



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ - ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ & ΔΙΟΙΚΗΣΗ ΥΠΗΡΕΣΙΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

« Εικόνα μικροβιολογικής ασφάλειας και υγιεινής τροφίμων,
σε επιχειρήσεις μαζικής εστίασης,
σε σχέση με την εφαρμογή ή
όχι συστημάτων προληπτικής υγιεινής HACCP »

Λεωνίδας Γεωργαλής
Επόπτης Δημόσιας Υγείας

- Επιβλέποντες:
1. **Ι. Τσελέντης**, Καθηγητής Μικροβιολογίας,
Τμήματος Ιατρικής, Παν. Κρήτης
 2. **Α. Ψαρουλάκη**, Λέκτορας
Μικροβιολογίας/ Ζωονόσων, Εργαστήριο
Ιατρικής, Τμήμα Ιατρικής, Παν. Κρήτης
 3. **Χ. Πανούλης**, Κτηνίατρος,
Μικροβιολόγος τροφίμων, Επιστ.
Συνεργάτης ΜΜΤΥΠ., Ιατρικής Σχολής
Παν. Κρήτης

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την συντονιστική επιτροπή και ιδιαίτερα το συντονιστή του μεταπτυχιακού προγράμματος κ. Αναστάσιο Φιλαλήθη, που μου έδωσαν την ευκαιρία να παρακολουθήσω το πρόγραμμα αυτό.

Με την ευκαιρία της ολοκλήρωσης αυτής της μεταπτυχιακής εργασίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τους τρεις επιβλέποντές μου κ. Άννα Ψαρουλάκη, κ. Ιωάννη Τσελέντη, κ. Χρήστο Πανούλη, για την πολύτιμη βοήθεια που μου προσέφεραν αλλά και για την άψογη συνεργασία που είχα μαζί τους σε όλη την διάρκεια αυτής της προσπάθειας. Οι γνώσεις που μου μετέφεραν θα με ακολουθούν στην μελλοντική επαγγελματική μου καριέρα.

Θα ήθελα επίσης να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ στους γονείς μου, που μου δίνουν την δυνατότητα να γίνομαι καλύτερος μέσα από τις σπουδές σε αυτούς τους δύσκολους καιρούς που διανύουμε. Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στην αδερφή μου Γεωργαλή Ευρυδίκη και στην πολύ καλή μου φίλη Παπαδοπούλου Ελένη, που χωρίς την πολύτιμη βοήθειά τους δεν θα κατάφερα να φέρω εις πέρας αυτήν την εργασία.

