των βιώσιμων κυττάρων λέγεται απλά καταμέτρηση των αποικιών επί τρυβλίου ή καταμέτρηση αποικιών. Πρέπει να σημειωθεί ότι είναι προϋπόθεση αυτής της μεθόδου κάθε κύτταρο να παράγει μία και μόνο αποικία. Δύο είναι οι μέθοδοι που επιτρέπουν την καταμέτρηση των βιώσιμων κυττάρων : α) η διασπορά των μικροοργανισμών σε τρυβλίο Petri και β) η αραίωση του εμβολίου με θρεπτικό υπόστρωμα σε τρυβλίο Petri. Και στις δύο περιπτώσεις το δείγμα προέρχεται από εναιώρημα μικροοργανισμών το οποίο έχει υποστεί τη διαδικασία των διαδοχικών αραιώσεων και είναι γνωστού όγκου συνήθως από 0,1 έως 1 ml. Απαιτείται λεία επιφάνεια στερεοποιημένου θρεπτικού για να είναι δυνατή η καταμέτρηση των παραγόμενων αποικιών των οποίων ο αριθμός δεν πρέπει να είναι μεγάλος ώστε να αποφεύγονται τα στατιστικά σφάλματα (η συνήθης πρακτική για αξιόπιστα αποτελέσματα είναι η καταμέτρηση 30 έως 300 αποικιών σε κάθε τρυβλίο). Συνεπώς προέχει η εκτίμηση του σωστού βαθμού αραιώσης του αρχικού δείγματος. Κατά την εφαρμογή της μεθόδου των βιώσιμων κυττάρων είναι προφανής ο κίνδυνος μεγάλου στατιστικού σφάλματος και γι' αυτό απαιτείται προετοιμασία πολλαπλών τρυβλίων σε κρίσιμες αραιώσεις. Πολλές φορές ο αριθμός των βιώσιμων κυττάρων εκφράζεται ως βιώσιμες μονάδες που έχουν την ικανότητα να σχηματίσουν αποικίες (Colony Forming Units = CFU). Παρ' όλα αυτά τα μειονεκτήματα η μέθοδος δίνει τα καλύτερα αποτελέσματα για τον αριθμό των βιώσιμων κυττάρων και είναι ευρέως διαδεδομένη στη βιομηχανία τροφίμων, γαλακτοκομικών προϊόντων, στην Ιατρική, στη Μικροβιολογία Υδάτινων Οικοσυστημάτων κ.α.

- **Επώαση σε κλιβάνους- Φύλαξη τρυβλίων σε ψυγείο**

Οι κλίβανοι σε ένα μικροβιολογικό εργαστήριο αποτελούν απαραίτητο όργανο, καθώς τα εκάστοτε τρυβλία προς ανάπτυξη μικροοργανισμών απαιτούν συγκεκριμένη θερμοκρασία και συγκεκριμένο χρόνο επώασης σε αυτήν σύμφωνα με το πρωτόκολλο εργασιών. Το ίδιο αναγκαία είναι και η φύλαξη των τρυβλίων με θρεπτικό υπόστρωμα στο ψυγείο όπου φυλάσσονται τα τελευταία με αναγραφόμενη την ημερομηνία παραγωγής και το είδος του θρεπτικού υποστρώματος που περιέχουν. Τα τρυβλία τοποθετούνται πάντα τοποθετημένα ανάποδα με σκοπό την αποφυγή του ανοίγματος τους και συνεπώς την επιμόλυνση τους κατά τη μεταφορά στον χώρο της ανάλυσης δειγμάτων, με εξαίρεση τα

τροβλία που φέρουν θρεπτικό υπόστρωμα για ζύμες και μούχλες, τα οποία πρέπει να τοποθετούνται στους κλιβάνους μη ανεστραμμένα (με τα καπάκια προς τα πάνω). Επιπλέον, στους κλιβάνους όπου η θερμοκρασία επώασης είναι μεγαλύτερη των 37 °C, συνιστάται η τοποθέτηση των τροβλίων σε καθαρές σακούλες, ώστε να αποφεύγεται η απώλεια υγρασίας από το θρεπτικό υπόστρωμα και η επακόλουθη αφυδάτωσή τους. Αξίζει να τονισθεί πως αν τα τροβλία με το θρεπτικό υπόστρωμα παραμείνουν στο ψυγείο για διάστημα μεγαλύτερο του ενός μήνα δεν είναι κατάλληλα για χρήση.

5.1.1 ΚΛΑΣΣΙΚΗ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ – ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΑ

ISO 6579:2000 Salmonella

Κατ' αρχήν είναι σημαντικό το δείγμα που πρόκειται να εξετασθεί να μην έχει υποστεί φθορά κατά την μεταφορά ή φύλαξή του και η ποσότητά του να είναι αντιπροσωπευτική, ήτοι τουλάχιστον 125g.

Παρακάτω παρατίθενται όλα όσα χρειάζονται για τον εν λόγω έλεγχο (ISO 11731: 1998) :

ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ

- Αυτόκαυστο με δυνατότητα λειτουργίας στους 121°C ± 3°C
- Επωαστικός κλίβανος 41,5°C
- Επωαστικός κλίβανος στους 37° C
- Υδατόλουτρο με δυνατότητα ρύθμισης στους 44 - 47° C
- Ρh-μετρο με δυνατότητα ακρίβειας μετρήσεων της τάξης των 0,1μονάδων
- Αποστειρωμένες φιάλες και φιαλίδια
- Αυτόματες μηχανικές πιπέττες
- Κρίκοι μίας χρήσεως
- Τροβλία πετρί
- Κύλινδροι μετρήσεως
- Δοκιμαστικοί σωλήνες
- Ομογενοποιητής Stomacher
- Σακούλες ομογενοποιητή αποστειρωμένες

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ-ΥΛΙΚΑ

Θρεπτικά υλικά για καλλιέργεια:

- i. Μη εκλεκτικό προ-εμπλουτιστικό θρεπτικό υλικό: Buffered Peptone Water (BPW)
- ii. Εκλεκτικά εμπλουτιστικά θρεπτικά υλικά:

- 1) Rappaport Vassiliadis medium with Soya (RVS broth)
- 2) Muller Kauffmann Tetrathionate/novobiocin broth (MKTTn broth)

iii. Στερεά εκλεκτικά θρεπτικά υλικά:

- 1) Xylose lysine deoxycholate agar (XLD agar),
- 2) Brilliant green agar (BGA),
- 3) Salmonella-Shigella agar (SS agar)

Υλικά επιβεβαίωσης:

- i. Nutrient agar
- ii. Triple Sugar/Iron agar (TSI agar)
- iii. Urea agar
- iv. Tryptone Water
- v. Api 20 E

Τα περισσότερα από τα θρεπτικά υλικά είναι έτοιμα θρεπτικά υλικά εμπορίου υπό μορφή σκόνης και παρασκευάζονται στο Εργαστήριο σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή όπως αναφέρονται στην συσκευασία. Η μεθοδολογία της ανάλυσης για την απομόνωση των Σαλμονελλών απαιτεί την εφαρμογή τεσσάρων διαδοχικών σταδίων ανάλυσης. Παρακάτω αναλύονται τα στάδια της διαδικασίας:

Προεμπλουτισμός

Σε αποστειρωμένη σακούλα ("BAG STOMACHER") με 225 ml Buffered peptone water (BPW), που έχει παραμείνει σε θερμοκρασία δωματίου για λίγο, προτίθενται άσηπτα 25 gr ή ml του προς εξέταση τροφίμου (αραίωση 1:10). Αρχικά γίνεται ομογενοποίηση στο stomacher και εν συνεχεία επώαση στους $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ για $18\text{ h} \pm 2\text{ h}$.

Εμπλουτισμός

Μετά την επώαση του δείγματος σε Buffered peptone water (BPW) ενοφθαλμίζεται:

- α) 0,1 ml καλλιέργηματος σε σωληνάριο με 10 ml RVS broth.

Ακολουθεί επώαση στους $41,5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ για $24\text{ h} \pm 3\text{ h}$

- β) 1 ml καλλιέργηματος σε σωληνάριο με 10 ml MKTTn broth.

Ακολουθεί επώαση στους $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ για $24\text{ h} \pm 3\text{ h}$.

Καλλιέργεια σε στερεά εκλεκτικά θρεπτικά υλικά:

- i. Μετά την επώαση, ενοφθαλμίζεται μια κρική από το ζωμό RVS σε ένα μεγάλο τρυβλίο (διαμέτρου 140mm) ή σε δύο μικρά (διαμέτρου 90-100mm) συνεχίζουμε με την ίδια κρική- του βασικού εκλεκτικού θρεπτικού υλικού XLD άγαρ και στη συνέχεια ενός από τα συμπληρωματικά: Brillant green άγαρ ή SS άγαρ.
- ii. Επώαση στους $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ για $24\text{ h} \pm 3\text{ h}$.

- iii. Μετά την επώαση ελέγχονται τα παραπάνω τρυβλία για την παρουσία τυπικών και άτυπων αποικιών Σαλμονέλλας.

Η ίδια διαδικασία ακολουθείται και για την καλλιέργεια που αναπτύχθηκε σε ΜΚΤΤη μετά από επώαση 24 ± 3 ωρών.

Ανάλογα με την μορφή των αποικιών διαπιστώνεται η ύπαρξη Σαλμονελλών στα θρεπτικά υλικά :

XLD: Οι τυπικές αποικίες Σαλμονέλλας στο XLD εμφανίζονται **ροζ** περιβαλλόμενες από ελαφρά διαφανή ζώνη κοκκινωπού χρώματος με **μαύρο** κέντρο.

Οι άτυπες αποικίες Σαλμονελλών εμφανίζονται:

- Σαλμονέλλες αρνητικές για την παραγωγή H_2S : ως ροζ αποικίες με σκούρο ροζ κέντρο (*S. paratyphi A*).

- Σαλμονέλλες θετικές στη ζύμωση της λακτόζης: ως κίτρινες αποικίες με ή χωρίς μαύρο χρώμα (*Salmonella arizona*).

B.G.A.: ροζ αποικίες με ελαφρά κόκκινη άλω.

SS άγαρ: άχρωμες αποικίες με (παραγωγή H_2S) ή χωρίς μαύρο κέντρο (Σαλμονέλλες αρνητικές στη δοκιμή για την παραγωγή H_2S : *S. paratyphi A*).

Απομόνωση ύποπτων αποικιών

Μετά την επώαση από τα παραπάνω υλικά, μεταφέρονται οι ύποπτες αποικίες (τουλάχιστον μία από κάθε εκλεκτικό θρεπτικό υλικό κι αν αυτή αποδειχθεί αρνητική, εξετάζονται άλλες 4) σε Nutrient agar προκειμένου να προκύψουν καλά απομονωμένες αποικίες για να γίνει στη συνέχεια η ταυτοποίηση με βιοχημικές και ορολογικές δοκιμασίες. Ακολουθεί επώαση στους $37^\circ C \pm 1^\circ C$ για $24 h \pm 3 h$.

Το εργαστήριο κυρίως χρησιμοποιεί τη σειρά βιοχημικών δοκιμών API 20E που περιλαμβάνει τις άνωθεν μεμονωμένες δοκιμές για τη τελική ταυτοποίηση μίας ύποπτης αποικίας για Σαλμονέλλα και η ερμηνεία γίνεται βάσει των οδηγιών του κατασκευαστή.

ISO 11290-1/97 ISO 11290-2/97 Listeria

Η μέθοδος αυτή αφορά την οριζόντια ανίχνευση της *Listeria monocytogenes* σε όλα τα τρόφιμα που προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση και στις ζωοτροφές. Είναι σημαντικό το δείγμα να είναι πραγματικά αντιπροσωπευτικό και να μην υποστεί φθορά κατά την μεταφορά ή φύλαξή του. Για την εξέταση είναι συνήθως απαραίτητα 25g τροφίμου. Το πλάνο δειγματοληψίας και τα επιτρεπτά όρια ορίζονται σύμφωνα με τον Κανονισμό 1441/2007. Παρακάτω δίνονται αναλυτικά όσα χρειάζονται για την εφαρμογή του πρωτοκόλλου (ISO 11290-1:1996(E)) (ISO 11290-1:1996/Amd 1:2004) (ISO 7218:2007) :

ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ

- Κλίβανος ξηρής αποστείρωσης
- Αυτόκαυστο με δυνατότητα λειτουργίας στους $121^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$
- Επωαστικός κλίβανος 25°C
- Επωαστικός κλίβανος 30°C
- Επωαστικός κλίβανος 37°C
- Υδατόλουτρο με δυνατότητα ρύθμισης στους $47 \pm 2^{\circ}\text{C}$
- ΡΗ-μετρο με δυνατότητα ακρίβειας μετρήσεων της τάξης των 0,1 μονάδων
- Αποστειρωμένες φιάλες και φιαλίδια
- Ορολογικές πιπέττες
- Αυτόματες μηχανικές πιπέττες
- Κρίκοι μίας χρήσεως
- Τρυβλία πετρί
- Κύλινδροι μετρήσεως
- Δοκιμαστικοί σωλήνες
- Μικροσκόπιο, αντικειμενοφόρες πλάκες, καλυπτρίδες
- Ομογενοποιητής Stomacher.
- Σακούλες ομογενοποιητή αποστειρωμένες

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ-ΥΛΙΚΑ

- Πρώτος εμπλουτισμός σε εκλεκτικό υγρό θρεπτικό υλικό:
Half Fraser (Fraser με μειωμένη συγκέντρωση εκλεκτικών παραγόντων)
- Δεύτερος εμπλουτισμός σε εκλεκτικό θρεπτικό υλικό:
Fraser broth (Fraser με πλήρη συγκέντρωση εκλεκτικών παραγόντων)
- Πρώτο Εκλεκτικό στερεό υπόστρωμα:
Agar Listeria κατά Ottaviani και Agosti (ALOA)
- Δεύτερο εκλεκτικό στερεό υπόστρωμα:
Oxford Agar
- Tryptone Soya Yeast Extract Agar (TSYEA)
TSYEB άγαρ
- Αιματούχο Agar προβάτου
- API Listeria Kit
- Διάλυμα υπεροξειδίου του υδρογόνου 3% (m/m) για δοκιμή καταλάσης
- Χρωστικές για Gram

Τα περισσότερα από τα θρεπτικά υλικά είναι έτοιμα θρεπτικά υλικά εμπορίου υπό μορφή σκόνης και παρασκευάζονται στο Εργαστήριο σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή όπως αναφέρονται στην συσκευασία.

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

Η μεθοδολογία ανάλυσης περιλαμβάνει τα παρακάτω στάδια:

Προετοιμασία δείγματος και αρχική αραιώση

Γενικά, για την προετοιμασία της αρχικής αραιώσης, προστίθεται μια ποσότητα x εξεταζόμενου δείγματος σε 9x ml ή g Half Fraser ώστε να επιτευχθεί αναλογία 1/10. Συγκεκριμένα στα 25 g τροφίμου προστίθενται 225g Half Fraser.

Πρώτος εμπλουτισμός

Επώαση του αρχικού εναιωρήματος (αραίωση 1/10) σε θερμοκρασία 30°C για 24±2h, με πιθανότητα να προκύψει μαύρος χρωματισμός κατά τη διάρκεια της επώασης.

Δεύτερος εμπλουτισμός

Μεταφορά 0,1ml της καλλιέργειας που προέκυψε από το προηγούμενο στάδιο σε σωληνάριο Falcon που περιέχει 10ml Fraser broth. Ακολουθεί επώαση στους 37°C για 48h±2h.

Καλλιέργεια και ταυτοποίηση

Αρχικά, μετά την επώαση στους 30°C για 24±2h, ενοφθαλμίζεται από μια κρική από το πρώτο υλικό εμπλουτισμού (Half fraser) στο ALOA και το Oxford agar. Στη συνέχεια, γίνεται επανάληψη της διαδικασίας ενοφθαλμίζοντας από μια κρική από το δεύτερο υλικό εμπλουτισμού (Fraser broth) που επώαστηκε στους 37°C για 48h±2h στο ALOA και το Oxford agar. Ακολουθεί αναστροφή των τρυβλίων και τοποθέτηση σε επωαστικό κλίβανο στους 37° C (Η επώαση του Oxford agar στους 30° C είναι κατάλληλη μόνο για ελαφρώς μολυσμένα τρόφιμα). Μετά από επώαση για 24±3 h και για επιπλέον των 24±3h εάν χρειαστεί (εάν η ανάπτυξη δεν είναι έντονη ή δεν παρατηρούνται αποικίες μετά την επώαση των 24h), ελέγχονται τα παραπάνω τρυβλία για την παρουσία ύποπτων αποικιών της *Listeria spp.*

Μορφολογία αποικιών

Η μορφή των αποικιών που αναπτύσσονται στα θρεπτικά υποστρώματα:

ALOΑ: Οι τυπικές αποικίες *Listeria monocytogenes* εμφανίζονται σαν πράσινες – μπλε αποικίες περιβαλλόμενες από ζώνη οπαλιοειδή. Εάν η ανάπτυξη είναι ελαφρά ή δεν υπάρχουν αποικίες ή δεν υπάρχουν τυπικές αποικίες τότε επαναλαμβάνεται η επώαση για άλλες 24 h ± 3 h.

Εντούτοις, αξίζει να σημειωθεί ότι μερικά στελέχη *Listeria monocytogenes* παρουσιάζουν πολύ ασθενή άλω ή καθόλου σε περιπτώσεις στρες, ειδικά οξειδωτικού στρες. Επίσης κάποιες *L. monocytogenes* χαρακτηρίζονται από αργή PIPLC (phosphatidyl inositol

phospholipase C) δραστηριότητα. Έτσι ανιχνεύονται όταν ο συνολικός χρόνος επώασης τους είναι πάνω από 4 ημέρες λόγω χάρη. Μερικά από αυτά τα είδη μπορεί να είναι παθογόνα.

Oxford: Οι τυπικές αποικίες της *Listeria* spp. εμφανίζονται μετά από επώαση 24 h σαν μικρές αποικίες διαμέτρου 1 mm περίπου, χρώματος γκρι, περιβαλλόμενες από μαύρη άλω, μετά από 48 h επώαση εμφανίζονται με πιο σκοτεινό (πρασινίζον) χρώμα με διάμετρο 2 mm περιβαλλόμενες με μαύρη άλω και βυθιζόμενο κέντρο.

Επιβεβαίωση

Από κάθε ένα τρυβλίο, εξετάζονται 5 ύποπτες αποικίες *Listeria* spp. Εάν το τρυβλίο έχει λιγότερες από 5 παίρνουμε όλες τις τυπικές ή ύποπτες αποικίες για επιβεβαίωση. Ενοφθαλμίζονται οι επιλεγμένες αποικίες σε τρυβλία με TSYEA άγαρ (tryptone soya yeast extract άγαρ) των οποίων η επιφάνεια έχει προηγουμένως στεγνωθεί, με τρόπο ώστε να αναπτυχθούν μεμονωμένες αποικίες. Γίνεται τοποθέτηση των τρυβλίων σε επωαστικό κλίβανο στους 37°C για 18h με 24h, ή μέχρις ότου η ανάπτυξη αποικιών θεωρηθεί ικανοποιητική. Οι τυπικές αποικίες που αναπτύσσονται είναι 1 με 2 mm σε διάμετρο, κυρτές, άχρωμες, και αδιαφανείς με πλήρη χείλη (ένα ακέραιο χείλος). Αν οι αποικίες δεν είναι σαφώς διαχωρισμένες, γίνεται εκλογή μιας τυπικής αποικίας *Listeria monocytogenes* ενός άλλου τρυβλίου με TSYEA.

Επιβεβαίωση των αποικιών από το TSYEA με τις παρακάτω δοκιμές:

1. Δοκιμή καταλάσης με hydroxide peroxide solution. Ανακατεύουμε πάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα μια καθαρή αποικία με μια σταγόνα διαλύματος. Ο άμεσος σχηματισμός φυσαλίδων αερίου δείχνει θετική αντίδραση (*Listeria* spp.: Καταλάση +).
2. Χρώση Gram (*Listeria* spp.: Gram +, λεπτοί, κοντοί βάκιλλοι).
3. Δοκιμή εκδήλωσης κινητικότητας (προαιρετική)

Πιο συγκεκριμένα η δοκιμασία κινητικότητας είναι η εξής: αρχικά με την χρήση μας ακίδας ενοφθαλμισμού, ενοφθαλμίζεται στο άγαρ κινητικότητας (motility agar) μία καλλιέργεια που προέρχεται από τυπική αποικία σε TSYEA άγαρ. Ακολουθεί επώαση για 48 h σε επωαστικό κλίβανο, στους 25°C και στη συνέχεια γίνεται εξέταση για ανάπτυξη *Listeria monocytogenes* γύρω από το σημείο ενοφθαλμισμού. Τα είδη του γένους *Listeria monocytogenes* είναι κινητά, εμφανίζοντας τη τυπική εικόνα ανάπτυξης υπό μορφή ομπρέλας. Αν η ανάπτυξη δεν είναι επαρκής, γίνεται επώαση επιπλέον 5 ημέρες και παρατηρείται ξανά το σημείο ενοφθαλμισμού.

4. Δοκιμή αιμόλυσης (*Listeria monocytogenes*: β-αιμόλυση).

Μετά από επώαση σε αιματούχο άγαρ προβάτου στους 37°C για 24 h ± 3h γίνεται εξέταση των εξεταζόμενων στελεχών και των στελεχών ελέγχου. Η *L. monocytogenes* παρουσιάζει **στενή, διαυγή, σαφή ζώνη αιμόλυσης** (β-αιμόλυση). Η *L. innocua* **δεν εμφανίζει ζώνη**

γύρω από το σημείο ενοφθαλμισμού. (Η *L. seeligeri* εμφανίζει μια ασθενή ζώνη αιμόλυσης. Η *L. ivanovii* συνήθως παρουσιάζει ευρύτατες, σαφώς περιγραμμένες ζώνες β-αιμόλυσης). Με σκοπό τη διαπίστωση της μορφής των αποικιών γίνεται εξέταση των τρυβλίων σε άπλετο φωτισμό για να γίνει σύγκριση των εξεταζόμενων καλλιέργειών με τις καλλιέργειες μάρτυρες.

5. Βιοχημική επιβεβαίωση

Η ταυτοποίηση επιτυγχάνεται με σειρά βιοχημικών αντιδράσεων: API Listeria Kit.

ISO NF 16649- 1 16649-2 E. coli, Coliforms

Η μέθοδος αυτή αποτελεί μέρος του ISO 16649 και αφορά στην καταμέτρηση των θετικών στη β-γλυκουρονιδάση *Escherichia coli*, σε προϊόντα που προορίζονται για κατανάλωση από τον άνθρωπο ή σε ζωοτροφές. Χρησιμοποιείται μία οριζόντια μέθοδος απαρίθμησης μετά την απομόνωση με την χρήση μεμβράνης και την επώαση στους 44 ° C σε ένα στερεό μέσο που περιέχει ένα χρωμογόνο συστατικό για την ανίχνευση του ενζύμου β-γλυκουρονιδάσης. Παρακάτω δίνονται όλες οι λεπτομέρειες εφαρμογής του πρωτοκόλλου (ISO 16649) :

ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ

- Κλίβανοι ξηρής και υγρής αποστείρωσης
- Επωαστικοί κλίβανοι θερμοκρασίας 44 +/- 1 °C
- Τρυβλία Petri διαμέτρου 90 mm
- Σιφώνια ολικής διανομής, ονομαστικής χωρητικότητας 1 ml
- Υδατόλουτρο θερμοκρασίας 44-47 °C (για την συντήρηση των στερεών υποστρωμάτων)
- pH-μετρο, με ακρίβεια έως +/- 0,1 μονάδες pH στους 25 °C
- Φιάλες χωρητικότητας 150 – 500 ml, ή άλλης κατάλληλης χωρητικότητας

ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

Αρχικά παρασκευάζεται διπλή σειρά τρυβλίων. Από κάθε αραιώση του τροφίμου (και από το αναραιώτο τρόφιμο), ενοφθαλμίζονται με σιφώνιο ολικής διανομής, 2 τρυβλία (ένα κάθε σειράς) με 1 ml ανά τρυβλίο, ως εξής:

- εάν το τρόφιμο είναι υγρό, με 1 ml τροφίμου, άλλως με 1 ml της πρώτης δεκαδικής του αραιώσης

- από κάθε επόμενη δεκαδική αραιώση του τροφίμου, ποσότητα 1 ml ενοφθαλμίζεται με νέο σιφώνιο σε ένα τρυβλίο κάθε σειράς.

Στη συνέχεια, ακολουθεί η ενσωμάτωση, η οποία γίνεται με 15 ml υποστρώματος TBX 44-47°C. Εάν η φάση ανάνηψης των μικροοργανισμών θεωρηθεί απαραίτητη, μετά την ενσωμάτωση τα τρυβλία επωάζονται σε θερμοκρασία 37°C επί 4 ώρες. Τα τρυβλία αναστρέφονται και επωάζονται στους 44°C επί 18-24h. Τέλος, ακολουθεί η καταμέτρηση των αποικιών και σημειώνεται ότι τα τρυβλία που περιέχουν περισσότερες από 150 κυανές αποικίες ή περισσότερες από 300 τυπικές και μη αποικίες.

5.1.2 ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ MALDI – TOF

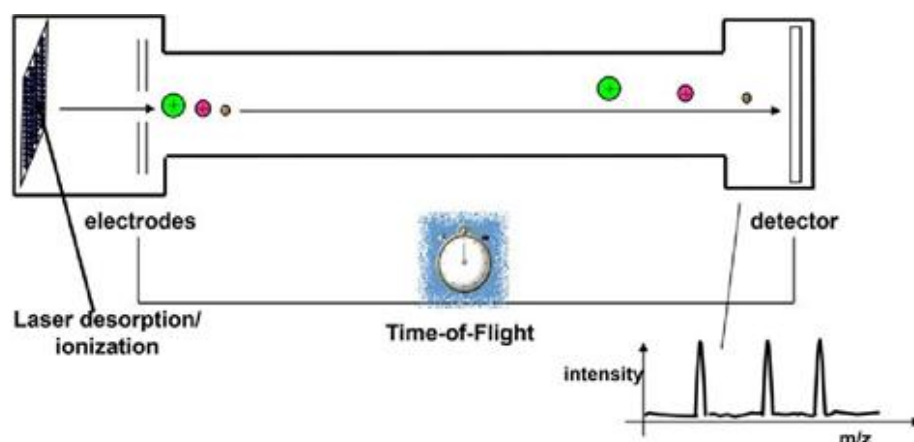
Η συγκεκριμένη τεχνική αποτελεί μια μέθοδο για την ταχεία αναγνώριση μικροοργανισμών η οποία εκμεταλλεύεται την πληθώρα των πληροφοριών που περιέχονται στο προκαρυωτικό πρωτέωμα. Η αρχή της εν λόγω μεθόδου βασίζεται στον καθορισμό μαζών ενός συνόλου ιόντων πεπτιδίων που προέρχονται από άθικτα ή επεξεργασμένα κύτταρα με την χρήση του φασματομέτρου μάζας MALDI-TOF. Η βάση της μεθόδου φασματομετρίας μάζας βασίζεται στη συσχέτιση του κάθε ιοντισμένου πεπτιδικού θραύσματος με μία πρωτεΐνη καθώς και με την οικογένεια στην οποία ανήκει η πρωτεΐνη. Η συσχέτιση επιτυγχάνεται μέσω της αναζήτησης μιας προσβάσιμης πρωτεϊνικής βάσης δεδομένων που βρίσκεται στο διαδίκτυο. Με τη συλλογή των λιστών για όλα τα ιόντα και την κατάταξη των οργανισμών που απαντούν στα αντιστοιχισμένα ιόντα οδηγούμαστε στην ταυτοποίηση του μικροοργανισμού. Η μέθοδος αυτή εφαρμόστηκε επιτυχώς για τους μικροοργανισμούς *B. subtilis* και *E. coli*, δύο οργανισμοί με πλήρη αλληλουχία γονιδιωμάτων. Απαραίτητες διαδικασίες προετοιμασίας για τον έλεγχο των δειγμάτων ήταν η προετοιμασία της μήτρας του MALDI, η επιβεβαίωση της αναπαραγωγιμότητας των φασμάτων, το εύρος μάζας ελέγχου, οι προσμίξεις και η ακρίβεια των μετρήσεων.

Πιο ειδικά, στη μέθοδο αυτή, για να δημιουργηθεί η απαραίτητη αέρια φάση, τα πρωτονιομένα βιομόρια και η μεγάλη ποσότητα υποστρώματος (μήτρας) συνκρυσταλλώνονται με μόρια του αναλύτη πάνω σε μεταλλική επιφάνεια. Στη συνέχεια οι κρύσταλλοι ακτινοβολούνται από παλμό laser, συνήθως αζώτου με μήκος κύματος 337 nm. Το υπόστρωμα είναι συνήθως μικρό οργανικό μόριο που εμφανίζει απορρόφηση στο μήκος κύματος του laser που χρησιμοποιείται. Τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα υποστρώματα είναι το α-κυάνο-4-κινναμινικό οξύ (HCCA), όταν αναλύονται μικρά μόρια (π.χ πεπτίδια) και το διυδροξυβενζοϊκό οξύ (DHB), για την περίπτωση μεγάλων μορίων (π.χ πρωτεΐνες). Τα υποστρώματα διαφέρουν ως προς την στην ενέργεια που μεταφέρουν στο βιομόριο κατά την απόπτωση και τον ιοντισμό και έτσι καθορίζουν το βαθμό θραυσματοποίησης του αναλύτη. Η διαδικασία ιοντισμού που επιτυγχάνεται στο MALDI παραμένει ως ένα μεγάλο βαθμό ακόμα άγνωστη, ενώ η ένταση του σήματος που ανιχνεύεται, εξαρτάται λόγω χάρη για την περίπτωση ανάλυσης πεπτιδίων, από την ποσότητα των πεπτιδίων στον κρύσταλλο, τη δυνατότητα του βιομορίου να προσλάβει ή να δώσει ένα πρωτόνιο κατά τη διαδικασία της απόπτωσης, από τις χημικές ιδιότητες των πεπτιδίων καθώς και από ένα μεγάλο αριθμό

άλλων παραγόντων γνωστών και άγνωστων. Ως εκ τούτου, κρίνεται δύσκολη η αντιστοιχία της κορυφής του πεπτιδίου με την ποσότητα του δείγματος που αναλύεται (Zenobi R, Knochenmuss R., 1998) (Seng P. et al) (La Scola, B., and Raoult, D., 2009)

Όσον αφορά στη **μήτρα**, αποτελείται από κρυσταλλικά μόρια α-κυανο-4-υδροξυκιναμινικού οξέος τα οποία διαλύονται σε 50%ACN και 0,1%TFA. Οι ενώσεις της μήτρας είναι αρκετά χαμηλού μοριακού βάρους έτσι ώστε να είναι εύκολη η εξάτμιση, αλλά είναι αρκετά μεγάλες με χαμηλή τάση ατμών έτσι ώστε να μην εξατμίζονται κατά τη διάρκεια προετοιμασίας του δείγματος ή κατά την τοποθέτηση στο φασματόμετρο. Πέραν των άλλων, είναι όξινες και γι' αυτό αποτελούν πηγή πρωτονίων, ενθαρρύνοντας τον ιοντισμό της ουσίας και παρουσιάζουν ισχυρή οπτική απορρόφηση σε φάσματα UV και IR με αποτέλεσμα να είναι εφικτή η γρήγορη και αποτελεσματική απορρόφηση της ακτινοβολίας λέιζερ από τη μήτρα (Stevenson et al, 2010a) (Foster, A. G., 2013) (Tadros, M., and Petrich, A., 2013).

Ο πιο διαδεδομένος τύπος φασματομέτρου μάζας που χρησιμοποιείται είναι το MALDI TOF (time of flight), κυρίως λόγω του μεγάλου εύρους μάζας του (Stevenson, L. G. et al 2010b). Η διαδικασία μέτρησης TOF ταιριάζει ιδανικά με τη διαδικασία ιοντισμού του MALDI εφόσον το παλμικό λέιζερ παίρνει ατομικά 'shots' αντί να λειτουργεί εν συνεχεία. Το όργανο MALDI-TOF είναι εξοπλισμένο με 'καθρέφτη ιόντων', εκτρέποντας τα ιόντα που διαθέτουν ηλεκτρικό πεδίο με αποτέλεσμα, το διπλασιασμό του μονοπατιού πτήσης των ιόντων και την αύξηση της ανάλυσης, όπως φαίνεται στην εικόνα 5.1.2.



ΕΙΚΟΝΑ 5.1.2, Απεικονίζεται ο 'καθρέφτης ιόντων'(Lottspeich F et al. *Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg 1998*).

Τα χαρακτηριστικά πρότυπα πρωτεϊνικής έκφρασης των μικροοργανισμών, όπως βακτήρια, μύκητες και ζυμομύκητες, μπορούν να αναλυθούν με το MALDI Biotyper από την Bruker Daltonics (εικόνα 5.1.3) (Theel, E. S. et al, 2012) (Cassagne et al, 2014). Η αξιοσημείωτη επαναληψιμότητα του MALDI Biotyper βασίζεται στη μέτρηση πεπτιδίων που ανήκουν κυρίως σε πρωτεΐνες με υψηλή ενδοκυτταρική συγκέντρωση, όπως οι ριβοσωμικές πρωτεΐνες που αποτελούν μέρος του κυτταρικού μηχανισμού μεταγραφής και είναι παρούσες σε όλα τα ζωντανά κύτταρα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τα πρωτεϊνικά

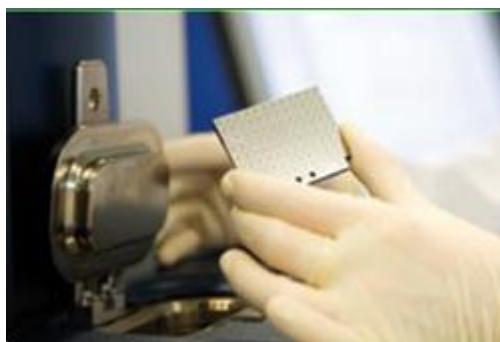
αποτυπώματα του MALDI Biotyper να μην επηρεάζονται σημαντικά από την εκάστοτε μεταβολή σε περιβαλλοντικές συνθήκες και σε συνθήκες ανάπτυξης. Το συγκεκριμένο γεγονός αποτελεί ένα αυστηρό πλεονέκτημα της νέας αυτής μικροβιολογικής μεθόδου, εφόσον επιτρέπει τη δημιουργία εύρωστων 'βιβλιοθηκών' των μικροοργανισμών του MALDI Biotyper. Το MALDI Biotyper αποτελεί ένα άριστο συμπλήρωμα των κλασικών μικροβιολογικών τεχνικών ταυτοποίησης και ταξινόμησης. Οι εφαρμογές του MALDI BioTyper περιλαμβάνουν ταξινομική έρευνα για τους μικροοργανισμούς, έρευνα μολυσματικών ασθενειών, καθώς και ανίχνευση και ταυτοποίηση μικροοργανισμών σε περιβαλλοντική ανάλυση, ασφάλεια των τροφίμων και ποιότητας του νερού.



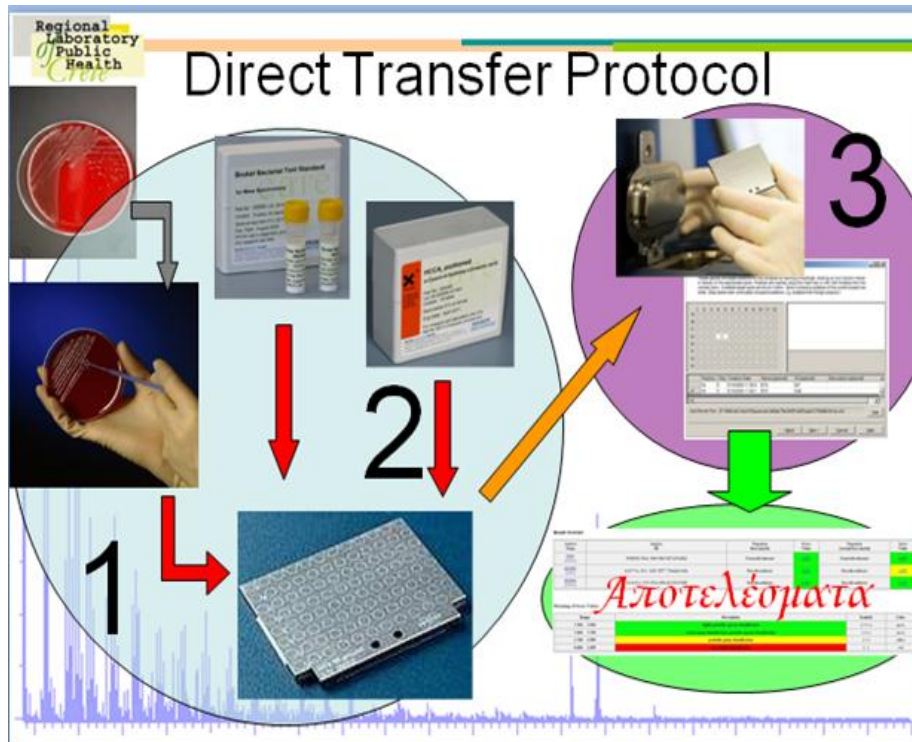
ΕΙΚΟΝΑ 5.1.3, Το MALDI-BIOTYPER του εργαστηρίου.

Με την χρήση των τυποποιημένων μεθόδων MALDI BioTyper, μετά από την overnight καλλιέργεια ενός οργανισμού, το υλικό των κυττάρων μπορεί να μεταφερθεί άμεσα στη μεταλλική πλάκα-στόχο (εικόνα 5.1.4) του MALDI-TOF (Direct Transfer Protocol) ή μπορεί να εξετασθεί μετά από μια ταχεία οργανική διαδικασία εκχύλισης (Formic Acid Protocol). Το πρωτόκολλο απευθείας μεταφοράς του MALDI-TOF περιλαμβάνει τα εξής βήματα, τα οποία φαίνονται στην εικόνα 5.1.5 :

- Απευθείας τοποθέτηση υλικού απομονωμένου από την ύποπτη αποικία στην πλάκα
- Τοποθέτηση 1μl matrix solution



ΕΙΚΟΝΑ 5.1.4, Στην εικόνα διαφαίνεται η πλάκα τοποθέτησης του υλικού προς ταυτοποίηση.



ΕΙΚΟΝΑ 5.1.5, Πρωτόκολλο απευθείας μεταφοράς της ύποπτης αποικίας στο MALDI-TOF.

Σε αυτό το σημείο αξίζει να αναφερθεί πως όλες οι αποικίες οι οποίες αναπτύσσονται στο τρυβλίο θα πρέπει να είναι όμοιες έτσι ώστε να μπορεί ο εκάστοτε αναλυτής να επιλέξει οποιαδήποτε και να τη μεταφέρει στην πλάκα. Σε διαφορετική περίπτωση θα πρέπει να είναι σε θέση να διαπιστώσει εάν πρόκειται για επιμόλυνση ή εάν έχουν αναπτυχθεί και άλλοι μικροοργανισμοί στο θρεπτικό υλικό.

Σε περιπτώσεις όπου υπάρχουν αμφισβητούμενα αποτελέσματα ή ο μικροοργανισμός είναι δύσκολο να διαρραγεί και να απελευθερώσει πεπτίδια η εξαγωγή του πρωτεόματος γίνεται με την εφαρμογή του πρωτοκόλλου του φορμικού οξέος όπως περιγράφεται παρακάτω:

Formic Acid Extraction:

- Μεταφέρεται μικρή ποσότητα κυττάρων απ' το δείγμα σε erpendorf και δημιουργείται ένα ομοιογενές εναιώρημα με πιπετάρισμα πάνω και κάτω.
- Προστίθενται 900μl EtOH και ακολουθεί γρήγορη ανάδευση για τουλάχιστον 1min.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 2 min στις 13000 rpm και απομάκρυνση του υπερκειμένου.
- Γίνεται επανάληψη του προηγούμενου βήματος έτσι ώστε να απομακρυνθεί πλήρως η αιθανόλη.

- Μεταφέρονται 30μl H₂O και 70μl 100% FA σε eppendorf και το περιεχόμενό του αναμιγνύεται ισχυρά. Προκύπτει υδατικό μίγμα 70% FA.
- Προστίθενται 50μl υδατικού διαλύματος 70% FA στο ίζημα και το προκύπτον μίγμα αναμιγνύεται ισχυρά με πιπετάρισμα πάνω και κάτω και ακολουθεί γρήγορη ανάδευση.
- Προστίθενται 50μl ACN και το διάλυμα πιπετάρεται πάνω κάτω.
- Το διάλυμα φυγοκεντρείται για 2min στις 13000 rpm. Λαμβάνεται από το υπερκείμενο του διαλύματος που προκύπτει 1μl το οποίο τοποθετείται πάνω στη μεταλλική πλάκα του MALDI.
- Αφού στεγνώσει προστίθεται 1μl HCCA matrix solution.
- Αφού στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου, τοποθετείται στη θέση του MALDI-TOF και είναι έτοιμο για ταυτοποίηση.

6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

6.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΛΑΣΣΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

Για τις ανάγκες της παρούσας έρευνας ελήφθησαν και υποβλήθηκαν σε μικροβιολογικό έλεγχο, σύμφωνα με τα όσα έχουν αναφερθεί παραπάνω, 400 δείγματα τροφίμων. Τα δείγματα τροφίμων αναφέρονται όλα σε αλφαβητική σειρά στον ακόλουθο πίνακα (Πίνακας 6.1.1).