Περιεχόμενα

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Ευχαριστίες | I |
| Συντμήσεις- συντομογραφίες: | V |
| Περίληψη Μεταπτυχιακής Εργασίας | 1 |
| Abstract | 3 |
| 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ..... | 5 |
| 1.1 Το σύστημα H.A.C.C.P..... | 5 |
| 1.2 Αρχές εφαρμογής του H.A.C.C.P | 6 |
| 1.3 Πλεονεκτήματα του συστήματος H.A.C.C.P..... | 7 |
| 1.4 Ιστορική αναδρομή..... | 9 |
| 1.5 Εφαρμογή του H.A.C.C.P στην Ελλάδα..... | 11 |
| 1.6 Το σύστημα H.A.C.C.P και η σημασία της παραγωγής ασφαλών τροφίμων. | 12 |
| 1.7 Ανάπτυξη του Συστήματος H.A.C.C.P..... | 12 |
| 1.8 Πολιτική ποιότητας , υγιεινής και ασφάλειας | 13 |
| 1.9 Στάδια ανάπτυξης ενός συστήματος H.A.C.C.P..... | 15 |
| 1.9.1 Επιλογή της ομάδας H.A.C.C.P..... | 15 |
| 1.9.2 Περιγραφή του προϊόντος | 16 |
| 1.9.3 Προσδιορισμός της σχεδιαζόμενης χρήσης του προϊόντος. | 17 |
| 1.9.4 Κατασκευή του διαγράμματος ροής της παραγωγικής διαδικασίας..... | 17 |
| 1.9.5 Επαλήθευση του διαγράμματος ροής..... | 18 |
| 1.9.6 Καταγραφή όλων των κινδύνων σε όλα τα στάδια της παραγωγής και των αντίστοιχων προληπτικών μέτρων (Αρχή 1 ^η – Ανάλυση Κινδύνου)..... | 18 |
| 1.9.6.1 Βιολογικοί Κίνδυνοι..... | 19 |
| 1.9.6.1.1 Staphylococcus aureus & σταφυλοκοκκικές εντεροτοξίνες..... | 21 |
| 1.9.6.1.2 Salmonella | 23 |
| 1.9.6.1.3 Κολοβακτηριοειδή – Εντερικής προελεύσεως κολοβακτηριοειδή-E.coli | 25 |
| 1.9.6.1.4 Listeria monocytogenes..... | 28 |
| 1.9.6.2 Χημικοί Κίνδυνοι..... | 30 |
| 1.9.6.3 Φυσικοί Κίνδυνοι..... | 31 |
| 1.9.7 Καθορισμός των CCP's εφαρμόζοντας το διάγραμμα αποφάσεων (Αρχή 2 ^η)..... | 31 |
| 1.9.8 Καθορισμός των κρίσιμων ορίων για τα CCP's (Αρχή 3 ^η – Critical Limits)..... | 33 |
| 1.9.9 Εγκατάσταση συστήματος παρακολούθησης των CCP's και των κρίσιμων ορίων τους (Αρχή 4 ^η)..... | 33 |
| 1.9.10 Καθορισμός των διορθωτικών ενεργειών για τις αποκλίσεις από τα κρίσιμα όρια (Αρχή 5 ^η)..... | 34 |
| 1.9.11 Εγκατάσταση συστήματος αρχειοθέτησης και καταγραφής του σχεδίου H.A.C.C.P. (Αρχή 6 ^η)..... | 34 |
| 1.9.12 Καθορισμός των διαδικασιών επαλήθευσης του συστήματος H.A.C.C.P. | 35 |
| (Αρχή 7 ^η)..... | 35 |
| 1.10 Προαπαιτούμενα εφαρμογής H.A.C.C.P..... | 35 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1.11 Εφαρμογή του H.A.C.C.P. σε χώρους μαζικής εστίασης- Δυσκολίες εφαρμογής του H.A.C.C.P. | 38 |
| 1.12 Σκοποί και στόχοι της έρευνας | 41 |
| 2. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ ΤΡΟΦΙΜΩΝ | 42 |
| 2.1 Εργαστηριακές μέθοδοι | 42 |