A/A	Είδος Δείγματος	A/A	Είδος Δείγματος
1-2	Milkshake σοκολάτα	197-204	Μαρούλι
3-6	Αγγουρι	205-206	Μελομακάρονα
7-10	Αγγουροντομάτα	207-210	Μπέικον
11-12	Άνηθος απολυμασμένος	211-224	Μπιφτέκι
13-20	Ανθότυρος	225-226	Μύδια σαλάτα
21-26	Αντίδια	227-244	Μυζήθρα
27-28	Βάση σαλάτας με τηγανητό κοτόπουλο	245-256	Μυζήθρα σε ζύμη
29-30	Γαλλική σος	257-294	Ξυνομυζήθρα
31-32	Γαρίδες Βραστές με κονιάκ	295-302	Παγωτό
33-36	Γραβιέρα	303-312	Πάστα (γλυκό)
37-38	Ζυμαρικά με ζαμπόν-τυρί	313-320	Πιπεριά
39-118	Καλιτσούνι	321-322	Ντομάτα
119-128	Καλιτσούνι μυζήθρας τηγανιού	323-326	Ραπανάκι
129-130	Καρότο απολυμασμένο	327-332	Ρύζι (σκέτο ή σύνθετο)
131-132	Καρπούζι κομμένο	333-350	Σαλάτες (απλές & σύνθετες)
133-136	Κιμάς Νωπός	351-372	Σαντουίτς (απλό & σύνθετο)
137-146	Κολοκυθοκεφτέδες (χωρίς τυριά)	373-374	Σνίτσελ ωμό
147-156	Κολοκυθοκεφτέδες γεμιστοί	375-376	Σοκολατίνα
157-170	Κοτόπουλο	377-378	Στήθος κοτόπουλο
171-174	Κρεμμύδι Φρέσκο	379-380	Τόστ
175-180	Κώκ	381-392	Τυρί (κομμένο, τριμμένο, σε έδεσμα)
181-182	Λαχανοσαλάτα	393-394	Χάμπουργκερ με μπέικον και μπιφτέκι
183-184	Μαϊντανός απολυμασμένος άκοπος	395-398	Χοιρινή ωμοπλάτη
185-194	Μακαρόνια	399-400	Χοιρινό με κρούστα μπαχαρικών
195-196	Μανούρι		

Πίνακας 6.1.1: Αναγράφονται τα είδη των τροφίμων, τα οποία ελέγχθηκαν στα πλαίσια της πτυχιακής εργασίας, κατά αλφαβητική κατάταξη και αρίθμηση.

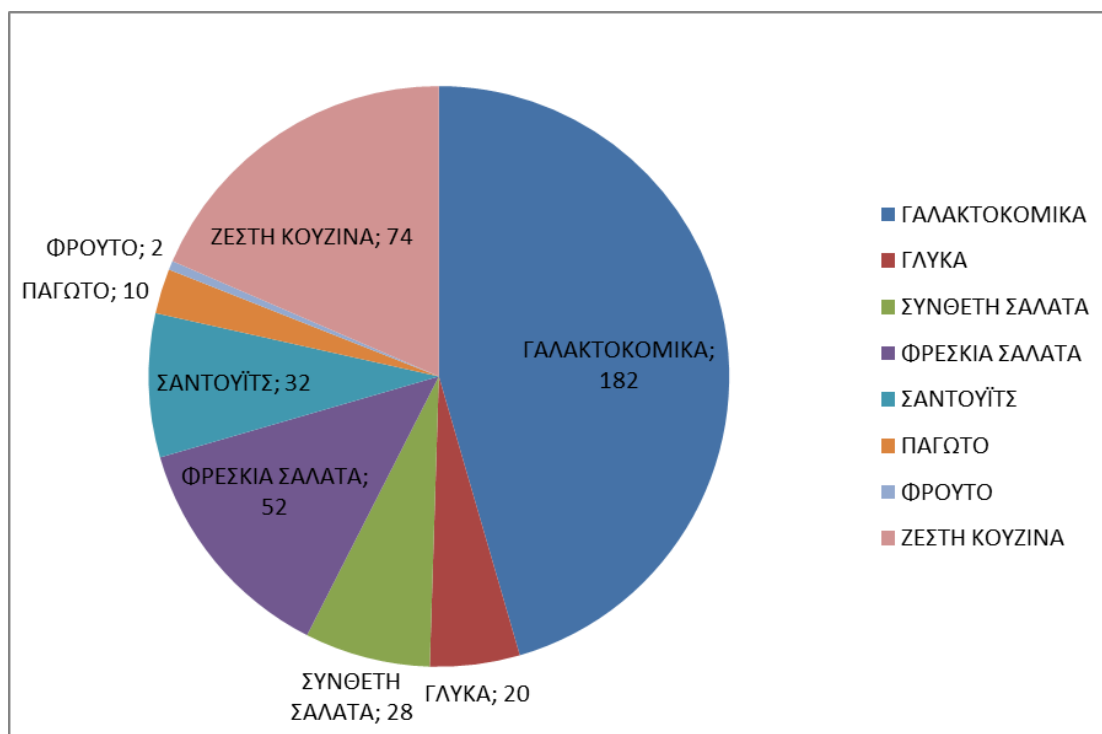
Για κάθε είδος τροφίμου πραγματοποιούνταν μικροβιολογική ανάλυση σε 8 μικροβιολογικές παραμέτρους οι οποίες προσαρμόζονταν και διαφοροποιούνταν ανάλογα με την κατηγορία τροφίμου. Σε γενικές γραμμές ο μέσος αριθμός μικροβιολογικών αναλύσεων που πραγματοποιήθηκαν ανέρχεται κατά προσέγγιση στις **3.200** με κάθε ανάλυση να απαιτεί ποικίλο αριθμό αντιδραστηρίων και θρεπτικών υποστρωμάτων όπως αναφέρεται και στις ήδη περιγεγραμμένες ISO μεθοδολογίες.

Τα επιλεγμένα τρόφιμα διαχωρίστηκαν σε ευρύτερες επιμέρους κατηγορίες βάσει των οποίων ελέγχονταν διαφορετικές μικροβιολογικές παράμετροι. Βασικό παράδειγμα αποτελεί η επιλογή μεταξύ δυο μικροβιολογικών παραμέτρων, της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας (ΟΜΧ) και τον έλεγχο των οξυγαλακτικών μικροβίων. Η παράμετρος ελέγχου των οξυγαλακτικών μικροβίων ελεγχόταν αντί της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας (ΟΜΧ) κυρίως σε εκείνες τις περιπτώσεις που αφορούσαν είτε γαλακτοκομικά προϊόντα είτε παρασκευάσματα που περιείχαν γαλακτοκομικά προϊόντα. Συγκεκριμένα μπορούμε να αναφέρουμε ότι εάν ελέγχεται η ΟΜΧ μόνο τότε ο πληθυσμός που θα καταμετρούνταν συμπεριλαμβάνει και τα οξυγαλακτικά, όμως είναι δύσκολη η καταμέτρηση τους καθώς με την μεθοδολογία της ενσωμάτωσης οι αποικίες που δημιουργούν είναι πολύ μικρές και σχετικά δυσδιάκριτες. Επειδή σε συγκεκριμένες κατηγορίες τροφίμων είναι ιδιαίτερα σημαντική η δράση των οξυγαλακτικών μικροοργανισμών, για αυτό επιλεγόταν να ελεγχθεί απευθείας η συγκεκριμένη παράμετρος με διαφορετικό αξενικό μέσο.

Ωστόσο, στο σημείο αυτό αξίζει να αναφερθεί ο Κανονισμός (ΕΚ) αριθ.2073/2005 ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ της 15^{ης} Νοεμβρίου 2005, καθώς και οι ερμηνευτικές κατευθυντήριες γραμμές του, όπως αυτές προσδιορίζονται από την FSAI (food safety authority of Ireland) και την FSAUK (food safety authority of United Kingdom), βάση του οποίου γίνεται ο καθορισμός των κριτηρίων μικροβιολογικής υγιεινής και ασφάλειας για τα τρόφιμα στις φάσεις παραγωγής, διακίνησης και service στα τελικά σημεία πώλησης σύμφωνα με τον οποίο ισχύουν τα εξής:

- Για τη **Salmonella** το κριτήριο ασφάλειας ενός τροφίμου είναι η απουσία της σε 25gr δείγματος τροφίμου (ή σε 10 gr αν πρόκειται για κιμά ή μηχανικώς διαχωρισμένο κρέας).
- Για τη **Listeria monocytogenes** στα τρόφιμα που είναι έτοιμα για κατανάλωση και προορίζονται για βρέφη ή ειδικούς ιατρικούς σκοπούς και είναι ικανά να υποστηρίξουν την ανάπτυξή της, απουσία σε 25gr και σε αυτά που δεν είναι ικανά να υποστηρίξουν την ανάπτυξή της, το ανώτατο όριο προσδιορίζεται στα 100cfu/g (pH<5.3 ή/και aw<0,92).
- Για το **Staphylococcus aureus** όταν πρόκειται για γάλα και γαλακτοκομικά προϊόντα από 10-1000 μικροβιολογικά ανάλογα με την επεξεργασία που έχει υποστεί η πρώτη ύλη. Σε ότι αφορά παρασκευές επεξεργασμένων προϊόντων με βάση το κρέας, φρέσκες και σύνθετες σαλάτες λαχανικών, η κατευθυντήρια γραμμή υγιεινής είναι <200 cfu/gr.
- Για την **E.coli** όσον αφορά το κρέας και τα προϊόντα του οι κατευθυντήριες γραμμές ορίζουν πληθυσμούς 50-500 cfu/g για το γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα από 1-1000 cfu/g αναλόγως της επεξεργασίας και για τις φρέσκες, σύνθετες σαλ'ατες, σάντουιτς και παρεμφερη προϊόντα από 10-100 cfu/g ανάλογα το είδος.

Συνολικά τα 400 τρόφιμα κατατάχθηκαν σε 8 κατηγορίες τροφίμων, γαλακτοκομικά (182 δείγματα), γλυκά (20 δείγματα), σύνθετη σαλάτα (28 δείγματα), φρέσκια σαλάτα (52 δείγματα), σάντουιτς (32 δείγματα), παγωτό (10 δείγματα), φρούτο (2 δείγματα) και ζεστή κουζίνα (74 δείγματα) (Γράφημα 1).



Γράφημα 1 : Στο παραπάνω γράφημα βλέπουμε πως κατηγοριοποιούνται τα 400 δείγματα, που αποτελούν το αντικείμενο της εν λόγω μελέτης, ανά είδος τροφίμου.

Επομένως, τα γαλακτοκομικά, η πληθώρα των δειγμάτων, αποτελούν το 45,5% επί του συνόλου, η ζεστή κουζίνα το 18,5%, η φρέσκια σαλάτα το 13%, η κατηγορία σάντουιτς 8%, η σύνθετη σαλάτα 7%, η κατηγορία γλυκά 5%, η κατηγορία παγωτό 2,5% και τέλος η κατηγορία φρούτο 0,5% επί του συνόλου των δειγμάτων.

Πιο αναλυτικά παρατίθεται ο ακόλουθος πίνακας (πίνακας 6.1.2) στον οποίο εμφανίζεται η κατηγοριοποίηση του κάθε είδους τροφίμου καθώς και ο αριθμός των δειγμάτων που ελήφθησαν:

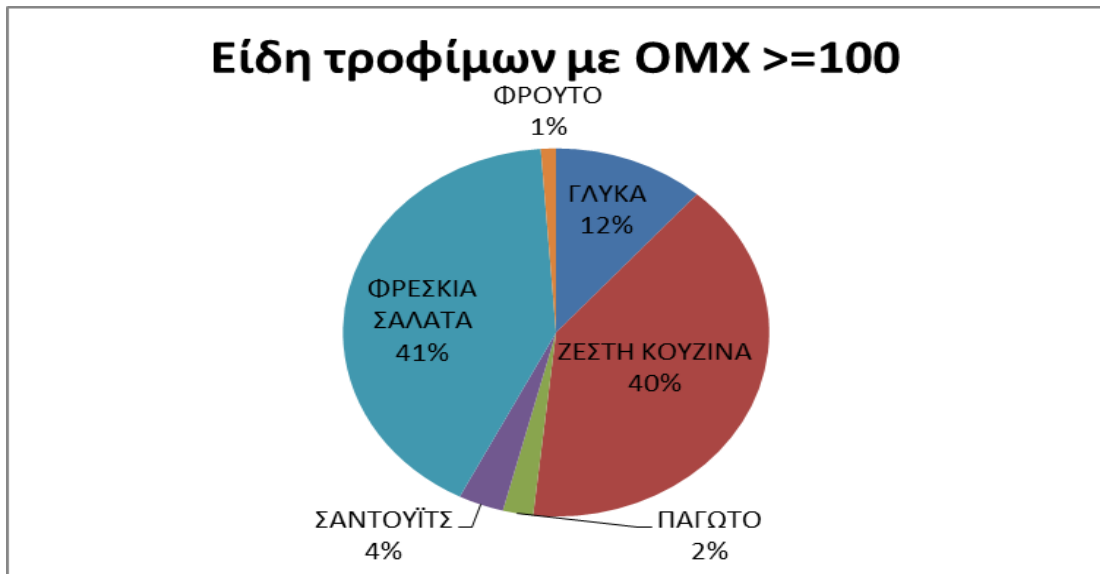
Κατηγορία Δείγματος	Είδος Δείγματος	Αριθμός δειγμάτων
ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΚΑ	Ανθότυρος	8
	Γραβιέρα	4
	Καλιτσούνι	80
	Καλιτσούνι μυζήθρας τηγανιού	10
	Μανούρι	2
	Μυζήθρα	18
	Μυζηθροπιτάκια ξινά	12
	Ξυνομυζήθρα	38
	Τυρί κομμένο	2
	Τυρί σε Ρολάκι	4
	Τυρί Τριμμένο	4
Κατηγορία Δείγματος	Είδος Δείγματος	Αριθμός δειγμάτων
ΓΛΥΚΑ	Κωκ με επικάλυψη	4
	Κωκ	2
	Μελομακάρονα	2
	Πάστα cheese cake	2
	Πάστα ποντικάκι	2
	Πάστα πορτοκάλι	4
	Πάστα σοκολατίνα	4
Κατηγορία Δείγματος	Είδος Δείγματος	Αριθμός δειγμάτων
ΣΥΝΘΕΤΗ ΣΑΛΑΤΑ	Βάση σαλάτας με τηγανητό κοτόπουλο	2
	Γαλλική σος	2
	Ζυμαρικά με ζαμπόν-τυρί	2
	Μύδια σαλάτα	2
	Ρυζοσαλάτα	4
	Σαλάτα γαρίδες	2
	Σαλάτα ζυμαρικών	4
	Σαλάτα καλαμπόκι	4
	Σαλάτα με ψητό κοτόπουλο	4
	Τυροκαφετή	2
Κατηγορία Δείγματος	Είδος Δείγματος	Αριθμός δειγμάτων
ΦΡΕΣΚΙΑ ΣΑΛΑΤΑ	Αγγουράκι απολυμασμένο	4
	Αγγουροντομάτα	6
	Άνηθος απολυμασμένος	2
	Αντίδια	6
	Καρότο απολυμασμένο	2
	κρεμμύδι Φρέσκο	4
	Λαχανοσαλάτα	2
	Μαϊντανός απολυμασμένος άκοπος	2
	Μαρούλι	8
	Πιπεριά	8
	Πλυμένη ντομάτα	2
	Ραπανάκι	4
	Σαλάτα με λαχανικά και μαγιονέζα	2
	Κατηγορία Δείγματος	Είδος Δείγματος
ΣΑΝΤΟΥΪΣ	Μπέικον	4
	Σάντουιτς	2
	Σάντουιτς επτάσπορο - ζαμπόν	2
	Σάντουιτς με ελιές, μανούρι, γαλοπούλα, ντομάτα, μαρούλι	2
	Σάντουιτς με καπνιστή γαλοπούλα	4
	Σάντουιτς τσιαπάτα με ζαμπόν	2
	Σάντουιτς τσιαπάτα με γαλοπούλα	6
	Σάντουιτς τσιαπάτα με μανούρι	2

	Σάντουιτς τσιαπάτα με φέτα παρασκευής 3h, θ=16,3	2
	Τοστ με ζαμπόν και τυρί	2
	Χοιρινή ωμοπλάτη	4
Κατηγορία Δείγματος	Είδος Δείγματος	Αριθμός δειγμάτων
ΠΑΓΩΤΟ	Milkshake σοκολάτα	2
	Παγωτό κακάο με κόκκους	2
	Παγωτό πεπόνι	4
	Παγωτό πραλίνα Βιέννης	2
Κατηγορία Δείγματος	Είδος Δείγματος	Αριθμός δειγμάτων
ΦΡΟΥΤΟ	Καρπούζι κομμένο	2
Κατηγορία Δείγματος	Είδος Δείγματος	Αριθμός δειγμάτων
ΖΕΣΤΗ ΚΟΥΖΙΝΑ	Γαρίδες Βραστές με κονιάκ	2
	Κιμάς Νωπός	4
	Κολοκυθοκεφτέδες (χωρίς τυριά)	10
	Κολοκυθοκεφτέδες γεμιστοί	10
	Κοτομπουκιές με φρυγανιά	2
	Κοτοπουλάκια Πανέ	4
	Κοτόπουλο βρασμένο	4
	Κοτόπουλο σουβλάκι	4
	Μακαρόνια	10
	Μπιφτέκι	14
	Ρύζι Βραστό με μανιτάρια tempering	2
	Σνίτσελ ωμό	2
	Στήθος κοτόπουλο	2
	Χάμπουργκερ με μπέικον και μπιφτέκι	2
	Χοιρινό με κρούστα μπαχαρικών	2

Πίνακας 6.1.2: Αναγράφονται τα είδη δειγμάτων και ο αριθμός αυτών, τα οποία ελέγχθηκαν στα πλαίσια της πτυχιακής εργασίας, ανά κατηγορία.

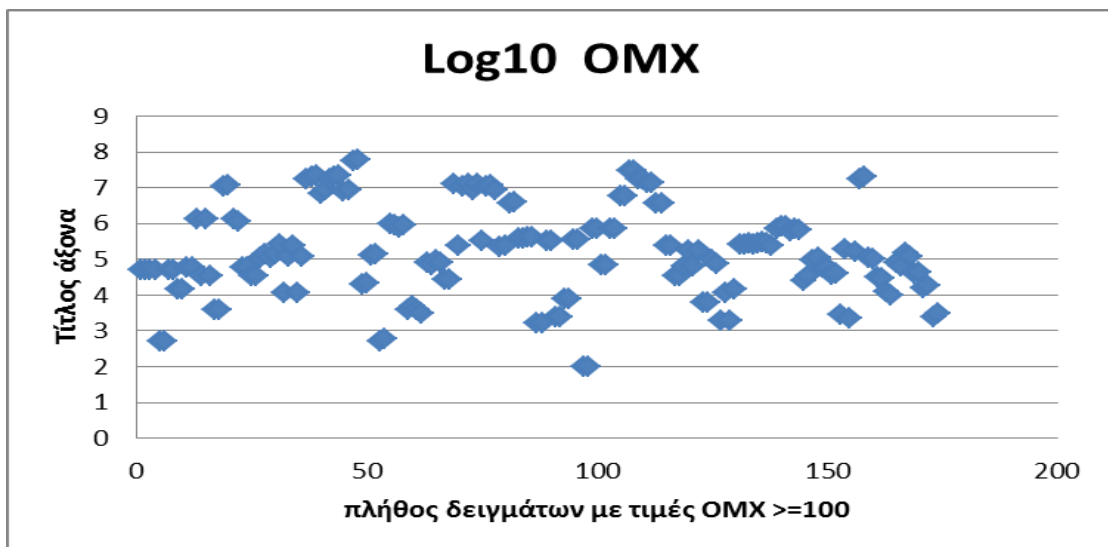
Στον παραπάνω πίνακα παρουσιάζονται τα χαρακτηριστικά του δείγματος των τροφίμων με βάση τη σύστασή τους. Η πλειονότητα των δειγμάτων, συγκεκριμένα 182 τρόφιμα, ανήκουν στην κατηγορία των γαλακτοκομικών, στα οποία συγκαταλέγονται τυριά και σφολιατοειδή με βάση τα γαλακτοκομικά προϊόντα. Τρόφιμα όπως κρεατικά και μακαρόνια που σερβίρονταν ζεστά συγκαταλέγονται στη ζεστή κουζίνα και ήταν 74 σε αριθμό. Τα δείγματα φρέσκιας σαλάτας ήταν 52 σε αριθμό και αποτελούνταν από φρέσκα κομμένα λαχανικά. Η κατηγορία των σάντουιτς αποτελούταν από διάφορα είδη σάντουιτς και τόστ με ποικίλλο περιεχόμενο, 32 σε σύνολο, ενώ δείγματα σαλάτας ανάμεικτης με διάφορα άλλα υλικά ανήκουν στην κατηγορία σύνθετης σαλάτας και είναι 28 σε αριθμό. Τέλος, τα γλυκά, τα παγωτά και τα φρούτα αποτελούν την μειοψηφία των δειγμάτων, καθώς η κάθε κατηγορία αντιστοιχείται από 20, 10 και 2 δείγματα.

Παρακάτω αναλύεται σε σχετικά γραφήματα η εμφάνιση της OMX στα δείγματα που εξετάστηκαν :

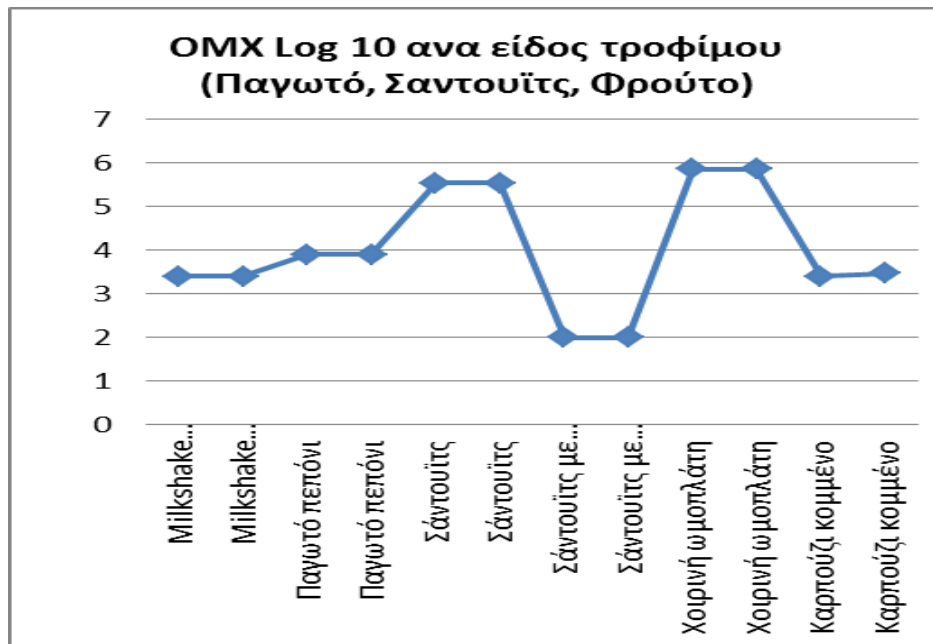


Γράφημα 2 : Στο παραπάνω γράφημα βλέπουμε πως διαμορφώνονται τα ποσοστά, ανά κατηγορία τροφίμων, των δειγμάτων που παρουσίασαν ΟΜΧ > ή = 100.

Στο παραπάνω γράφημα διαπιστώνεται πως τα μεγαλύτερα ποσοστά εμφάνισης με ΟΜΧ > ή = 100 εμφανίζουν οι κατηγορίες φρέσκια σαλάτα και ζεστή κουζίνα. Η κατηγορία γαλακτοκομικά δεν ελέγχθηκε για ΟΜΧ.

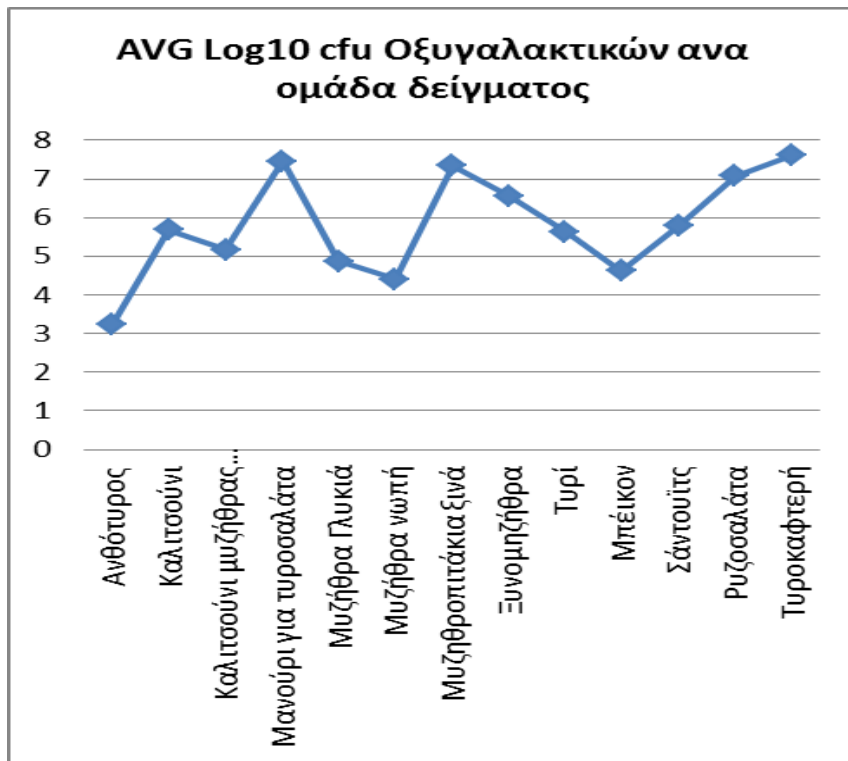


Γράφημα 3 : Φαίνεται η διαμόρφωση των τιμών της ΟΜΧ με λογαριθμική έκφραση.



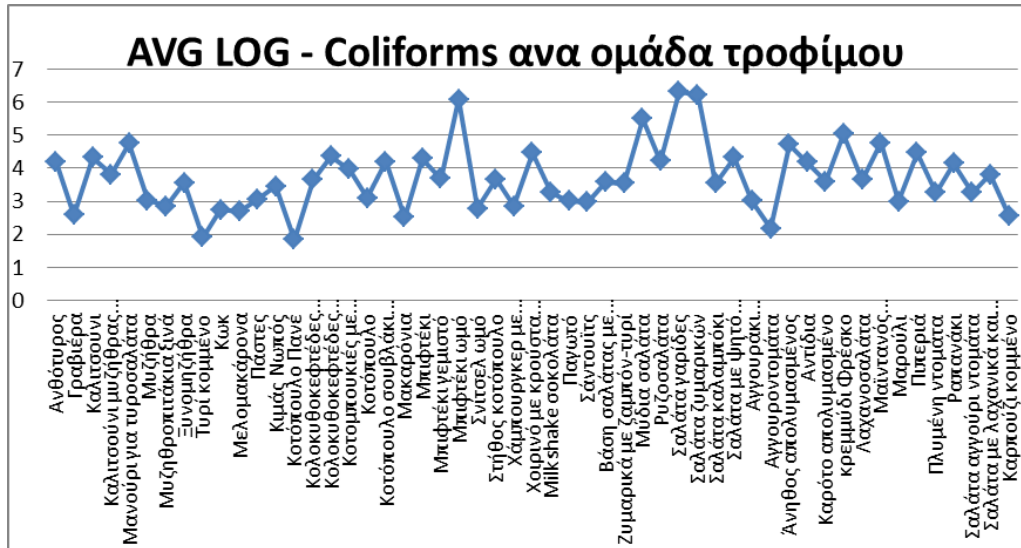
Γράφημα 7 : Οι τιμές της ΟΜΧ στα επιμέρους δείγματα, τα οποία ανήκουν στις κατηγορίες παγωτό, σάντουιτς και φρούτο.

Ύστερα από μελέτη των παραπάνω γραφημάτων προκύπτει η παρατήρηση πως οι μεγαλύτερες τιμές ΟΜΧ παρατηρούνται στα δείγματα της κατηγορίας ζεστή κουζίνα.



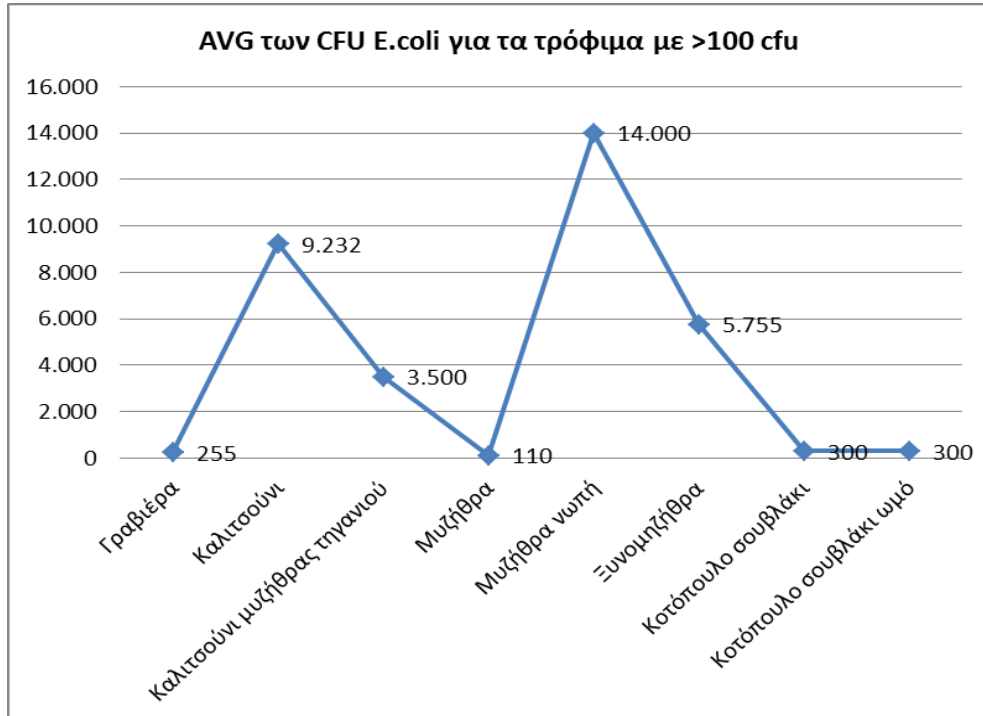
Γράφημα 8 : Φαίνεται ο μέσος όρος της λογαριθμικής έκφρασης των αποικιών οξυγαλακτικών των επιμέρους δειγμάτων στην κατηγορία των γαλακτοκομικών.

Όπως διαπιστώνει κανείς από το παραπάνω διάγραμμα ο μεγαλύτερος μέσος όρος απαντάται στην τυροκαφτερή, στο μανούρι που προορίζεται για σαλάτα και στα ξινά μυζηθοπιτάκια.



Γράφημα 9 : Φαίνεται ο μέσος όρος της λογαριθμικής έκφρασης των κολιμορφων ανά μονάδα τροφίμου.

Το μεγαλύτερο μέσο όρο εμφάνισης των κολιμορφων με λογαριθμική έκφραση εμφανίζουν τα δείγματα τροφίμων : σαλάτα γαρίδες, σαλάτα ζυμαρικών και μπιφτέκι ωμό.



Γράφημα 10 : Φαίνεται ο μέσος όρος αποικιών της λογαριθμικής έκφρασης για την E.coli για τα τρόφιμα με > 100 αποικίες.

Από το γράφημα 11 εξάγεται ως η μεγαλύτερη τιμή αυτή των 750 αποικιών σε δείγμα σαλάτας από μύδια και ως η αμέσως επόμενη τιμή αυτή των 550 αποικιών σε δείγμα σαλάτας ζυμαρικών με σλάμι και πέστο.

Από το σύνολο των δειγμάτων (400 τρόφιμα) 10 εξ' αυτών, τα οποία ανήκουν στην κατηγορία των γαλακτοκομικών βρέθηκαν θετικά στη *Salmonella* (2,5%). Τα 368 τρόφιμα από τα 400 υπό μελέτη δείγματα, βρέθηκαν αρνητικά στη *Listeria spp.*, ενώ τα 32 τρόφιμα ήταν θετικά (8%). Από τα 32 τρόφιμα που βρέθηκαν να είναι θετικά στη *Listeria spp.* τα 20 ανήκουν στην κατηγορία της ζεστής κουζίνας, τα 8 στην κατηγορία σύνθετη σαλάτα, τα 2 στην κατηγορία σάντουιτς και τα 2 στην κατηγορία των γαλακτοκομικών. Για την *L.monocytogenes*, αρνητικά ήταν 352 τρόφιμα, ενώ 46 τρόφιμα ήταν θετικά (11,5%). Πιο συγκεκριμένα, από τα 46 θετικά δείγματα τα 34 ανήκουν στην κατηγορία ζεστή κουζίνα, τα 8 στην κατηγορία σύνθετη σαλάτα, τα 2 στην κατηγορία των γαλακτοκομικών και τα 2 στην κατηγορία των σάντουιτς. Σε αυτό το σημείο αξίζει να αναφερθεί ότι η παρουσία της *Listeria spp* σε ένα τρόφιμο, αυξάνει την πιθανότητα παρουσίας σε αυτό και της *L. monocytogenes* έστω και αν αυτή δεν ανιχνεύεται πάντα. Συχνότερα στις περιπτώσεις δειγμάτων που είναι θετικά στη *Listeria*, ανιχνεύεται η *L.innocua*. Τα κρεατοσκευάσματα στα οποία εντοπίστηκε *Listeria monocytogenes* ήταν προϊόντα κοτόπουλου μη θερμικώς επεξεργασμένα. Τα αλλαντικά, τα γαλακτοκομικά και τα αυγά είναι πιθανόν να έχουν μολυνθεί σε επίπεδο παραγωγού ή να έχουν επιμολυνθεί στη συνέχεια κατά την επεξεργασία τους από την επιχείρηση. Η παρουσία του μικροοργανισμού στα ενδιάμεσα προϊόντα (όπως το μαρούλι και η πιπεριά) δείχνει αποτυχία των διαδικασιών χημικής εξυγίανσής τους στις επιχειρήσεις fast food. Είναι επίσης πολύ πιθανό τα δείγματα να επιμολύνθηκαν από τα εργαλεία και τον εξοπλισμό κοπής (μαχαίρια, robot coupe, teflon) λόγω κάποιας αστοχίας του προγράμματος εξυγίανσής τους με αποτέλεσμα τη διασταυρούμενη μόλυνση των επεξεργαζόμενων τροφίμων.

Σε ότι αφορά τα τρόφιμα τα οποία έχουν υποστεί θερμική επεξεργασία, όπως τα κρεατοσκευάσματα και οι σφολιάτες, κριτήριο για την επιτυχή θερμική τους επεξεργασία είναι η απουσία της *Salmonella spp.* Ωστόσο, η παρουσία του στα σφολιατοειδή, μπορεί να αποδοθεί στην επιμόλυνση από το περιβάλλον παραγωγής της βιομηχανίας σφολιατοειδών (εργαλεία) ή/και στην παρουσία της στις εισερχόμενες πρώτες ύλες (τυριά), οι οποίες επιμολύνονται κατά την παραγωγή τους στα τυροκομεία. Η ίδια επιμόλυνση μπορεί να επισυμβεί και στην κατηγορία των σάντουιτς όταν για την παρασκευή τους έχουν χρησιμοποιηθεί επιμολυσμένα συστατικά (είτε από το περιβάλλον παραγωγής ή από μολυσμένες πρώτες ύλες, συστατικά των σάντουιτς όπως λόγω χάρη μαλακά τυριά, αλλαντικά, λαχανικά).

Σημαντικό εύρημα στον πίνακα αυτό είναι η παρουσία *Coliforms* σε γαλακτοκομικά προϊόντα και παγωτά. Στην περίπτωση των παγωτών η νομοθεσία συμβαίνει να είναι ιδιαίτερη αυστηρή και πιο συγκεκριμένα προβλέπει πληθυσμούς <100 cfu/gr ή ml, επομένως η εύρεση περισσότερων μικροοργανισμών εντοπίζεται σε αστοχία του προγράμματος εξυγίανσης των εξοπλισμών παραγωγής τους. Σε ότι αφορά την παρουσία της *E.coli* το ανώτατο επιτρεπτό όριο που ορίζει η νομοθεσία για το δείκτη υγιεινής *E.coli* στα τελικά σημεία πώλησης αυτών των επιχειρήσεων, ανέρχεται στα 100 cfu/gr. Το κριτήριο για την ασφάλεια ενός τροφίμου είναι η απουσία των *Salmonella* και *Listeria*, ενώ

το κριτήριο για την εξασφάλιση της υγιεινής του είναι ο αποκλεισμός του *Staphylococcus* και της *E.coli*.

Στους παρακάτω πίνακες φαίνονται συνοπτικά τα δείγματα τα οποία βρέθηκαν θετικά και αρνητικά σε ανίχνευση *Σαλμονέλλας* και *Listeria monocytogenes*, καθώς και το ποσοστό αυτών επί του γενικού συνόλου των δειγμάτων.

Σαλμονέλλα	Αριθμός	ΠΟΣΟΣΤΟ %
Δείγματα θετικά σε ανίχνευση	10	2,5
Δείγματα αρνητικά σε ανίχνευση	390	97,5

Πίνακας 6.1.5, Τα δείγματα που εξετάστηκαν για *Σαλμονέλλα* εκφρασμένα σε αριθμό και ποσοστό επί του γενικού συνόλου των δειγμάτων.

<i>Listeria monocytogenes</i>	Αριθμός	ΠΟΣΟΣΤΟ %
Θετικά Δείγματα	46	11,5
Αρνητικά Δείγματα	354	88,5

Πίνακας 6.1.6, Τα δείγματα που εξετάστηκαν για *Listeria monocytogenes* εκφρασμένα σε αριθμό και ποσοστό επί του γενικού συνόλου των δειγμάτων

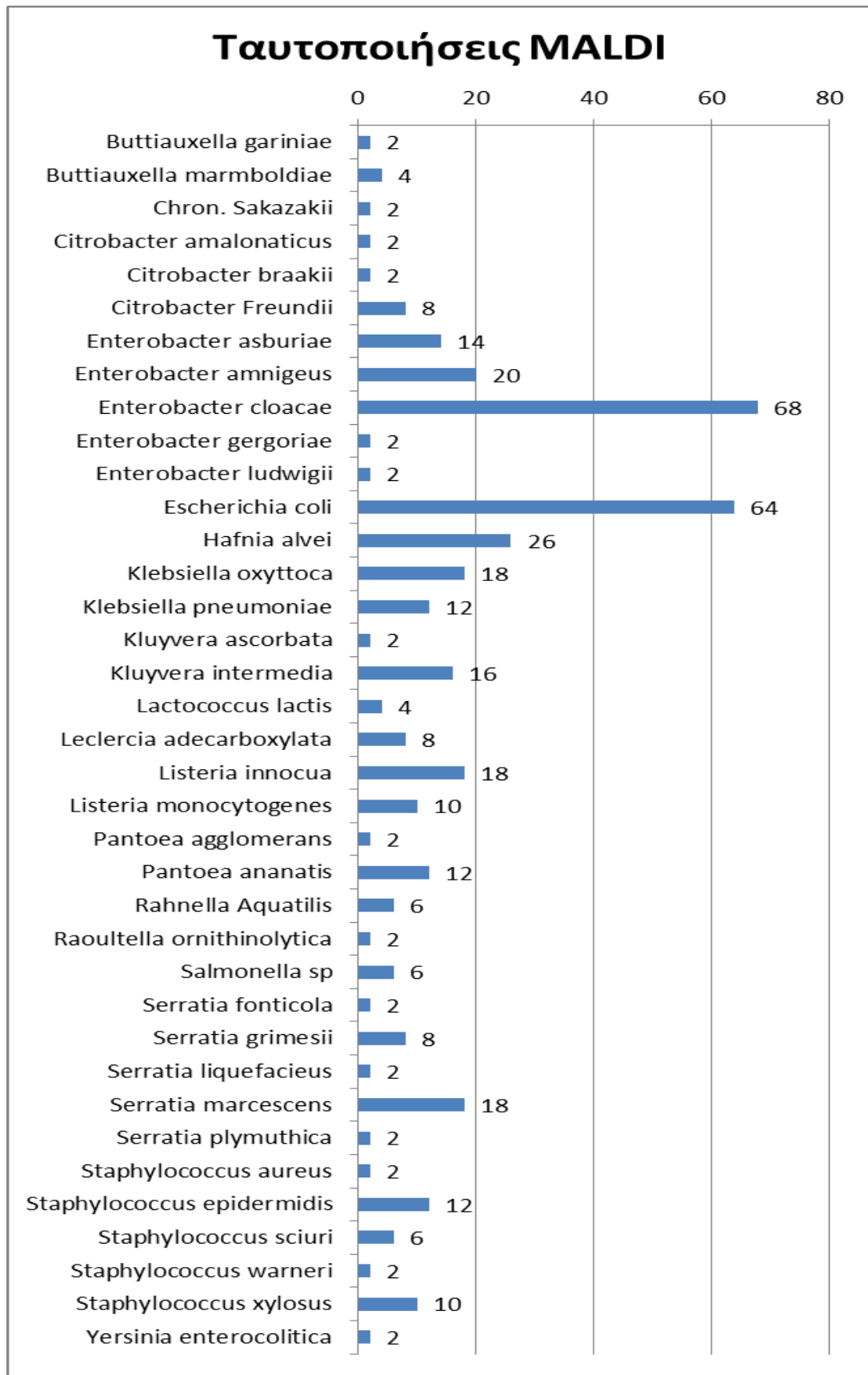
6.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ MALDI – TOF

Ύστερα από την εφαρμογή των μεθόδων κλασσικής μικροβιολογίας με στόχο την ανεύρεση και την απαρίθμηση των παθογόνων μικροοργανισμών επιλέχθηκε από κάθε αναλυμένο τρόφιμο αποικία **ένας εξ αυτών** για το εκάστοτε τρόφιμο για την ταυτοποίηση με τη σύγχρονη μέθοδο ανάλυσης MALDI – TOF. Τα αποτελέσματα που πάρθηκαν παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα, όπου αναγράφεται το είδος τροφίμου, ο παθογόνος μικροοργανισμός που βρέθηκε από την εφαρμογή της κλασσικής μικροβιολογίας και ο μικροοργανισμός που βρέθηκε από το MALDI- TOF με το καλύτερο σκορ:

Ελέγχθηκαν 400 αποικίες εις τριεπλούν που αντιστοιχούν σε 1200 συνολικά αναλύσεις. Τα αποτέλεσμα του MALDI παρατίθεται στον ακόλουθο πίνακα και γράφημα (Πίνακας 6.2.1, Γράφημα 2) μαζί με το πλήθος των δειγμάτων που εμφάνισαν την ίδια ταυτοποίηση:

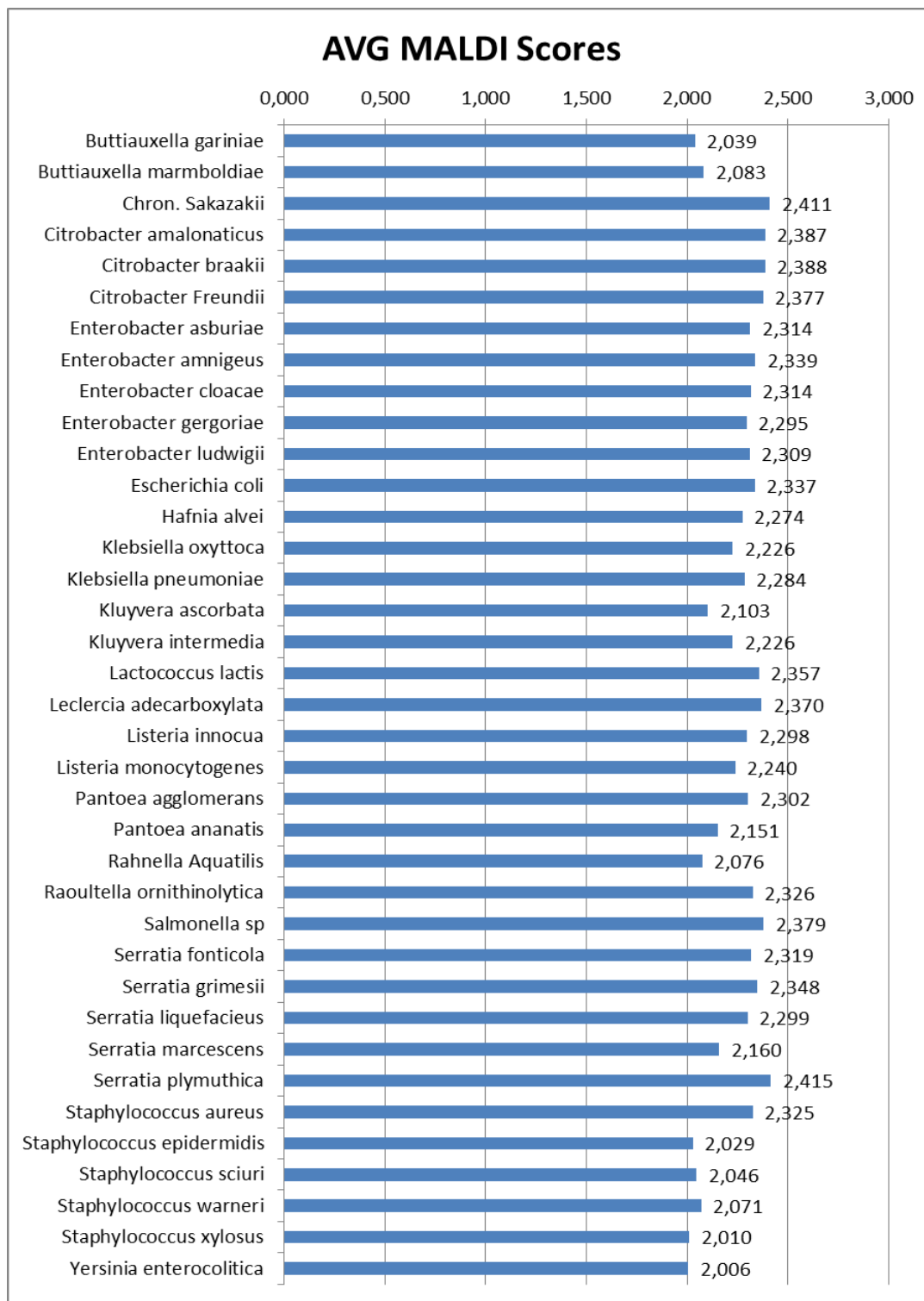
A/A	Παθογόνος (MALDI-Best Match)	No of Samples	A/A	Παθογόνος (MALDI-Best Match)	No of Samples
1	Buttiauxella gariniaie	2	20	Listeria innocua	18
2	Buttiauxella marmboldiae	4	21	Listeria monocytogenes	10
3	Chron. Sakazakii	2	22	Pantoea ananatis	2
4	Citrobacter amalonaticus	2	23	Pantoea agglomerans	12
5	Citrobacter braakii	2	24	Pantoea ananatis	6
6	Citrobacter Freundii	8	25	Rahnella Aquatilis	2
7	Enterobacter asburiae	14	26	Raoultella ornithinolytica	6
8	Enterobacter amnigeus	20	27	Salmonella sp	2
9	Enterobacter cloacae	68	28	Serratia fonticola	8
10	Enterobacter gergoriae	2	29	Serratia grimesii	2
11	Enterobacter ludwigii	2	30	Serratia liquefacius	18
12	Escherichia coli	64	31	Serratia marcescens	2
13	Hafnia alvei	26	32	Serratia plymuthica	2
14	Klebsiella oxyttoca	18	33	Staphylococcus aureus	12
15	Klebsiella pneumoniae	12	34	Staphylococcus epidermidis	6
16	Kluyvera ascorbata	2	35	Staphylococcus sciuri	2
17	Kluyvera intermedia	16	36	Staphylococcus warneri	10
18	Lactococcus lactis	4	37	Staphylococcus xylosys	2
19	Leclercia adecarboxylata	8	38	Yersinia Enterocolitica	2

Πίνακας 6.2.1 : Στον πίνακα αναγράφονται οι μικροοργανισμοί που ταυτοποιήθηκαν σύμφωνα με το MALDI και ο αριθμός του είδους δειγμάτων.



Γράφημα 12: Ταυτοποιήσεις MALDI ανα μικροοργανισμό και πλήθος δειγμάτων με κοινή ταυτοποίηση.

Ο μέσος όρος του score ταυτοποιήσεων ανα κατηγορία μικροβίου υπολογίστηκε και φαίνεται στο παρακάτω γράφημα. Το σκόρ αποτελεί τον βαθμό βεβαιότητας για την ταυτοποίηση. Σε γενικές γραμμές ο συνολικός μέσος όρος του σκορ ταυτοποιήσεων ήταν στο 2,250 με μέγιστο 2,547 και ελάχιστο το 1,811.



Γράφημα 13 : Φαίνεται ο μέσος όρος του σκορ των αποτελεσμάτων.

6.3 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Κατά τη σύγκριση των αποτελεσμάτων παρουσιάζεται συμφωνία των αποτελεσμάτων των δύο μεθόδων, με εξαίρεση την περίπτωση της *Listeria* spp., με την παρατήρηση πως το MALDI-TOF δύναται να προσφέρει περαιτέρω ταυτοποίηση ακόμη και του είδους του παθογόνου μικροοργανισμού. Παρακάτω φαίνονται συγκριτικά τα αποτελέσματα των δύο μεθόδων:

A/A	Παθογόνος (ISO)	Παθογόνος (MALDI-Best Match)	MALDI TOP SCORE	AGREEMENT
1	Coliforms	<i>Buttiauxella gariniaie</i>	2,088	NAI
2	Coliforms	<i>Buttiaux. gariniaie</i>	1,989	NAI
3	Coliforms	<i>Buttiaux. marmboldiae</i>	1,902	NAI
4	Coliforms	<i>Buttiaux. marmboldiae</i>	1,811	NAI
5	Coliforms	<i>Buttiaux. marmboldiae</i>	2,253	NAI
6	Coliforms	<i>Buttiaux. marmboldiae</i>	2,366	NAI
7	Coliforms	<i>Chron. Sakazakii</i>	2,324	NAI
8	Coliforms	<i>Chron. Sakazakii</i>	2,499	NAI
9	Coliforms	<i>Citrobact. amalonaticus</i>	2,445	NAI
10	Coliforms	<i>Citrobact.amalonaticus</i>	2,329	NAI
11	Coliforms	<i>Citrobacter braakii</i>	2,447	NAI
12	Coliforms	<i>Citrobacter braakii</i>	2,330	NAI
13	Coliforms	<i>Citrobacter freundii</i>	2,338	NAI
14	Coliforms	<i>Citrobacter freundii</i>	2,227	NAI
15	Coliforms	<i>Citrobacter Freundii</i>	2,345	NAI
16	Coliforms	<i>Citrobacter Freundii</i>	2,462	NAI
17	Coliforms	<i>Citrobacter Freundii</i>	2,374	NAI
18	Coliforms	<i>Citrobacter Freundii</i>	2,493	NAI
19	Coliforms	<i>Citrobacter freuudii</i>	2,331	NAI
20	Coliforms	<i>Citrobacter freuudii</i>	2,448	NAI
21	Coliforms	<i>Enterob. amnigeus</i>	2,391	NAI
22	Coliforms	<i>Enterob. amnigeus</i>	2,277	NAI
23	Coliforms	<i>Enterob. amnigeus</i>	2,527	NAI
24	Coliforms	<i>Enterob. amnigeus</i>	2,407	NAI
25	Coliforms	<i>Enterobacter amnigeus</i>	2,073	NAI
26	Coliforms	<i>Enterobacter amnigeus</i>	1,974	NAI
27	Coliforms	<i>Enterobacter amnigeus</i>	2,300	NAI
28	Coliforms	<i>Enterobacter amnigeus</i>	2,190	NAI
29	Coliforms	<i>Enterobacter amnigeus</i>	2,311	NAI

A/A	Παθογόνος (ISO)	Παθογόνος (MALDI-Best Match)	MALDI TOP SCORE	AGREEMENT
30	Coliforms	Enterobacter amnigeus	2,201	NAI
31	Coliforms	Enterobacter amnigeus	2,401	NAI
32	Coliforms	Enterobacter amnigeus	2,287	NAI
33	Coliforms	Enterobacter amnigeus	2,414	NAI
34	Coliforms	Enterobacter amnigeus	2,299	NAI
35	Coliforms	Enterobacter amnigeus	2,494	NAI
36	Coliforms	Enterobacter amnigeus	2,375	NAI
37	Coliforms	Enterobacter amnigeus	2,521	NAI
38	Coliforms	Enterobacter amnigeus	2,401	NAI
39	Coliforms	Enterobacter amnigeus	2,533	NAI
40	Coliforms	Enterobacter amnigeus	2,412	NAI
41	Coliforms	Enterobacter absuriae	2,234	NAI
42	Coliforms	Enterobacter absuriae	2,346	NAI
43	Coliforms	Enterobacter asburiae	2,076	NAI
44	Coliforms	Enterobacter asburiae	1,977	NAI
45	Coliforms	Enterobacter asburiae	2,217	NAI
46	Coliforms	Enterobacter asburiae	2,111	NAI
47	Coliforms	Enterobacter asburiae	2,393	NAI
48	Coliforms	Enterobacter asburiae	2,279	NAI
49	Coliforms	Enterobacter asburiae	2,480	NAI
50	Coliforms	Enterobacter asburiae	2,362	NAI
51	Coliforms	Enterobacter asburiae	2,537	NAI
52	Coliforms	Enterobacter asburiae	2,416	NAI
53	Coliforms	Enterobacter asburiae	2,547	NAI
54	Coliforms	Enterobacter asburiae	2,426	NAI
55	Coliforms	Enterobacter cloacae	2,179	NAI
56	Coliforms	Enterobacter cloacae	2,075	NAI
57	Coliforms	Enterobacter cloacae	2,193	NAI
58	Coliforms	Enterobacter cloacae	2,089	NAI
59	Coliforms	Enterobacter cloacae	2,227	NAI
60	Coliforms	Enterobacter cloacae	2,121	NAI
61	Coliforms	Enterobacter cloacae	2,232	NAI
62	Coliforms	Enterobacter cloacae	2,126	NAI
63	Coliforms	Enterobacter cloacae	2,253	NAI
64	Coliforms	Enterobacter cloacae	2,146	NAI
65	Coliforms	Enterobacter cloacae	2,025	NAI
66	Coliforms	Enterobacter cloacae	2,112	NAI
67	Coliforms	Enterobacter cloacae	2,260	NAI
68	Coliforms	Enterobacter cloacae	2,152	NAI
69	Coliforms	Enterobacter cloacae	2,302	NAI

A/A	Παθογόνος (ISO)	Παθογόνος (MALDI-Best Match)	MALDI TOP SCORE	AGREEMENT
70	Coliforms	Enterobacter cloacae	2,192	NAI
71	Coliforms	Enterobacter cloacae	2,328	NAI
72	Coliforms	Enterobacter cloacae	2,217	NAI
73	Coliforms	Enterobacter cloacae	2,329	NAI
74	Coliforms	Enterobacter cloacae	2,218	NAI
75	Coliforms	Enterobacter cloacae	2,352	NAI
76	Coliforms	Enterobacter cloacae	2,240	NAI
77	Coliforms	Enterobacter cloacae	2,358	NAI
78	Coliforms	Enterobacter cloacae	2,246	NAI
79	Coliforms	Enterobacter cloacae	2,417	NAI
80	Coliforms	Enterobacter cloacae	2,302	NAI
81	Coliforms	Enterobacter cloacae	2,422	NAI
82	Coliforms	Enterobacter cloacae	2,307	NAI
83	Coliforms	Enterobacter cloacae	2,431	NAI
84	Coliforms	Enterobacter cloacae	2,315	NAI
85	Coliforms	Enterobacter cloacae	2,434	NAI
86	Coliforms	Enterobacter cloacae	2,318	NAI
87	Coliforms	Enterobacter cloacae	2,455	NAI
88	Coliforms	Enterobacter cloacae	2,338	NAI
89	Coliforms	Enterobacter cloacae	2,461	NAI
90	Coliforms	Enterobacter cloacae	2,344	NAI
91	Coliforms	Enterobacter cloacae	2,463	NAI
92	Coliforms	Enterobacter cloacae	2,346	NAI
93	Coliforms	Enterobacter cloacae	2,466	NAI
94	Coliforms	Enterobacter cloacae	2,349	NAI
95	Coliforms	Enterobacter cloacae	2,490	NAI
96	Coliforms	Enterobacter cloacae	2,371	NAI
97	Coliforms	Enterobacter cloacae	2,493	NAI
98	Coliforms	Enterobacter cloacae	2,374	NAI
99	Coliforms	Enterobacter cloacae	2,501	NAI
100	Coliforms	Enterobacter cloacae	2,382	NAI
101	Coliforms	Enterobacter cloacae	2,503	NAI
102	Coliforms	Enterobacter cloacae	2,384	NAI
103	Coliforms	Enterobacter cloacae	2,250	NAI
104	Coliforms	Enterobacter cloacae	2,388	NAI
105	Coliforms	Enterobacter cloacae	2,402	NAI
106	Coliforms	Enterobacter cloacae	2,020	NAI
107	Coliforms	Enterobacter cloacae	2,140	NAI
108	Coliforms	Enterobacter cloacae	2,410	NAI
109	Coliforms	Enterobacter cloacae	2,420	NAI

A/A	Παθογόνος (ISO)	Παθογόνος (MALDI-Best Match)	MALDI TOP SCORE	AGREEMENT
110	Coliforms	Enterobacter cloacae	2,202	NAI
111	Coliforms	Enterobacter cloacae	2,439	NAI
112	Coliforms	Enterobacter cloacae	2,490	NAI
113	Coliforms	Enterobacter cloacae	2,247	NAI
114	Coliforms	Enterobacter cloacae	2,447	NAI
115	Coliforms	Enterobacter cloacae	2,130	NAI
116	Coliforms	Enterobacter cloacae	2,451	NAI
117	Coliforms	Enterobacter cloacae	2,488	NAI
118	Coliforms	Enterobacter cloacae	2,458	NAI
119	Coliforms	Enterobacter cloacae	2,304	NAI
120	Coliforms	Enterobacter cloacae	2,221	NAI
121	Coliforms	Enterobacter cloacae	2,508	NAI
122	Coliforms	Enterobacter cloacae	2,321	NAI
123	Coliforms	Enterobacter gergoriae	2,354	NAI
124	Coliforms	Enterobacter gergoriae	2,235	NAI
125	Coliforms	Enterobacter ludwigii	2,253	NAI
126	Coliforms	Enterobacter ludwigii	2,366	NAI
127	Coliforms	Hafnia alvei	1,996	NAI
128	Coliforms	Hafnia alvei	2,096	NAI
129	Coliforms	Hafnia alvei	2,043	NAI
130	Coliforms	Hafnia alvei	2,084	NAI
131	Coliforms	Hafnia alvei	2,129	NAI
132	Coliforms	Hafnia alvei	2,087	NAI
133	Coliforms	Hafnia alvei	2,203	NAI
134	Coliforms	Hafnia alvei	2,160	NAI
135	Coliforms	Hafnia alvei	2,205	NAI
136	Coliforms	Hafnia alvei	2,162	NAI
137	Coliforms	Hafnia alvei	2,443	NAI
138	Coliforms	Hafnia alvei	2,395	NAI
139	Coliforms	Hafnia alvei	2,480	NAI
140	Coliforms	Hafnia alvei	2,431	NAI
141	Coliforms	Hafnia alvei	2,510	NAI
142	Coliforms	Hafnia alvei	2,461	NAI
143	Coliforms	Hafnia alvei	2,515	NAI
144	Coliforms	Hafnia alvei	2,466	NAI
145	Coliforms	Hafnia alvei	2,217	NAI
146	Coliforms	Hafnia alvei	2,266	NAI
147	Coliforms	Hafnia alvei	2,430	NAI
148	Coliforms	Hafnia alvei	2,378	NAI
149	Coliforms	Hafnia alvei	2,284	NAI

A/A	Παθογόνος (ISO)	Παθογόνος (MALDI-Best Match)	MALDI TOP SCORE	AGREEMENT
150	Coliforms	Hafnia alvei	2,321	NAI
151	Coliforms	Hafnia alvei	2,150	NAI
152	Coliforms	Hafnia alvei	2,212	NAI
153	Coliforms	Klebsiella oxytoca	2,161	NAI
154	Coliforms	Klebsiella oxytoca	2,204	NAI
155	Coliforms	Klebsiella oxytoca	2,174	NAI
156	Coliforms	Klebsiella oxytoca	2,217	NAI
157	Coliforms	Klebsiella oxytoca	2,190	NAI
158	Coliforms	Klebsiella oxytoca	2,234	NAI
159	Coliforms	Klebsiella oxytoca	2,224	NAI
160	Coliforms	Klebsiella oxytoca	2,268	NAI
161	Coliforms	Klebsiella oxytoca	2,229	NAI
162	Coliforms	Klebsiella oxytoca	2,274	NAI
163	Coliforms	Klebsiella oxytoca	2,235	NAI
164	Coliforms	Klebsiella oxytoca	2,280	NAI
165	Coliforms	Klebsiella oxytoca	2,277	NAI
166	Coliforms	Klebsiella oxytoca	2,323	NAI
167	Coliforms	Klebsiella oxytoca	2,309	NAI
168	Coliforms	Klebsiella oxytoca	2,355	NAI
169	Coliforms	Klebsiella oxyttoca	2,034	NAI
170	Coliforms	Klebsiella oxyttoca	2,075	NAI
171	Coliforms	Klebsiella pneumoniae	2,003	NAI
172	Coliforms	Klebsiella pneumoniae	2,043	NAI
173	Coliforms	Klebsiella pneumoniae	2,218	NAI
174	Coliforms	Klebsiella pneumoniae	2,262	NAI
175	Coliforms	Klebsiella pneumoniae	2,252	NAI
176	Coliforms	Klebsiella pneumoniae	2,297	NAI
177	Coliforms	Klebsiella pneumoniae	2,285	NAI
178	Coliforms	Klebsiella pneumoniae	2,331	NAI
179	Coliforms	Klebsiella pneumoniae	2,368	NAI
180	Coliforms	Klebsiella pneumoniae	2,415	NAI
181	Coliforms	Klebsiella pneumoniae	2,513	NAI
182	Coliforms	Klebsiella pneumoniae	2,417	NAI
183	Coliforms	Kluyvera ascorbata	2,082	NAI
184	Coliforms	Kluyvera ascorbata	2,124	NAI
185	Coliforms	Kluyvera intermedia	1,955	NAI
186	Coliforms	Kluyvera intermedia	1,994	NAI
187	Coliforms	Kluyvera intermedia	2,063	NAI
188	Coliforms	Kluyvera intermedia	2,104	NAI
189	Coliforms	Kluyvera intermedia	2,105	NAI
190	Coliforms	Kluyvera intermedia	2,147	NAI