| 2.1.1 Πρότυπη μέθοδος αριθμώσεως σε τρυβλία (STANDARD PLATE COUNT) | 42 |
| 2.1.2 Μέθοδος επιφανειακής εξαπλώσεως (SURFACE ή SPREAD PLATE METHOD) | 48 |
| 2.1.3 Μέθοδος όρθιου σωλήνα (STANDING TUBE METHOD) | 50 |
| 2.1.4 Μέθοδος σταγόνων άγαρ (AGAR DROPLETS METHOD)..... | 51 |
| 2.1.5 Μέθοδος σπειροειδούς ενοφθαλμισμού τρυβλίων (SPIRAL PLATE COUNT METHOD ή SPC) (Gilchrist JE, 1973) | 53 |
| 2.2 Απομόνωση και αρίθμηση του <i>Staphylococcus aureus</i> | 56 |
| 2.2.1 Παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη και την επιβίωση | 56 |
| 2.2.2 Αρίθμηση Σταφυλόκοκκων που παράγουν πηκτάση | 58 |
| 2.2.3 Ταχεία Μέθοδος MPN (Wilson E, 1959)..... | 59 |
| 2.2.4 Βραδεία Μέθοδος MPN..... | 60 |
| 2.2.5 Μέθοδος επιφανειακής εξαπλώσεως | 62 |
| 2.3 Ανίχνευση Εντεροτοξινών σε τρόφιμα | 62 |
| 2.3.1 Μέθοδος Casman και Bennett, 1965 (Γενική μέθοδος) (Casman SP, 1965)..... | 64 |
| 2.3.2 Μέθοδος Read για το γάλα (Read RB JR, 1965)..... | 65 |
| 2.3.3 Μέθοδος Zehren και Zehrsn (1968) για τους τυρούς (τροποποίηση από Μάντη, 1973) (Zehren VL, 1968) (Μάντης Α. , 1973)..... | 66 |
| 2.3.4 Μέθοδος Reiser για τυρούς και άλλα τρόφιμα (Reiser R, 1974)..... | 67 |
| 2.4 Απομόνωση και ταυτοποίηση Σαλμονέλων | 69 |
| 2.4.1 Γενικά..... | 69 |
| 2.4.2 Απομόνωση σαλμονέλων (FDA, 1976) | 71 |
| 2.4.3 Ταυτοποίηση σαλμονέλων | 74 |
| 2.5 Κολοβακτηριοειδή – Εντερικής προελεύσεως-ESCHERICHIA COLI | 78 |
| 2.5.1 Αρίθμηση κολοβακτηριοειδών και <i>E. COLI</i> | 78 |
| 2.5.2 Μέθοδος Ενσωματώσεως..... | 79 |
| 2.5.3 Μέθοδος Μικροβιοκρατών Μεμβρανών (Membrane Filtration Method)..... | 80 |
| 2.5.4 Αρίθμηση εντεροβακτηριοειδών | 81 |
| 2.5.5 Βιοχημικές δοκιμές ταυτοποιήσεως εντεροβακτηρίων..... | 83 |
| 2.5.5.1 ΔΟΚΙΜΗ ΚΙΝΗΤΙΚΟΤΗΤΑΣ (MOTILITY TEST)..... | 83 |
| 2.5.5.2 ΔΟΚΙΜΗ ΙΝΔΟΛΗΣ (INDOLE TEST)..... | 83 |
| 2.5.5.3 ΔΟΚΙΜΗ ΕΡΥΘΡΟΥ ΤΟΥ ΜΕΘΥΛΙΟΥ (METHYL RED TEST ή MR TEST)..... | 84 |
| 2.5.5.4 ΔΟΚΙΜΗ VOGES–PROSKAUER ή VP (Ανίχνευση ακετυλομεθυλοκαρβινόλης ή ακετοΐνης) | 84 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.5.5.5 ΔΟΚΙΜΗ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΣΕΩΣ ΤΩΝ ΚΙΤΡΙΚΩΝ ΑΛΑΤΩΝ (CITRATE UTILIZATION TEST) | 85 |
| 2.6 <i>Listeria monocytogenes</i> | 85 |
| 2.7 Δειγματοληψία..... | 86 |
| 2.8 Προδιαγραφές μικροβιολογικής ασφάλειας σερβιριζομένων τροφίμων..... | 87 |
| 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ..... | 88 |
| 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ..... | 103 |
| Βιβλιογραφία | 111 |