A/A	Παθογόνος (ISO)	Παθογόνος (MALDI-Best Match)	MALDI TOP SCORE	AGREEMENT
191	Coliforms	Kluyvera intermedia	2,144	NAI
192	Coliforms	Kluyvera intermedia	2,187	NAI
193	Coliforms	Kluyvera intermedia	2,240	NAI
194	Coliforms	Kluyvera intermedia	2,285	NAI
195	Coliforms	Kluyvera intermedia	2,306	NAI
196	Coliforms	Kluyvera intermedia	2,352	NAI
197	Coliforms	Kluyvera intermedia	2,380	NAI
198	Coliforms	Kluyvera intermedia	2,428	NAI
199	Coliforms	Kluyvera intermedia	2,438	NAI
200	Coliforms	Kluyvera intermedia	2,487	NAI
201	Coliforms	Lactococcus lactis	2,293	NAI
202	Coliforms	Lactococcus lactis	2,339	NAI
203	Coliforms	Lactococcus lactis	2,374	NAI
204	Coliforms	Lactococcus lactis	2,421	NAI
205	Coliforms	Lecler. adecarboxylata	2,184	NAI
206	Coliforms	Lecler. adecarboxylata	2,228	NAI
207	Coliforms	Lecler. adecarboxylata	2,384	NAI
208	Coliforms	Lecler. adecarboxylata	2,432	NAI
209	Coliforms	Lecler. adecarboxylata	2,385	NAI
210	Coliforms	Lecler. adecarboxylata	2,433	NAI
211	Coliforms	Lecler. adecarboxylata	2,434	NAI
212	Coliforms	Lecler. adecarboxylata	2,483	NAI
213	Coliforms	Pantoea agglomerans	2,000	NAI
214	Coliforms	Pantoea agglomerans	2,040	NAI
215	Coliforms	Pantoea agglomerans	2,266	NAI
216	Coliforms	Pantoea agglomerans	2,311	NAI
217	Coliforms	Pantoea agglomerans	2,331	NAI
218	Coliforms	Pantoea agglomerans	2,378	NAI
219	Coliforms	Pantoea agglomerans	2,337	NAI
220	Coliforms	Pantoea agglomerans	2,384	NAI
221	Coliforms	Pantoea agglomerans	2,351	NAI
222	Coliforms	Pantoea agglomerans	2,398	NAI
223	Coliforms	Pantoea agglomerans	2,392	NAI
224	Coliforms	Pantoea agglomerans	2,440	NAI
225	Coliforms	Pantoea ananatis	2,174	NAI
226	Coliforms	Pantoea ananatis	2,217	NAI
227	Coliforms	Pantoea ananatis	1,943	NAI
228	Coliforms	Pantoea ananatis	1,982	NAI
229	Coliforms	Pantoea ananatis	2,180	NAI
230	Coliforms	Pantoea ananatis	2,224	NAI
231	Coliforms	Pantoea ananatis	2,223	NAI

A/A	Παθογόνος (ISO)	Παθογόνος (MALDI-Best Match)	MALDI TOP SCORE	AGREEMENT
232	Coliforms	<i>Pantoea ananatis</i>	2,267	NAI
233	Coliforms	<i>Rahnella Aquatilis</i>	2,055	NAI
234	Coliforms	<i>Rahnella Aquatilis</i>	2,096	NAI
235	Coliforms	<i>Raoult. ornithinolytica</i>	2,052	NAI
236	Coliforms	<i>Raoult. ornithinolytica</i>	2,093	NAI
237	Coliforms	<i>Raoult. ornithinolytica</i>	2,495	NAI
238	Coliforms	<i>Raoult. ornithinolytica</i>	2,345	NAI
239	Coliforms	<i>Raoult. ornithinolytica</i>	2,545	NAI
240	Coliforms	<i>Raoult. ornithinolytica</i>	2,425	NAI
241	Coliforms	<i>Serratia fonticola</i>	2,184	NAI
242	Coliforms	<i>Serratia fonticola</i>	2,228	NAI
243	Coliforms	<i>Serratia fonticola</i>	2,264	NAI
244	Coliforms	<i>Serratia fonticola</i>	2,309	NAI
245	Coliforms	<i>Serratia fonticola</i>	2,344	NAI
246	Coliforms	<i>Serratia fonticola</i>	2,391	NAI
247	Coliforms	<i>Serratia fonticola</i>	2,391	NAI
248	Coliforms	<i>Serratia fonticola</i>	2,439	NAI
249	Coliforms	<i>Serratia grimesii</i>	2,325	NAI
250	Coliforms	<i>Serratia grimesii</i>	2,372	NAI
251	Coliforms	<i>Serratia liquefaciens</i>	2,274	NAI
252	Coliforms	<i>Serratia liquefaciens</i>	2,319	NAI
253	Coliforms	<i>Serratia liquefaciens</i>	2,313	NAI
254	Coliforms	<i>Serratia liquefaciens</i>	2,359	NAI
255	Coliforms	<i>Serratia liquefaciens</i>	2,315	NAI
256	Coliforms	<i>Serratia liquefaciens</i>	2,361	NAI
257	Coliforms	<i>Serratia liquefaciens</i>	2,367	NAI
258	Coliforms	<i>Serratia liquefaciens</i>	2,414	NAI
259	Coliforms	<i>Serratia liquefaciens</i>	2,368	NAI
260	Coliforms	<i>Serratia liquefaciens</i>	2,415	NAI
261	Coliforms	<i>Serratia liquefaciens</i>	2,422	NAI
262	Coliforms	<i>Serratia liquefaciens</i>	2,470	NAI
263	Coliforms	<i>Serratia liquefaciens</i>	2,073	NAI
264	Coliforms	<i>Serratia liquefaciens</i>	2,114	NAI
265	Coliforms	<i>Serratia liquefaciens</i>	2,099	NAI
266	Coliforms	<i>Serratia liquefaciens</i>	2,141	NAI
267	Coliforms	<i>Serratia liquefaciens</i>	2,263	NAI
268	Coliforms	<i>Serratia liquefaciens</i>	2,308	NAI
269	Coliforms	<i>Serratia marcescens</i>	2,139	NAI
270	Coliforms	<i>Serratia marcescens</i>	2,182	NAI
271	Coliforms	<i>Serratia plymuthica</i>	2,391	NAI
272	Coliforms	<i>Serratia plymuthica</i>	2,439	NAI

A/A	Παθογόνος (ISO)	Παθογόνος (MALDI-Best Match)	MALDI TOP SCORE	AGREEMENT
273	Coliforms	Yersinia Enterocolitica	1,986	NAI
274	Coliforms	Yersinia Enterocolitica	2,026	NAI
275	Escherichia coli	Escherichia coli	2,103	NAI
276	Escherichia coli	Escherichia coli	2,145	NAI
277	Escherichia coli	Escherichia coli	2,121	NAI
278	Escherichia coli	Escherichia coli	2,163	NAI
279	Escherichia coli	Escherichia coli	2,145	NAI
280	Escherichia coli	Escherichia coli	2,188	NAI
281	Escherichia coli	Escherichia coli	2,200	NAI
282	Escherichia coli	Escherichia coli	2,244	NAI
283	Escherichia coli	Escherichia coli	2,204	NAI
284	Escherichia coli	Escherichia coli	2,248	NAI
285	Escherichia coli	Escherichia coli	2,238	NAI
286	Escherichia coli	Escherichia coli	2,283	NAI
287	Escherichia coli	Escherichia coli	2,239	NAI
288	Escherichia coli	Escherichia coli	2,284	NAI
289	Escherichia coli	Escherichia coli	2,239	NAI
290	Escherichia coli	Escherichia coli	2,284	NAI
291	Escherichia coli	Escherichia coli	2,240	NAI
292	Escherichia coli	Escherichia coli	2,285	NAI
293	Escherichia coli	Escherichia coli	2,241	NAI
294	Escherichia coli	Escherichia coli	2,286	NAI
295	Escherichia coli	Escherichia coli	2,267	NAI
296	Escherichia coli	Escherichia coli	2,312	NAI
297	Escherichia coli	Escherichia coli	2,281	NAI
298	Escherichia coli	Escherichia coli	2,327	NAI
299	Escherichia coli	Escherichia coli	2,282	NAI
300	Escherichia coli	Escherichia coli	2,328	NAI
301	Escherichia coli	Escherichia coli	2,300	NAI
302	Escherichia coli	Escherichia coli	2,346	NAI
303	Escherichia coli	Escherichia coli	2,311	NAI
304	Escherichia coli	Escherichia coli	2,357	NAI
305	Escherichia coli	Escherichia coli	2,322	NAI
306	Escherichia coli	Escherichia coli	2,368	NAI
307	Escherichia coli	Escherichia coli	2,339	NAI
308	Escherichia coli	Escherichia coli	2,386	NAI
309	Escherichia coli	Escherichia coli	2,341	NAI
310	Escherichia coli	Escherichia coli	2,388	NAI
311	Escherichia coli	Escherichia coli	2,352	NAI
312	Escherichia coli	Escherichia coli	2,399	NAI
313	Escherichia coli	Escherichia coli	2,356	NAI

A/A	Παθογόνος (ISO)	Παθογόνος (MALDI-Best Match)	MALDI TOP SCORE	AGREEMENT
314	Escherichia coli	Escherichia coli	2,403	NAI
315	Escherichia coli	Escherichia coli	2,369	NAI
316	Escherichia coli	Escherichia coli	2,416	NAI
317	Escherichia coli	Escherichia coli	2,373	NAI
318	Escherichia coli	Escherichia coli	2,420	NAI
319	Escherichia coli	Escherichia coli	2,375	NAI
320	Escherichia coli	Escherichia coli	2,423	NAI
321	Escherichia coli	Escherichia coli	2,384	NAI
322	Escherichia coli	Escherichia coli	2,432	NAI
323	Escherichia coli	Escherichia coli	2,387	NAI
324	Escherichia coli	Escherichia coli	2,435	NAI
325	Escherichia coli	Escherichia coli	2,398	NAI
326	Escherichia coli	Escherichia coli	2,446	NAI
327	Escherichia coli	Escherichia coli	2,408	NAI
328	Escherichia coli	Escherichia coli	2,456	NAI
329	Escherichia coli	Escherichia coli	2,413	NAI
330	Escherichia coli	Escherichia coli	2,461	NAI
331	Escherichia coli	Escherichia coli	2,422	NAI
332	Escherichia coli	Escherichia coli	2,470	NAI
333	Escherichia coli	Escherichia coli	2,446	NAI
334	Escherichia coli	Escherichia coli	2,495	NAI
335	Escherichia coli	Escherichia coli	2,466	NAI
336	Escherichia coli	Escherichia coli	2,515	NAI
337	Escherichia coli	Escherichia coli	2,481	NAI
338	Escherichia coli	Escherichia coli	2,531	NAI
339	Listeria monocytogenes	Listeria monocytogenes	2,160	NAI
340	Listeria monocytogenes	Listeria monocytogenes	2,203	NAI
341	Listeria monocytogenes	Listeria monocytogenes	2,244	NAI
342	Listeria monocytogenes	Listeria monocytogenes	2,289	NAI
343	Listeria monocytogenes	Listeria monocytogenes	2,300	NAI
344	Listeria monocytogenes	Listeria monocytogenes	2,346	NAI
345	Listeria monocytogenes	Listeria monocytogenes	2,370	NAI
346	Listeria monocytogenes	Listeria monocytogenes	2,417	NAI
347	Listeria spp	Listeria innocua	2,197	NAI
348	Listeria spp	Listeria innocua	2,241	NAI
349	Listeria spp	Listeria innocua	2,217	NAI
350	Listeria spp	Listeria innocua	2,261	NAI
351	Listeria spp	Listeria innocua	2,290	NAI
352	Listeria spp	Listeria innocua	2,336	NAI
353	Listeria spp	Listeria innocua	2,310	NAI
354	Listeria spp	Listeria innocua	2,356	NAI

A/A	Παθογόνος (ISO)	Παθογόνος (MALDI-Best Match)	MALDI TOP SCORE	AGREEMENT
355	Listeria spp	Listeria innocua	2,275	NAI
356	Listeria spp	Listeria innocua	2,219	NAI
357	Listeria spp	Listeria innocua	2,330	NAI
358	Listeria spp	Listeria innocua	2,306	NAI
359	Listeria spp	Listeria innocua	2,291	NAI
360	Listeria spp	Listeria innocua	2,350	NAI
361	Listeria spp	Listeria innocua	2,380	NAI
362	Listeria spp	Listeria innocua	2,298	NAI
363	Listeria spp	Listeria innocua	2,323	NAI
364	Listeria spp	Listeria innocua	2,383	NAI
365	Listeria spp	Listeria monocytogenes	2,015	OXI
366	Listeria spp	Listeria monocytogenes	2,055	OXI
367	Salmonella	Salmonella sp	2,458	NAI
368	Salmonella	Salmonella sp	2,299	NAI
369	Staphylococcus aureus	Staphylococcus aureus	2,239	NAI
370	Staphylococcus aureus	Staphylococcus aureus	2,284	NAI
371	Staphylococcus aureus	Staphylococcus aureus	2,244	NAI
372	Staphylococcus aureus	Staphylococcus aureus	2,289	NAI
373	Staphylococcus aureus	Staphylococcus aureus	2,316	NAI
374	Staphylococcus aureus	Staphylococcus aureus	2,362	NAI
375	Staphylococcus aureus	Staphylococcus aureus	2,335	NAI
376	Staphylococcus aureus	Staphylococcus aureus	2,382	NAI
377	Staphylococcus aureus	Staphylococcus aureus	2,337	NAI
378	Staphylococcus aureus	Staphylococcus aureus	2,384	NAI
379	Staphylococcus aureus	Staphylococcus aureus	2,339	NAI
380	Staphylococcus aureus	Staphylococcus aureus	2,386	NAI
381	Staphylococcus spp	Staph.epidermidis	1,918	NAI
382	Staphylococcus spp	Staph.epidermidis	1,880	NAI
383	Staphylococcus spp	Staph.epidermidis	2,011	NAI
384	Staphylococcus spp	Staph.epidermidis	2,051	NAI
385	Staphylococcus spp	Staph.epidermidis	2,179	NAI
386	Staphylococcus spp	Staph.epidermidis	2,136	NAI
387	Staphylococcus spp	Staphylococcus sciuri	2,067	NAI
388	Staphylococcus spp	Staphylococcus sciuri	2,026	NAI
389	Staphylococcus spp	Staphylococcus warneri	1,985	NAI
390	Staphylococcus spp	Staphylococcus warneri	1,946	NAI
391	Staphylococcus spp	Staphylococcus warneri	2,086	NAI
392	Staphylococcus spp	Staphylococcus warneri	2,045	NAI
393	Staphylococcus spp	Staphylococcus warneri	2,097	NAI
394	Staphylococcus spp	Staphylococcus warneri	2,056	NAI
395	Staphylococcus spp	Staphylococcus warneri	2,125	NAI
396	Staphylococcus spp	Staphylococcus warneri	2,083	NAI
397	Staphylococcus spp	Staphylococcus warneri	2,163	NAI
398	Staphylococcus spp	Staphylococcus warneri	2,121	NAI
399	Staphylococcus spp	Staphylococcus xylosus	2,030	NAI
400	Staphylococcus spp	Staphylococcus xylosus	1,990	NAI

Πίνακας 6.3.1 : Αναγράφεται ο μικροοργανισμός με το καλύτερο σκορ και ελέγχεται η συμφωνία ή μη των αποτελεσμάτων των τεχνικών που εξετάζονται.

Παρατηρείται συμφωνία 99,5 % των δύο μεθόδων με μόνη διαφοροποίηση το δείγμα με τους αύξοντες αριθμούς 365-366, όπου με τις μεθόδους κλασσικής μικροβιολογίας ανιχνεύθηκε η *Listeria spp.*, ενώ το MALDI – TOF ανίχνευσε *Listeria monocytogenes*.

7. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Η εφαρμογή του συστήματος HACCP στη βιομηχανία παροχής τροφίμων (food service industry) είναι αναγκαία, καθώς ένα μεγάλο μέρος των επιδημιών των τροφικών δηλητηριάσεων προέρχεται από τις επιχειρήσεις που ανήκουν σε αυτή. Ως εκ τούτου, αναδεικνύεται ως πλέον σημαντική, η αδιαμφισβήτητη ασφάλεια των προσφερόμενων τροφίμων.

Στα πλαίσια της εν λόγω έρευνας εξήχθησαν συμπεράσματα για την εφαρμογή των μεθόδων της κλασσικής μικροβιολογίας και της σύγχρονης μοριακής μεθόδου MALDI-TOF με σκοπό τη σύγκριση των αποτελεσμάτων και την αποτίμηση των πλεονεκτημάτων και μειονεκτημάτων των μεθόδων αυτών, ως εργαλεία στο τομέα της μικροβιολογίας τροφίμων.

Η διαδικασία επιλογής της κατάλληλης μεθόδου πρέπει να εξετάζει τα βασικά κριτήρια της ευαισθησίας της ανάλυσης, του χρόνου της ανίχνευσης και της εξειδίκευσης της δοκιμής. Ο ακρογωνιαίος λίθος της κάθε μεθόδου είναι η ακρίβειά της, γεγονός που εξαρτάται από την ευαισθησία και την ειδικότητα της. Η πρόθεση για την ανάπτυξη μιας ταχείας δοκιμασίας είναι να μειωθεί ο χρόνος που απαιτείται για να ληφθεί ένα ακριβές αποτέλεσμα (Rapid methods for the detection of foodborne pathogens: current and next-generation technologies, Feng P 2007) (Jasson V et.al, 2010).

Οι τυποποιημένες μέθοδοι (μέθοδοι ISO) συνήθως θεωρούνται ως οι αναλυτικές μέθοδοι αναφοράς για τους επίσημους ελέγχους. Στις περισσότερες περιπτώσεις, αυτές είναι οι παραδοσιακές μέθοδοι καλλιέργειας που χρησιμοποιούν εκλεκτικά υγρά ή στερεά θρεπτικά υλικά, με σκοπό την ανάπτυξη, απομόνωση και απαρίθμηση του μικροοργανισμού στόχου με τη ταυτόχρονη απόκλιση ανάπτυξης άλλων μικροοργανισμών που τυχόν να υπάρχουν στο τρόφιμο. Οι παραδοσιακές μέθοδοι καλλιέργειας μπορεί να απαιτούν πολλές ημέρες και τα αποτελέσματα δεν είναι άμεσα διαθέσιμα για αξιολόγηση, ωστόσο εξασφαλίζουν τη βιωσιμότητα των κυττάρων για επιβεβαίωση και περαιτέρω χαρακτηρισμό.

Από την άλλη, η σύγχρονη μέθοδος MALDI-TOF προσφέρει εξαιρετική αναπαραγωγή των αποτελεσμάτων, η οποία μπορεί να επιτευχθεί ακόμα και σε τακτική βάση από άπειρους χρήστες χωρίς απαραίτητη εμπειρία. Η εύκολη και χαμηλού κόστους προετοιμασία του δείγματος, σε συνδυασμό με την ταχεία απόκτηση βάσεως δεδομένων TOF σε δευτερόλεπτα, επιτρέπει την ανάλυση εκατοντάδων δειγμάτων μέσα σε μια και μόνο ημέρα. Το λογισμικό του MALDI Biotyper, που χρησιμοποιείται στο εργαστήριο, εκτελεί όλα τα αναγκαία βήματα επεξεργασίας της βάσης δεδομένων και οδηγεί τα πρωταρχικά φάσματα σε λίστες κορυφών. Η λίστα φασμάτων αναφοράς για κάθε στέλεχος είναι αυτοματοποιημένη, αλλά το λογισμικό επιτρέπει και την επέμβαση κάποιου ειδικού. Επίσης, το συγκεκριμένο λογισμικό προσφέρει μια ποικιλία προηγμένων αλγορίθμων για τον χαρακτηρισμό των άγνωστων μικροοργανισμών, συμπεριλαμβανομένης της ομαδοποίησης και της κατασκευής φυλογενετικού δενδρογράμματος. Με το MALDI BioTyper επιτυγχάνεται συνήθως ταυτοποίηση σε επίπεδο γένους ή είδους, ενώ σε πολλές περιπτώσεις είναι δυνατή η διάκριση και διαφορετικών ειδών μικροβιακών στελεχών. Επομένως ακόμη και στην περίπτωση που δεν βρίσκει ακριβώς το είδος σίγουρα προσφέρει περισσότερες πληροφορίες για το μικροοργανισμό-στόχο, κυρίως στην περίπτωση

ανεύρεσης του γένους στην οποία δεν σφάλει. Συγκεκριμένα, στην περίπτωση των coliforms διαπιστώνεται, όπως φαίνεται και στην ενότητα των αποτελεσμάτων, ποιο συγκεκριμένο coliform ανιχνεύεται στο δείγμα που αναλύεται. Εν τούτοις, στις μεθοδολογίες iso δεν απασχολεί η εύρεση του είδους, αλλά η εξακρίβωση της απουσίας των coliforms ή η ύπαρξη αυτών σε χαμηλούς πληθυσμούς ανάλογα με το δείγμα, καθώς αποτελούν δείκτη υγιεινής για τα τρόφιμα. Σημαντικό κρίνεται το γεγονός πως στην περίπτωση ανίχνευσης του *Staphylococcus aureus* το MALDI είναι αλάνθαστο. Ακόμη, με πολύ χαμηλό κόστος ανάλυσης δίνεται η δυνατότητα στον αναλυτή να ελέγξει και την υπόλοιπη χλωρίδα του τρυβλίου και όχι μόνο την ύπαρξη ενός και μόνο μικροοργανισμού όπως συμβαίνει στην περίπτωση των εκλεκτικών θρεπτικών υλικών (Smyth EG et al) (Golledge C et al) (Mlynarczyk G et al) (Luijendijk A et al) (Vandenesch F et al).