Πίνακας εικόνων και πινάκων

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Εικόνα 1. Η πυραμίδα του συστήματος HACCP Η πηγή που καθορίστηκε δεν είναι έγκυρη. | 13 |
| Εικόνα 2. Στάδια ανάπτυξης σχεδίου HACCP Η πηγή που καθορίστηκε δεν είναι έγκυρη. | 15 |
| Εικόνα 3. Παράδειγμα διαγράμματος ροής εργασιών Η πηγή που καθορίστηκε δεν είναι έγκυρη. | 17 |
| Εικόνα 4. Διάγραμμα Αποφάσεων για CCP's (Jones, Food safety, 1992)..... | 32 |
| Εικόνα 5. Λήψη δείγματος από κατεψυγμένο τρόφιμο με στείρο ηλεκτρικό τρυπάνι | 44 |
| Εικόνα 6. Υποδείγματα παρασκευής δεκαδικών αραιώσεων από τρόφιμα | 46 |
| Εικόνα 7. Σχηματική παράσταση προσδιορισμού OMX με τη μέθοδο σταγόνων άγαρ | 52 |
| Εικόνα 8. Μήτρα αριθμήσεως αποικιών (μέθοδος σπειροειδούς ενοφθαλμισμού τρυβλίων) | 56 |
| Εικόνα 9. Ταχεία μέθοδος αριθμήσεως σταφυλόκοκκων | 60 |
| Εικόνα 10. Σχεδιάγραμμα των υλικών τα οποία χρειάζονται για την ανίχνευση εντεροτοξινών με ανοσοδιάχυση σε αντικειμενοφόρες πλάκες (micro-slide test) | 63 |
| Εικόνα 11. Διάταξη αντιδραστηρίων στην ανοσοδιάχυση επί αντικειμενοφόρου | 63 |
| Εικόνα 12. Σχεδιάγραμμα απομονώσεως σαλμονέλων | 74 |
| Εικόνα 13. % Κατανομή των δειγμάτων που βρέθηκαν εκτός συνιστώμενων ορίων ανά είδος πρώτης ύλης ωμών τροφίμων που εισέρχονται σε μονάδες μαζικής εστίασης που δεν χρησιμοποιούν HACCP (πίνακας 10) | 104 |
| Εικόνα 14. Γραφική παρουσίαση συνολικών ποσοστών εκτός ορίων για τις μελετώμενες μικροβιολογικές παραμέτρους σε επιχειρήσεις που χρησιμοποιούν HACCP (πίνακας 9, 11, 13, 15)..... | 105 |
| Εικόνα 15.Γραφική παρουσίαση συνολικών ποσοστών εκτός ορίων για τις μελετώμενες μικροβιολογικές παραμέτρους σε επιχειρήσεις που δεν χρησιμοποιούν HACCP (πίνακες 10, 12, 14, 16)..... | 105 |
| Εικόνα 16. % Κατανομή των δειγμάτων που βρέθηκαν εκτός συνιστώμενων ορίων ανά είδος α' ύλης σε μενού ξενοδοχείων που δεν χρησιμοποιούν HACCP (πίνακας 12) . | 106 |
| Εικόνα 17. % Κατανομή των δειγμάτων που βρέθηκαν εκτός συνιστώμενων ορίων ανά είδος α' ύλης σε μενού fast food (πίνακας 14) | 107 |
| Εικόνα 18. % Κατανομή των δειγμάτων που βρέθηκαν εκτός συνιστώμενων ορίων ανά είδος α' ύλης σε μενού catering (πίνακας 16)..... | 107 |
| Εικόνα 19. Κατανομή ποσοστού παρουσίας των μικροβιολογικών παραμέτρων σε περιβάλλον μονάδων μαζικής εστίασης που χρησιμοποιούν ή δεν χρησιμοποιούν συστήματα προληπτικής υγιεινής HACCP (πίνακες 17,18)..... | 109 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Πίνακας 1. Διαφορικά χαρακτηριστικά των γενών της οικογένειας Micrococcaceae (Buchanan, 1974) | 21 |
| Πίνακας 2. Χαρακτηριστικά διαφοροποίησης των ειδών του γένους Staphylococcus (Buchanan, 1974) | 22 |
| Πίνακας 3. Σχήμα ταξινόμησης σταφυλόκοκκων και μικρόκοκκων κατά Baird-Parker (Baird-Parker, 1966)..... | 22 |
| Πίνακας 4. Ταξινόμηση Εντεροβακτηριοειδών κατά (EDWARDS, 1972) | 24 |
| Πίνακας 5. Ταξινόμηση κολοβακτηριοειδών με βάση τις δοκιμές IMViC* (Thatcher FS, 1968)..... | 27 |
| Πίνακας 6. Παραδείγματα αριθμώσεως και εξαγωγής αποτελεσμάτων Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας σε δείγματα τροφίμων | 48 |
| Πίνακας 7. Όρια για την ανάπτυξη του S.aureus και την παραγωγή εντεροτοξινών | 57 |
| Πίνακας 8. Βιοχημικά χαρακτηριστικά του γένους Salmonella (Buchanan, 1974)..... | 77 |
| Πίνακας 9. Μικροβιολογική εικόνα Α' υλών ωμών τροφίμων που εισέρχονται σε μονάδες μαζικής εστίασης που εφαρμόζουν συστήματα προληπτικής υγιεινής (17 επιχειρήσεις) | 89 |
| Πίνακας 10. Μικροβιολογική εικόνα Α' υλών σε μονάδες μαζικής εστίασης που δεν εφαρμόζουν συστήματα προληπτικής υγιεινής (11 επιχειρήσεις) | 91 |
| Πίνακας 11. Μικροβιολογική εικόνα μενού σε ξενοδοχεία που εφαρμόζουν σύστημα προληπτικής υγιεινής (17 επιχειρήσεις)..... | 92 |
| Πίνακας 12. Μικροβιολογική εικόνα μενού σε ξενοδοχεία που δεν εφαρμόζουν συστήματα προληπτικής υγιεινής (11 επιχειρήσεις)..... | 93 |
| Πίνακας 13. Μικροβιολογική εικόνα μενού σε μονάδες fast food που εφαρμόζουν συστήματα προληπτικής υγιεινής HACCP (3 επιχειρήσεις) | 94 |
| Πίνακας 14. Μικροβιολογική εικόνα μενού σε μονάδες fast food που δεν εφαρμόζουν συστήματα προληπτικής υγιεινής HACCP (5 επιχειρήσεις) | 96 |
| Πίνακας 15. Μικροβιολογική εικόνα μενού σε μονάδες catering που εφαρμόζουν συστήματα προληπτικής υγιεινής (3 επιχειρήσεις) | 97 |
| Πίνακας 16. Μικροβιολογική εικόνα μενού σε μονάδες catering που δεν εφαρμόζουν συστήματα προληπτικής υγιεινής (3 επιχειρήσεις) | 98 |
| Πίνακας 17. Μικροβιολογική εικόνα περιβάλλοντος σε μονάδες μαζικής εστίασης που εφαρμόζουν συστήματα προληπτικής υγιεινής (24 επιχειρήσεις) | 99 |
| Πίνακας 18. Μικροβιολογική εικόνα περιβάλλοντος σε μονάδες μαζικής εστίασης που δεν εφαρμόζουν συστήματα προληπτικής υγιεινής | 102 |

Συντμήσεις- συντομογραφίες:

HACCP: Hazard Analysis of Critical Control Points

E.coli: Escherichia Coli

L.monocytogenes: Listeria monocytogenes

S.aureus: Staphylococcus aureus

OMX: Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα

ml: milliliter

mg: milligram

WHO: World Health Organization

APHA: American Public Health Association

FAO: Food and Drug Administration

HC: Hemorrhagic Colitis

Περίληψη Μεταπτυχιακής Εργασίας

Τίτλος εργασίας: Εικόνα μικροβιολογικής ασφάλειας και υγιεινής τροφίμων, σε επιχειρήσεις μαζικής εστίασης, σε σχέση με την εφαρμογή ή όχι συστημάτων προληπτικής υγιεινής HACCP.

Του: **Λεωνίδα Γεωργαλή, Επόπτη Δημόσιας Υγείας**

Υπό τη επίβλεψη των: **1. Ι. Τσελέντης, Καθηγητής Μικροβιολογίας, Τμήματος Ιατρικής, Παν. Κρήτης**

2. Α. Ψαρουλάκη, Λέκτορας Μικροβιολογίας/ Ζωονόσων, Εργαστηριακής Ιατρικής, Τμήμα Ιατρικής, Παν. Κρήτης

3. Χ. Πανούλης, Κτηνίατρος, Μικροβιολόγος τροφίμων, Επιστ.

Συνεργάτης ΜΜΤΥΠ., Ιατρικής Σχολής Παν. Κρήτης

Ημερομηνία: **Ιούνιος 2010**

ΕΙΣΑΓΩΓΗ: Το HACCP (Ανάλυση Επικινδυνότητας στα Κρίσιμα Σημεία Ελέγχου) είναι ένα σύστημα προληπτικής υγιεινής, σχεδιασμένο για την διασφάλιση της ποιότητας των τροφίμων. Η εφαρμογή του σε επιχειρήσεις μαζικής εστίασης, εξασφαλίζει την απαίτηση για υψηλής ποιότητας τρόφιμα, που συνδυάζουν τα επιθυμητά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά με την μεγαλύτερη δυνατή ασφάλεια για την υγεία των καταναλωτών. Συγκεκριμένα, σκοπεύει στη μείωση των βιολογικών κινδύνων για την εξάλειψη της μικροβιακής μόλυνσης των τροφίμων. Ως βιολογικοί κίνδυνοι χαρακτηρίζονται οι μικροοργανισμοί που μπορούν να προκαλέσουν τροφιμογενής λοιμώξεις στον άνθρωπο. Οι σημαντικότεροι από αυτούς, που απαντώνται ευρέως στο φυσικό περιβάλλον, είναι η Λιστέρια, ο Σταφυλόκοκκος, τα Κολοβακτηριοειδή (*Eserichia Coli*), η Σαλμονέλα (*Salmonella spp*) και τα *Coliforms*.