Από την άλλη, όμως, το MALDI παρουσιάζει δυσκολίες στη διάκριση μεταξύ της *Listeria monocytogenes* και *innocua*, *Klebsiella oxytoca* και *Raoultella ornitholytica*, ενώ ενδεχομένως να μπερδεύει το *Enterobacter cloacae* με το *asburiae*, *hormanaeaei*, *kobei*, *ludwigii* και *nimipressuralis*. Επιπροσθέτως, το MALDI-TOF έχει τη δυνατότητα να διακρίνει τον *Staphylococcus aureus* με το *warneri*, ωστόσο υπάρχει ένα ποσοστό της τάξεως του 5% ένας *aureus* να είναι θετικός στο τεστ της πηκτάσης και ο αναλυτής να θεωρήσει πως είναι *warneri*.

Στη συγκεκριμένη έρευνα όλα τα δείγματα που αποτελούν το αντικείμενό της, λήφθηκαν από εταιρείες που εφαρμόζουν το σύστημα HACCP, αλλά με διαφορετικό επίπεδο αυστηρότητας η καθεμία πάντα σε σχέση με το πρότυπο. Το σημαντικότερο, ωστόσο, εύρημα αυτής της μελέτης είναι ότι η εφαρμογή του HACCP συμβάλλει στην παραγωγή ασφαλών τροφίμων για τους καταναλωτές και όσο αυστηρότερη είναι η λειτουργία του συστήματος σε σχέση με τα ισχύοντα πρότυπα, τόσο υψηλότερο είναι το ποσοστό υγιεινής και ασφάλειας. Με την εφαρμογή του συστήματος αυτού εξασφαλίζεται η υγιεινή και η ασφάλεια των τροφίμων που καταναλώνονται από τους εκάστοτε σερβιριζόμενους των εταιρειών. Εξ' άλλου δεν είναι λίγες οι μελετές οι οποίες μνημονεύουν συνεχώς τόσο την αναγκαιότητα όσο και τα οφέλη της εφαρμογής ενός συστήματος HACCP, στου οποίου την προώθηση έχει παίξει σημαντικό ρόλο ο WHO (Motarjemi et al, 1996).

Άξιο σχολιασμού στην εν λόγω μελέτη είναι η παρουσία *Salmonella* σε πέντε από τα δείγματα που εξετάστηκαν. Εντούτοις, η πληθώρα των δειγμάτων, 390 σε αριθμό βρέθηκαν αρνητικά στην *Salmonella*, γεγονός αρκετά ενθαρρυντικό. Μιας και τα μικρόβια του γένους *Salmonella* είναι παθογόνα για τον άνθρωπο και η νομοθεσία επιβάλλει την πλήρη απουσία τους από τα τρόφιμα, το εύρημα αυτό θεωρείται μείζονος σημασίας. Στις Ηνωμένες Πολιτείες η σαλμονέλωση είναι η δεύτερη κύρια αιτία τροφιμογενών λοιμώξεων και η μεγάλη πλειοψηφία αυτών των λοιμώξεων σχετίζεται με την κατανάλωση προϊόντων όπως το κρέας, τα πουλερικά, τα αυγά, το γάλα, και τα θαλασσινά. Αυτό μπορεί να σχετίζεται με το γεγονός ότι η κατά κεφαλήν κατανάλωση κρέατος πουλερικών στις Ηνωμένες Πολιτείες έχει αυξηθεί σημαντικά κατά τον τελευταίο αιώνα. Σε ότι αφορά το κρέας και τα προϊόντα πουλερικών, υπήρξε μια σχεδόν εξαπλάσια αύξηση της κατανάλωσης κοτόπουλου. Επίσης η κατά κεφαλήν κατανάλωση χοιρινού κρέατος έχει αυξηθεί κατά 18,7 – 21,7 kg / έτος (Foley et al, 2008). Από την άλλη, όπως αναφέρει και το ECDC υπάρχει μια πτωτική τάση της

σαλμονέλωσης στον Ευρωπαϊκό Οικονομικό Χώρο Ε.Ε (ΕΟΧ) κατά την περίοδο πέντε ετών από το 2009 έως και το 2013, παρόλο που αν αναλυθεί σε μηνιαία βάση δεν είναι στατιστικά σημαντική. Σε γενικές γραμμές δεν υπάρχει καμία σημαντική αλλαγή όσον αφορά τα τρόφιμα στα οποία ανιχνεύεται *Salmonella* σε σύγκριση με τα προηγούμενα έτη. Ολοένα και περισσότερο τείνει να ανιχνεύεται στο κρέας των πουλερικών, και λιγότερο συχνά σε χοιρινό ή βόειο κρέας, ενώ παρατηρείται μείωση του επιπολασμού της σαλμονέλας σε όλους τους πληθυσμούς των πουλερικών. Η συνεχιζόμενη μείωση του αριθμού των κρουσμάτων σαλμονέλωσης στον άνθρωπο είναι πιθανό να σχετίζεται κυρίως με τα επιτυχή προγράμματα ελέγχου της σαλμονέλας στα πουλερικά (*Gallus gallus*), αν και άλλα μέτρα ελέγχου κατά μήκος της τροφικής αλυσίδας θα μπορούσαν επίσης να έχουν συμβάλει στη μείωση. Η πλειονότητα των κρατών μελών έχει επιτύχει τους στόχους για τη μείωση της σαλμονέλας στα σμήνη αναπαραγωγής, ωτόκες όρνιθες και στα κοτόπουλα κρεατοπαραγωγής. Ο επιπολασμός σε επίπεδο Ε.Ε των οροτύπων στόχος που μειώθηκε περαιτέρω σε όλους τους πληθυσμούς των πουλερικών, δείχνει ότι εξακολουθεί να γίνεται πρόοδος στην καταπολέμηση αυτών των οροτύπων σαλμονέλας.

Σχετικά με το μικροβιακό παράγοντα *Listeria monocytogenes* η μόλυνση των έτοιμων προς κατανάλωση προϊόντων μπορεί να συμβεί σε διάφορα στάδια πριν από την κατανάλωση. Πιθανές αιτίες επιμόλυνσης από το μικροοργανισμό μπορεί να είναι το περιβάλλον, οι χειριστές τροφίμων, οι εισερχόμενες πρώτες ύλες ή ακόμη και μεταποιημένα προϊόντα που έχουν μολυνθεί στις εγκαταστάσεις παραγωγής και χρησιμοποιούνται για την παρασκευή άλλων προϊόντων (Lianou & Sofos, 2007).

Ακόμη, τα *Coliforms* (για προϊόντα γάλατος-παγωτού) και η *E.coli* (κυρίως εντεροπαθογόνα στελέχη), αποτελούν δείκτες μικροβιολογικής υγιεινής και όχι μικροβιολογικής ασφάλειας δεδομένου ότι οι πληθυσμοί τους πρέπει να ανέλθουν σε πολύ υψηλά επίπεδα, μεγαλύτερα των 5×10^5 cfu/gr, ώστε να υπάρξουν επιπτώσεις στην υγεία του καταναλωτή. Αντίθετα, όσον αφορά τα τροφογενή παθογόνα όπως *Salmonella* και *Listeria monocytogenes*, μικροί πληθυσμοί αυτών αρκούν για να προκαλέσουν επιπτώσεις στην υγεία του καταναλωτή. Η παρουσία τους, σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (ανάλογα και με τις κατευθυντήριες γραμμές που καθορίζονται σε κάθε περίπτωση), υποδηλώνει μη τήρηση των ορθών πρακτικών υγιεινής κατά την παραγωγή (ατομική υγιεινή εργαζομένων-προγράμματα εξυγίανσης χώρων παραγωγής) και σε αρκετές περιπτώσεις θερμοκρασιακή κακοποίηση η οποία επιτρέπει και τον πολλαπλασιασμό τους σε υψηλά και πιθανόν τοξικά επίπεδα. Σύμφωνα με την EFSA και το ECDC μέσα στο 2013 αναφέρθηκαν συνολικά 62 κρούσματα σε ανθρώπους οφειλόμενα σε *E. Coli* (συμπεριλαμβανομένης της VTEC), εκ των οποίων τα 12 είχαν ισχυρά αποδεικτικά στοιχεία. Το κύριο μέσο μετάδοσης ήταν το βόειο κρέας και τα προϊόντα του, ακολουθούμενο από λαχανικά, χυμούς και το τυρί. Το ποσοστό κοινοποίησης των λοιμώξεων του ανθρώπου από VTEC αυξήθηκε το 2013 σε σύγκριση με το 2012. Το γεγονός συτό ενδεχομενως να οφείλεται σε αύξηση της ευαισθητοποίησης των περισσότερων εργαστηρίων για τις δοκιμές σε περισσότερες οροομάδες, καθώς και σε μια μετατόπιση των διαγνωστικών μεθόδων σε πιο ευαίσθητες, όπως η PCR που χρησιμοποιείται όλο και περισσότερο για την ανίχνευση του VTEC σε δείγματα κοπράνων (EFSA & ECDC, 2015).

Εφόσον τα περισσότερα κρούσματα τροφιμογενών ασθενειών προκύπτουν από λανθασμένες πρακτικές χειρισμού των τροφίμων, γενικά υποστηρίζεται ότι η εκπαίδευση των χειριστών τροφίμων θα μπορούσε να συμβάλει σημαντικά στην πρόληψη και τον έλεγχό τους. Η αποτελεσματικότητα της κατάρτισης για την υγιεινή των χειριστών τροφίμων σε όλα τα επίπεδα της τροφικής αλυσίδας τόσο στις ανεπτυγμένες όσο και στις αναπτυσσόμενες χώρες εξετάστηκε σε μια μελέτη των Ehirι και συνεργατών (1995). Επίσης μια άλλη μελέτη που έγινε στην Τουρκία, έδειξε ότι οι χειριστές στις τουρκικές επιχειρήσεις τροφίμων συχνά έχουν έλλειψη γνώσεων όσον αφορά τη βασική υγιεινή των τροφίμων. Η μελέτη περιελάμβανε προσωπική συνέντευξη και συμπλήρωση ερωτηματολογίου. Από τους 764 χειριστές τροφίμων που ανταποκρίθηκαν, η πλειοψηφία (47,8%) δεν είχε λάβει βασική εκπαίδευση για την ασφάλεια των τροφίμων. Ως εκ τούτου, κρίνεται επιτακτική η ανάγκη εκπαίδευσης και συνάμα ευαισθητοποίησης των χειριστών σχετικά με τις πρακτικές χειρισμού με σκοπό την κατανάλωση ασφαλών τροφίμων (Bas et al, 2007). Σε ανασκόπηση της επιστημονικής βιβλιογραφίας για την περίοδο 1975-1998, εντοπίστηκαν άρθρα που περιγράφουν τα κρούσματα τροφιμογενών ασθενειών που θεωρείται ότι έχουν προκύψει από τη μόλυνση των τροφίμων μέσω των εργαζομένων. Στο σύνολο των περιπτώσεων, ήτοι 93%, οι ίδιοι οι εργαζόμενοι ήταν άρρωστοι είτε πριν είτε κατά τη διάρκεια εμφάνισης των κρουσμάτων, ενώ στις υπόλοιπες περιπτώσεις θεωρείται πως η πηγή των λοιμώξεων ήταν ασυμπτωματικοί εργαζόμενοι (Ross & Guzewich, 1999).

Σε μια άλλη μελέτη που διεξήχθη στην Τουρκία, προσδιορίστηκε η συχνότητα εμφάνισης του *S. aureus* σε έτοιμα προς κατανάλωση (RTE) γεύματα από στρατιωτική καφετέρια στην Άγκυρα. Δείγματα όπως σαλάτες λαχανικών, ρώσικη σαλάτα και κεφτεδάκια τα οποία απαιτούν περισσότερο χειρισμό από το προσωπικό, είχαν σημαντικά περισσότερες πιθανότητες να περιέχουν *S. aureus* σε υψηλότερα επίπεδα σε σχέση με τρόφιμα τα οποία δεν απαιτούσαν τόσους ανθρώπινους χειρισμούς όπως λόγου χάρη χάμπουργκερ, πίτσα και Doner. Αυτά τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι οι χειριστές τροφίμων μπορούν να συμβάλουν σημαντικά στην μόλυνση και πως υπάρχουν ορισμένες πρακτικές χειρισμού που απαιτούν περισσότερη προσοχή (Aycicek et al, 2005). Σε μια άλλη μελέτη που πραγματοποιήθηκε στη Νιγηρία, από τα 880 δείγματα έτοιμων προς κατανάλωση τροφίμων που εξετάστηκαν και περιείχαν κρέας, ψάρι και λαχανικά, τους μικρότερους αριθμούς *S. aureus* περιείχαν τα τρόφιμα που περιλάμβαναν καθόλου ή λίγη μετα-επεξεργασία από τον άνθρωπο. Επιπροσθέτως, όσα δείγματα νερού από τα κέντρα προετοιμασίας τροφίμων είχαν έρθει σε επανηλημμένη επαφή με ανθρώπινα χέρια κατά τη διάρκεια της παρασκευής τροφίμων ήταν θετικά σε *S. aureus* (Sokari, 1991).

Με την ολοκλήρωση της εν λόγω έρευνας και την ανάλυση όλων των παραπάνω αποτελεσμάτων και γραφημάτων που εξήχθησαν από αυτά, παρατηρείται 99,5 % συμφωνία των δύο μεθόδων, με μόνη εξαίρεση την περίπτωση της *Listeria* spp η οποία ταυτοποιήθηκε από το MALDI- TOF ως *Listeria monocytogenes*, γεγονός που δεν αποτελεί κάτι το αξιοσημείωτο καθότι μπορεί να υπάρξει σύγχυση στο διαχωρισμό των δύο ειδών από την εφαρμογή της συγκεκριμένης μεθόδου. Εντούτοις, η ταυτοποίηση της *Listeria* από τις μεθόδους iso είναι σε όλες τις περιπτώσεις πολύ αξιόπιστη και δεν απαιτείται η χρήση MALDI- TOF. Ένα άλλο συμπέρασμα το οποίο μπορεί να εξαχθεί από τη μελέτη του γραφήματος 3, αφορά στην αξιοπιστία των αποτελεσμάτων της έρευνας, μια και ο μέσος

όρος των σκορ για κάθε μικροοργανισμό που ταυτοποιήθηκε μέσω της μεθόδου αυτής είναι 2,250 με ελάχιστο 1,811 και με μέγιστο 2,547. Η αξιοπιστία των αποτελεσμάτων του MALDI-TOF σε συνδυασμό με τη συμφωνία των δεδομένων μας οδηγεί εύλογα στην επικύρωση της αξιοπιστίας και των αποτελεσμάτων από την εφαρμογή των μεθόδων iso. Τα σκορ που σημειώθηκαν θεωρούνται υψηλά για τη μοριακή ανίχνευση και δεν επιδέχονται αμφιβολία.

Συνοψίζοντας, η επιλογή της όποιας μεθόδου για την εξαγωγή των αποτελεσμάτων άπτεται μια σειράς πολυπαραγοντικών δεδομένων, την οποία καλείται να εξετάσει και να αξιολογήσει το εκάστοτε εργαστήριο ή αναλυτής με σκοπό την εφαρμογή της καταλληλότερης ανά περίπτωση αρκεί να τονισθεί πως στο δεδομένο dataset παρουσιάζεται πλήρης συμφωνία των αποτελεσμάτων.

8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Motarjemi, Y. & Käferstein, F.K. 1997. Global estimation of foodborne diseases. *World Health Statistics Quarterly*, 50(1-2): 5-11.
2. Käferstein, F.K. 1997. Food safety: a commonly underestimated public health issue. Introduction. *World Health Statistics Quarterly*, 50(1-2): 3-4.
3. Foodborne Pathogens, Gabriella Kisko, Corvinus University of Budapest, Department of Microbiology and Biotechnology
4. Food microbiology / M.R. Adams and M.O. Moss
5. 2000 The Microbiology of safe food / S. J. Forsythe
6. Μικροβιολογία τροφίμων : βακτήρια-ζύμες-μύκητες, Μπαλατσούρας Γεώργιος, 1992
7. Αρσένης Α., (1994), Κλινική Μικροβιολογία και Εργαστηριακή Διάγνωση Λοιμώξεων, τόμοι 1 και 2, Ζήτα Ιατρικές Εκδόσεις
8. Αρβανιτογιάννης Ι., Σάνδρου Δ., Κούρτης Λ., (2001), Ασφάλεια τροφίμων: εφαρμογή της ανάλυσης επικινδυνότητας και κρίσιμων σημείων ελέγχου (HACCP) στις βιομηχανίες τροφίμων και ποτών. Θεσσαλονίκη: University Studio Press.
9. EFSA REPORT 2013-ZOONOTIC AGENTS
10. Medical Microbiology, 4th edition, Chapter 41, Editor: Samuel Baron, University of Texas Medical Branch at Galveston, Galveston, Texas
11. Διαφάνειες μαθήματος <<Τεχνικές Ανάλυσης Τροφίμων>>, του τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης
12. Αμβροσιάδης Ι., (2005), Εφαρμογή και έλεγχος του συστήματος HACCP, εκδοτικός οίκος Σύγχρονη Παιδεία
13. Τζιά, Κ. και Τσιαπούρης, Α. (1996) Ανάλυση Επικινδυνότητας στα κρίσιμα σημεία ελέγχου (HACCP) στη βιομηχανία τροφίμων, Εκδ. Παπασωτηρίου, Αθήνα
14. Ζαμπετάκης Γ., Γδοντέλης Ν., (2006), HACCP ΑΠΟ ΤΟ Η ΕΩΣ ΤΟ Ρ, Οδηγός Ασφάλειας Τροφίμων, ISO 22000, Νομοθεσία
15. Forsythe S.J. and Hayes P.R. "Food Hygiene, Microbiology and HACCP"- An Aspen Publication (3rd edition)
16. Δημητροπούλου - Θεοδώρου Ε., (2008), Στοιχεία δικαίου- Δημόσιας υγιεινής (εισαγωγή στο Δίκαιο και στη Νομοθεσία Δημόσιας Υγείας και Υγιεινής), κεφάλαιο Β΄
17. Food hygiene, microbiology and HACCP / S.J. Forsythe and P.R. Hayes, 1998
18. HACCP : a practical approach / Sara Mortimore, Carol Wallace 1998
19. Τζιά Κωνσταντίνα, Παππά Φλωρεντία – “Ανάλυση Επικινδυνότητας στα Κρίσιμα Σημεία Ελέγχου (HACCP) σε Χώρους Μαζικής Εστίασης” – (2005) Εκδόσεις Παπασωτηρίου
20. Codex Committee on Food Hygiene (1993). Guidelines for the Application of the HACCP
21. Μπόσκου Γ.(2006), Η ασφάλεια τροφίμων στη μαζική εστίαση: προβλήματα και προοπτικές, Περιοδικό της Ποιότητας ECO-Q, 59 Οκτ., 33-37

22. Stannard C (1997) Development and use of microbiological criteria for foods. *Food Sci Technol Today* 11:137–177.
23. Bhunia AK (2008) Biosensors and bio-based methods for the separation and detection of food-borne pathogens. *Adv Food Nutr Res* 54:1–44.
24. Jantzen MM, Navas J, Corujo A, Moreno R, Lopez V, Martinez-Suarez JV (2006a) Review. Specific detection of *Listeria monocytogenes* in foods using commercial methods: from chromogenic media to real-time PCR. *Span J Agric Res* 4:235–247.
25. Betts R, Blackburn CW (2009) Detecting pathogens in food. In: *Foodborne pathogens: hazards, risk analysis and control*, 2nd edn. Edited by: Blackburn CW, McClure PJ. Woodhead Publishing, Oxford, UK. pp. 17–65.
26. Feng P (2007) Rapid methods for the detection of foodborne pathogens: current and next-generation technologies. In: *Food microbiology, fundamentals and frontiers*, 3rd edn. Edited by: Doyle MP, Beuchat LR. ASM Press, Washington, D.C. pp 911–934.
27. Jasson V, Jacxsens L, Luning P, Rajkovic A, Uyttendaele M (2010) Review. Alternative microbial methods: An overview and selection criteria. *Food Microbiol* 27:710–730.
28. Jantzen MM, Navas J, de Paz M, Rodríguez B, da Silva WP, Nuñez M, Martínez-Suárez JV (2006b) Evaluation of ALOA plating medium for its suitability to recover high pressure-injured *Listeria monocytogenes* from ground chicken meat. *Lett Appl Microbiol* 43:313–317.
29. Wu VCH (2008) A review of microbial injury and recovery methods in food. *Food Microbiol* 25:735–744.
30. Stevens KA, Jaykus LA (2004) Bacterial separation and concentration from complex sample matrices: A review. *Crit Rev Microbiol* 30:7–24.
31. Chen WT, Hendrickson RL, Huang CP, Sherman D, Geng T, Bhunia AK, Ladisch MR (2005) Mechanistic study of membrane concentration and recovery of *Listeria monocytogenes*. *Biotechnol Bioeng* 89:263–273.
32. Hunter DM, Leskinen SD, Magaña S, Schlemmer SM, Lim DV (2011) Dead-end ultrafiltration concentration and IMS/ATP-bioluminescence detection of *Escherichia coli* O157:H7 in recreational water and produce wash. *J Microbiol Methods* 87:338–342.
33. Καραγκούνη – Κύρτσου, Αμαλία Δ.: Μικροβιολογία, Εκδόσεις Σταμούλη
34. A. K. Leung, R. Newman, A. Kumar, H. D. Davies. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 6, 761 (2006).
35. N. Johansson, M. Kalin, C. G. Giske, J. Hedlund. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 60, 255 (2008).
36. P. G. Klein, V. K. Juneja. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 4441 (1997).
37. F. Han, B. Ge. *Foodborne Pathog. Dis.* 5, 311 (2008).
38. A. K. Bhunia. *Adv. Food Nutr. Res.* 54, 1 (2008).
39. M. A. Moreira, M. C. Luvizotto, J. F. Garcia, C. E. Corbett, M. D. Laurenti. *Vet. Parasitol.* 145, 245 (2007).
40. A. Rompre, P. Servais, J. Baudart, M. R. de-Roubin, P. Laurent. *J. Microbiol. Methods* 49, 31 (2002).