ΣΤΟΧΟΙ: Η έρευνα είχε σαν στόχο τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας εφαρμογής των Ορθών Πρακτικών Παραγωγής σε επιχειρήσεις μαζικής εστίασης που εφαρμόζουν Συστήματα Προληπτικής Υγιεινής HACCP και τη σύγκριση της εικόνας των επιχειρήσεων αυτών με επιχειρήσεις που δεν εφαρμόζουν στις παραγωγικές τους διαδικασίες το σύστημα HACCP. Εκτιμήθηκαν οι παράγοντες και οι διαδικασίες που συμβάλλουν σε αυξημένες πιθανότητες εμφάνισης κινδύνου μικροβιολογικής ασφάλειας στα παραπάνω συστήματα μαζικής εστίασης..

ΜΕΘΟΔΟΙ: Στην παρούσα μελέτη έγινε μικροβιολογικός και ποιοτικός έλεγχος σε 42 επιχειρήσεις μαζικής εστίασης (23 εφαρμόζαν HACCP και 19 όχι). Έγινε σύγκριση των επιχειρήσεων μαζικής εστίασης (8 επιχειρήσεις Fast Food, 28 Ξενοδοχεία, 6 εταιρίες Catering, 28 επιχειρήσεις μαζικής εστίασης σε σχέση με τις πρώτες ύλες, 41 μονάδες μαζικής εστίασης σε σχέση με το περιβάλλον εργασίας) σε ότι αφορά την εφαρμογή του Συστήματος Προληπτικής Υγιεινής HACCP.

Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν με μέριμνα της Μονάδας Μικροβιολογικής Υγιεινής Τροφίμων, Ύδατος και Περιβάλλοντος του εργαστηρίου Βακτηριολογίας Ζωονόσων και Γεωγραφικής Ιατρικής, της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης. Το σύνολο των εκτιμωμένων αποτελεσμάτων αφορούν επεξεργασία στοιχείων και το χρονικό διάστημα από το Φεβρουάριο 2008 έως και το Φεβρουάριο 2010.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ: Η προμήθεια πρώτων και δεύτερων υλών από μη ασφαλείς προμηθευτές, έχει σαν αποτέλεσμα τα αυξημένα ποσοστά δειγμάτων εκτός προδιαγραφών μικροβιολογικής ασφάλειας (25% κατεψυγμένα σφολιατοειδή, 19% νωπά λαχανικά, 16% τυριά τυρογάλακτος). Τα μενού ξενοδοχείων που δεν εφαρμόζουν συστήματα προληπτικής υγιεινής έρχονται πρώτα σε μόλυνση με ποσοστά που αγγίζουν το 30% για την *E.coli*, 31% για *L.monocytogenes* και 28% για τον *S. aureus*. Αυτό παρατηρείται επίσης στο μενού των επιχειρήσεων fast food και catering που δεν εφαρμόζουν συστήματα HACCP. Τέλος, η εικόνα του περιβάλλοντος των επιχειρήσεων που δεν χρησιμοποιούν HACCP, είναι τέτοια που βοηθάει στην επιμόλυνση των τροφίμων (cross-contamination) (παρουσία: 29% *E.coli*, 32% *L. monocytogenes*, 31% *Coliforms*).