41. A. K. Bej, S. C. McCarty, R. M. Atlas. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 2429 (1991)
42. C. Vandenvelde, M. Verstraete, D. Van Beers. *J. Virol. Methods* 30, 215 (1990)
43. Novel food pathogen testing technologies: molecular biology methods, Aleksandra Martinovic, Hilde Marit Ostlie, Siv Borghild Skeie
44. S. Kawasaki, P. M. Fratamico, N. Horikoshi, Y. Okada, K. Takeshita, T. Sameshima, Kawamoto. *Foodborne Pathog. Dis. Vol.*, pg. nos. (2008)
45. Powledge, Tabitha M., 2004. The polymerase chain reaction. *Advan Physiol Educ* 28, 44-50.
46. K. T. Lu, H. Y. Cheng, C. F. Lo, H. C. Chang, J. H. Lin. *Planta Med.* 73, 1322 (2007)
47. C. S. Teh, K. H. Chua, S. D. Puthucheary, K. L. Thong. *Jpn. J. Infect. Dis.* 61, 313 (2008)
48. de Boer, Enne, Beumer, R.R. 1999. Methodology for detection and typing of foodborne microorganisms. *International Journal of Food Microbiology* 50, 119–130.
49. Barbour, W.M., Tice, G., 1997. Genetic and immunologic techniques for detecting foodborne pathogens and toxins. In: Doyle, M.P., Beuchat, L.R., Montville, T.J. (Eds.), *FoodMicrobiology, Fundamentals and Frontiers*, ASM Press, Washington DC, 710–727.
50. K. Porter-Jordan, E. I. Rosenberg, J. F. Keiser, J. D. Gross, A. M. Ross, S. Nasim, C. T. Garrett. *J. Med. Virol.* 30, 85 (1990)
51. O. Olsvik, E. Rimstad, E. Hornes, N. Strockbine, Y. Wasteson, A. Lund, K. Wachsmuth. *Mol. Cell Probes* 5, 429 (1991)
52. D. Kim, S. R. Kim, K. S. Kwon, J. W. Lee, M. J. Oh. *J. Microbiol.* 46, 436 (2008)
53. S. D. Saroj, R. Shashidhar, M. Karani, J. R. Bandekar. *Mol. Cell Probes* 22, 201 (2008)
54. S. S. Klemsdal, O. Elen. *Lett. Appl. Microbiol.* 42, 544 (2006)
55. M. M. Picken, R. N. Picken, D. Han, Y. Cheng, F. Strle. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 15, 489 (1996)
56. V. K. Sharma. *Mol. Cell Probes* 20, 298 (2006)
57. M. Gilgen, B. Wegmuller, P. Burkhalter, H. P. Buhler, U. Muller, J. Luthy, U. Candrian. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 1226 (1995)
58. C. Arnal, V. Ferre-Aubineau, B. Mignotte, B. M. Imbert-Marcille, S. Billaudel. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 322 (1999)
59. J. Hewitt, G. E. Greening. *J. Food Prot.* 69, 2217 (2006)
60. D. Wang, Q. Wu, L. Yao, M. Wei, X. Kou, J. Zhang. *Lett. Appl. Microbiol.* 47, 405 (2008)
61. C. A. Heid, J. Stevens, K. J. Livak, P. M. Williams. *Genome Res.* 6, 986 (1996).
62. F. Long, X. N. Zhu, Z. M. Zhang, X. M. Shi. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 62, 374 (2008)
63. S. T. Lambertz, C. Nilsson, S. Hallanvuori. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 6465 (2008)
64. A. Houde, E. Guevremont, E. Poitras, D. Leblanc, P. Ward, C. Simard, Y. L. Trottier. *J. Virol. Methods* 140, 80 (2007)
65. S. Sandhya, W. Chen, A. Mulchandani. *Anal. Chim. Acta* 614, 208 (2008)

66. E. Churruca, C. Girbau, I. Martinez, E. Mateo, R. Alonso, A. Fernandez-Astorga. *Int. J. Food Microbiol.* 117, 85 (2007)
67. S. H. Aliyu, M. H. Aliyu, H. M. Salihu, S. Parmar, H. Jalal, M. D. Curran. *J. Clin. Virol.* 30, 191 (2004)
68. G. J. Rensen, W. L. Smith, C. V. Jaravata, B. Osburn, J. S. Cullor. *Foodborne Pathog. Dis.* 3, 337 (2006)
69. S. Zhou, Z. Hou, N. Li, Q. Qin. *J. Appl. Microbiol.* 103, 1897 (2007)
70. N. Casas, F. Amarita, I. M. de Maranon. *Int. J. Food Microbiol.* 120, 179 (2007)
71. H. M. Nam, V. Srinivasan, S. E. Murinda, S. P. Oliver. *Foodborne Pathog. Dis.* 2, 160 (2005)
72. D. F. Woods, F. J. Reen, D. Gilroy, J. Buckley, J. G. Frye, E. F. Boyd. *J. Clin. Microbiol.* 46, 4018 (2008)
73. H. Schonenbrucher, A. Abdulmawjood, K. Failing, M. Bulte. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 2751 (2008)
74. E. O'Regan, E. McCabe, C. Burgess, S. McGuinness, T. Barry, G. Duffy, P. Whyte, S. Fanning. *BMC Microbiol.* 8, 156 (2008)
75. P. G. Klein, V. K. Juneja. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 4441 (1997)
76. Compton, J. 1991. Nucleic acid sequence-based amplification. *Nature* 350, 91-92.
77. Deiman, B., van Aarle, P., Sillekens, P. 2002 Characteristics and applications of nucleic acid sequence-based amplification (NASBA). *Mol. Biotechnol.* 20, 163-179.
78. Rodríguez-Lázaro, D., Hernández, M., 2006. Molecular methodology in food microbiology diagnostics: trends and current challenges, IUFoST 2006 DOI: 10.1051/IUFoST:20060643, Article available at <http://iufost.edpsciences.org> or <http://dx.doi.org/10.1051/IUFoST:20060643>
79. Chan, A.B., Fox, J.D. 1999. NASBA and other transcription - based amplification methods for research and diagnostic microbiology. *Rev. in Med. Microbiol.*, 10, 185-196.
80. Hoorfar, J., Malorny, B., Abdulmawjood, A., Cook, N., Wagner, M., Fach, P., 2004. Practical considerations in design of internal amplification control for diagnostic PCR assays. *J. Clin. Microbiol.* 42, 1863-1868.
81. Wiedmann, M., 2002. Molecular subtyping methods for *Listeria monocytogenes*.
82. J. A Swaminathan, B., Feng, P., 1994. Rapid detection of food-borne pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 48, 401-426.
83. Bruce, J. 1996. Automated system rapidly identifies and characterizes microorganisms in food. *Food technology*, 50, 77-81.
84. Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Rijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., Zabeau, M., 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acid Res.* 23, 4407-4414.
85. Lazcka, O., Del Campo, F. J., Muñoz, X. 2007. Pathogen detection: A perspective of traditional methods and biosensors – a review. *Biosensors and bioelectronics*, 22: 1205-1217.

86. Pimbley, D.W., Patel, P.D., 1998. A review of analytical methods for the detection of bacterial toxins. *J. Appl. Microbiol. Symp. Suppl.* 84, 98S–109S.
87. Lu, H., Zhao, Y., Ma, J., Li, W., Lu, Z. 2000. *Coll. Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects* 175,147.
88. Swaminathan, B., Feng, P., 1994. Rapid detection of food-borne pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 48, 401–426.
89. Tillib, S.V. and Mirzabekov, A.D. 2001. Advances in the analysis of DNA sequence variations using oligonucleotide microchip technology. *Curr. Opin. Biotechnol.* 12: 53-58.
90. Adams, I.P., Glover, R.H., Monger, W.A., Mumford, R., Jackeviciene, E., Navalinskiene, M., Samuitiene, M., Boonham, N. 2009. Next-generation sequencing and metagenomic analysis: a universal diagnostic tool in plant virology. *Molecular Plant Pathology* 4: 537-545.
91. Mandal, P.K., Biswas, A.K., Choi, K., Pal, U.K. 2011. Methods for rapid detection of foodborne pathogens: an overview. *American Journal of Food Technology*, 6: 87-102.
92. Kavita Arora, Subhash C., Malhotra, B. D. 2006. Recent developments in bio-molecular electronics techniques for food pathogens. *Analytica Chimica Acta* 568, 259–274.
93. Yoo, S. M., Keum, K. C., Yoo, S.Y., Choi, J.Y., Changa, K.H., Yoo, N.C., Yoo, W.M., Kim, J.M., Lee, D., Lee, S.Y. 2004. Development of DNA Microarray for Pathogen Detection. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 9:93-99.
94. Davis, F., Nabok, A.V., Higson, S.P.J. 2005. Species differentiation by DNA - modified carbon electrodes using an ac impedimetric approach, *Biosensors and Bioelectronics*, Vol 20,1531-1538.
95. Decristophoris P, Fasola A, Benagli C, Tonolla M, Petrini O. Identification of *Staphylococcus intermedius* Group by MALDI-TOF MS. *Syst Appl Microbiol* 2011; 34: 45-51.
96. Hijazin M, Hassan AA, Alber J et al. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) for species identification of bacteria of gen-era *Arcanobacterium* and *Trueperella*. *Veterinary Microbiol* 2012 ; 243-5.
97. Hinse D, Vollmer T, Erhard M et al. Differentiation of species of the *Streptococcus bovis/equinus*-complex by MALDI-TOF Mass Spectrometry in comparison to *sodA* sequence analyses. *Syst Appl Microbiol* 2011; 34: 52-7.
98. Dieckmann R, Graeber I, Kaesler I, Szewzyk U, von Döhren H. Rapid screening and dereplication of bacterial isolates from marine sponges of the Sula Ridge by Intact-Cell-MALDI-TOF mass spec-trometry (ICM-MS). *Appl Microbiol Biotechnol* 2005 ; 67: 539-48.
99. Munoz R, López-López A, Urdiain M, Moore ERB, Rosselló-Móra R. Evaluation of MALDI-TOF whole cell profiles to assess the cul-turable diversity of aerobic and moderately halophilic prokaryotes thriving in solar saltern sediments. *Syst Appl Microbiol* 2011; 34: 69-75.

100. Lottspeich F, Zorbas H, eds. *Bioanalytik*. Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg 1998
101. Seng, P., Drancourt, M., Gouriet, F., La Scola, B. et al., Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin. Infect. Dis.* 2009, 49, 543–551.
102. Bizzini, A., Greub, G., Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, a revolution in clinical microbial identification. *Clin. Microbiol. Infect.* 2010, 16, 1614–1619.
103. Welker, M., in Hays, J. P., van Leeuwen, W. B. (Eds.), *The Role of New Technologies in Medical Microbiological Research and Diagnosis*, Bentham Science Publishers Ltd., Bussum, NL 2011, eBook.
104. Vanlaere, E., Sergeant, K., Dawyndt, P., Kallow, W. et al., Matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry of intact cells allows rapid identification of *Burkholderia cepacia* complex species. *J. Microbiol. Methods* 2008, 75, 279–286.
105. Lartigue, M. F., Hery-Arnaud, G., Haguenoer, E., Domelier, A. S. et al., Identification of *Streptococcus agalactiae* isolates from various phylogenetic lineages by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* 2009
106. Sneath, P. H. A., The maintenance of large numbers of strains of microorganisms, and the implications for culture collections. *FEMS Microbiol. Lett.* 1977, 1, 333–334.
107. Rossello-Móra, R., Amann, R. I., The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.* 2001, 25, 39–67.
108. Pukall, R., in Stackebrandt, E. (Ed.), *Molecular Identification, Systematics, and Population Structure of Prokaryotes*, Springer, Heidelberg 2005, 52–82.
109. Πρωτόκολλα εργαστηριακών μεθόδων εργαστηρίου
110. ISO 11731: 1998
111. ISO 11290-1:1996(E)
112. ISO 11290-1:1996/Amd 1:2004
113. ISO 7218:2007
114. ISO 16649
115. Zenobi R, Knochenmuss R. Ion Formation in Maldi Mass Spectrometry. *Chem Rev* 1998; 17: 337-66.
116. Seng P, Drancourt M, Gouriet F, et al. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Infect Dis.* 2009; 49: 543-51.
117. La Scola, B., and Raoult, D. (2009). Direct identification of bacteria in positive blood culture bottles by matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry. *PLoS ONE* 4:e8041. doi:10.1371/journal.pone.0008041.
118. Stevenson, L. G., Drake, S. K., and Murray, P. R. (2010a). Rapid identification of bacteria in positive blood culture broths by matrix-assisted laser

- desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* 48, 444–447. doi: 10.1128/JCM.01541-09.
119. Foster, A. G. (2013). Rapid Identification of microbes in positive blood cultures by use of the vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system. *J. Clin. Microbiol.* 51, 3717–3719. doi: 10.1128/JCM.01679-13.
 120. Tadros, M., and Petrich, A. (2013). Evaluation of MALDI-TOF mass spectrometry and Sepsityper Kit™ for the direct identification of organisms from sterile body fluids in a Canadian pediatric hospital. *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.* 24,191–194.
 121. Stevenson, L. G., Drake, S. K., Shea, Y. R., Zelazny, A. M., and Murray, P. R. (2010b). Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of clinically important yeast species. *J. Clin. Microbiol.* 48, 3482–3486. doi: 10.1128/JCM.00687-09.
 122. Theel, E. S., Schmitt, B. H., Hall, L., Cunningham, S. A., Walchak, R. C., Patel, R., et al. (2012). Formic acid-based direct, on-plate testing of yeast and *Corynebacterium* species by Bruker Biotyper matrix-assisted laserdesorption ionization–time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* 50, 3093–3095. doi: 10.1128/JCM.01045-12.
 123. Cassagne, C., Pratlong, F., Jeddi, F., Benikhlef, R., Aoun, K., Normand, A. C., et al. (2014). Identification of *Leishmania* at the species level with matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin. Microbiol. Infect.* 20, 551–557. doi: 10.1111/1469-0691.12387.
 124. Motarjemi Y, Käferstein F, Moy G, Miyagawa S and Miyagishima K (1996). Importance of HACCP for public health and development the role of the world health organization. *Food control*, 7(2), 77-85.
 125. Foley S, Lynne A and Nayak R (2008). Challenges: Prevalence in swine and poultry and potential pathogenicity of such isolates. *Journal of animal science*, 86(14_suppl), E149-E162.
 126. Lianou A and Sofos J (2007). A review of the incidence and transmission of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat products in retail and food service environments. *Journal of Food Protection®*, 70(9), 2172-2198.
 127. European Food Safety Authority (EFSA) and European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) (2015). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. *EFSA Journal*, 13(1): 3991.
 128. Baş M Yüksel M and Çavuşoğlu T (2007). Difficulties and barriers for the implementing of HACCP and food safety systems in food businesses in Turkey. *Food Control*, 18(2), 124-130.
 129. Ross M and Guzewich J (1999). Evaluation of risks related to microbiological contamination of ready-to-eat food by food preparation workers and the effectiveness of interventions to minimize those risks. *FDA White Paper*, FDA, CFSAN.

130. Aycicek H, Cakiroglu S and Stevenson T (2005). Incidence of *Staphylococcus aureus* in ready-to-eat meals from military cafeterias in Ankara, Turkey. *Food Control*, 16(6), 531-534.
131. Sokari T (1991). Distribution of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in ready-to-eat foods in eastern Nigeria. *International journal of food microbiology*, 12(2), 275-279.
132. Smyth EG, Wright ED, Marples RR. New type of staphylococcal endocarditis. *J Clin Pathol* 1988;41:809–10. [PMC free article] [PubMed]
133. Golledge C, Gordon A. Slide coagulase positive, tube coagulase negative *Staphylococcus aureus*. *J Clin Pathol* 1989;42:443.
134. Mlynarczyk G, Kochman M, Lawrynowicz M, et al. Coagulase-negative variants of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* strains isolated from hospital specimens. *Zentralbl Bakteriol* 1998;288:373–81.
135. Luijendijk A, van Belkum A, Verbrugh H, et al. Comparison of five tests for identification of *Staphylococcus aureus* from clinical samples. *J Clin Microbiol* 1996;34:2267–9.
136. Vandenesch F, Lebeau C, Bes M, et al. Coagulase deficiency in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* involves both transcriptional and post-transcriptional defects. *J Med Microbiol* 1994;40:344–9.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

ΦΡΕΣΚΙΑ ΣΑΛΑΤΑ	110.000	Δ.Π.	3.000	<5	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	<50	<50	<50
ΦΡΕΣΚΙΑ ΣΑΛΑΤΑ	100.000	Δ.Π.	3.000	<5	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	<50	<50	<50
ΦΡΕΣΚΙΑ ΣΑΛΑΤΑ	31.000	Δ.Π.	3.000	<5	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	<50	<50	<50
ΦΡΕΣΚΙΑ ΣΑΛΑΤΑ	30.000	Δ.Π.	3.000	<5	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	<50	<50	<50
ΦΡΕΣΚΙΑ ΣΑΛΑΤΑ	<100	Δ.Π.	5.000	<5	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	50	<50	<50
ΦΡΕΣΚΙΑ ΣΑΛΑΤΑ	<100	Δ.Π.	5.000	<5	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	50	<50	<50
ΦΡΕΣΚΙΑ ΣΑΛΑΤΑ	13.000	Δ.Π.	1.800	<5	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	<50	<50	<50
ΦΡΕΣΚΙΑ ΣΑΛΑΤΑ	10.000	Δ.Π.	1.800	<5	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	<50	<50	<50
ΦΡΕΣΚΙΑ ΣΑΛΑΤΑ	80.000	Δ.Π.	14.000	<5	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	<50	<50	<50
ΦΡΕΣΚΙΑ ΣΑΛΑΤΑ	65.000	Δ.Π.	14.000	<5	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	<50	<50	<50
ΦΡΕΣΚΙΑ ΣΑΛΑΤΑ	155.000	Δ.Π.	14.000	<5	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	<50	<50	<50
ΦΡΕΣΚΙΑ ΣΑΛΑΤΑ	122.000	Δ.Π.	14.000	<5	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	<50	<50	<50
ΦΡΕΣΚΙΑ ΣΑΛΑΤΑ	40.000	Δ.Π.	1.800	<5	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	<50	<50	<50
ΦΡΕΣΚΙΑ ΣΑΛΑΤΑ	45.000	Δ.Π.	1.800	<5	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	<50	<50	<50
ΦΡΕΣΚΙΑ ΣΑΛΑΤΑ	16.000	Δ.Π.	6.500	<5	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	<50	<50	<50
ΦΡΕΣΚΙΑ ΣΑΛΑΤΑ	18.000	Δ.Π.	6.500	<5	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	<50	<50	<50
ΦΡΟΥΤΟ	2.500	Δ.Π.	400	<5	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	<50	<50	<50
ΦΡΟΥΤΟ	3.000	Δ.Π.	350	<5	ΟΧΙ	ΟΧΙ	ΟΧΙ	<50	<50	<50

Πίνακας 6.1.3: Πίνακας αποτελεσμάτων μικροβιολογικών μεθόδων κατά ISO για τα δείγματα τροφίμων που αναλύθηκαν. (Δ.Π.-Δεν Πραγματοποιήθηκε)