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ: Τα αποτελέσματα της έρευνας οδήγησαν σε προτάσεις εφαρμογής μέτρων και πρακτικών που θα συμβάλλουν στην βελτίωση της υγειονομικής ασφάλειας, στις διαδικασίες και τα παραγόμενα προϊόντα σε συστήματα μαζικής εστίασης. Η μικροβιολογική εικόνα του περιβάλλοντος των επιχειρήσεων που εφαρμόζουν συστήματα προληπτικής υγιεινής είναι σύμφωνη με τις προδιαγραφές μικροβιολογικής ασφάλειας: 1) Η αποτελεσματική συντήρηση των εγκαταστάσεων και των εξοπλισμών της παραγωγής γευμάτων μειώνει τον κίνδυνο επιμόλυνσης των τροφίμων, 2) Η εφαρμογή ολοκληρωμένου προγράμματος εξυγίανσης στις εγκαταστάσεις και τον εξοπλισμό, παρεμποδίζει την εγκατάσταση μικροβιακών ρύπων σε χώρους παραγωγής, 3) Η σωστή εφαρμογή του συστήματος προληπτικής υγιεινής HACCP, συμβάλλει στην βελτίωση του σχεδιασμού και της λειτουργικότητας των επιχειρήσεων.

Οι επιχειρήσεις οφείλουν να εφαρμόζουν τέτοια συστήματα, να τα αξιολογούν, να τα επαναπροσδιορίζουν και να τα επικαιροποιούν, αναπτύσσοντας ουσιώδεις και ευέλικτες διαδικασίες εσωτερικής και εξωτερικής επικοινωνίας με τους φορείς της δημόσιας υγείας. Το κόστος των επιχειρήσεων για την εφαρμογή συστημάτων προληπτικής υγιεινής, σε επίπεδο οικονομικό, λειτουργικό και ανθρώπινου δυναμικού, φαντάζει μηδαμινό σε σχέση με τα οφέλη για τη δημόσια υγεία.

Λέξεις κλειδιά: HACCP, Δημόσια υγεία, Επιχειρήσεις μαζικής εστίασης, Ασφάλεια τροφίμων, Βιολογικοί κίνδυνοι.

Abstract

Title: Image of microbiology safety and hygiene in catering establishments regarding the application of Hazard Analysis of Critical Control Point system (HACCP).

By: Leonidas Georgalis, Supervisor of Public Health

Supervisors: 1. I. Tselentis, Professor of Microbiology, Department of Medicine, University of Crete

2. A. Psaroulaki, Lecturer of Microbiology/ Zoonoses, Laboratory Medicine, Department of Medicine, University of Crete

3. C. Panoulis, Veterinarian, Microbiologist of foods, Scientific Collaborator U.M.F.W.E, Medical Faculty, University of Crete

Date: **June 2010**

BACKGROUND: HACCP (Hazard Analysis of Critical Control Point) is a system of preventive hygiene, designed for safety assurance of foods. Its application in catering establishments ensures the demand of high quality food that includes all favorable organoleptic characteristics and the higher safety for consumers' health. More specifically, it aims in the reduction of biological hazards and the elimination of microbial infection of foods.

Microbiological hazards are microorganisms that are able to evoke foodborne diseases in humans. The most important and widespread are *Listeria*, *Staphylococcus*, *Eserichia Coli*, *Salmonella* and *Coliforms*.

OBJECTIVES: the aim of this study is the microbiological and quality control of catering establishments and the comparison regarding the application of HACCP.

MATERIALS AND METHODS: sample collection was conducted for laboratory microbiological control of samples from 42 catering establishments (23 applying HACCP, 19 don't). There was a comparison at 8 fast foods, 28 hotels menus, 6 catering establishments, 28 catering establishments about the first materials and 41 establishments about the working environment. Samples were collected between February 2008 and February 2010, under the supervision of the Unit of Foods, Water and Environmental Microbiology, Laboratory of Bacteriology, Parasitology, Zoonoses and Geographical Medicine, Faculty of Medicine, University of Crete. All samples were tested according to the International Standard Organization (ISO).

RESULTS: The supply of first and second material from non safe suppliers has as a result the increased percentages of samples higher than the recommended cut-off limit (25% frozen bread products, 19% fresh vegetables, 16% cheese). Menus of hotels establishments that don't apply HACCP systems come first for microbiological contamination in levels between 30% for *E. coli*, 31% for *L. monocytogenes*, 28% for

S. aureus. The same results were obtained from the tests of fast food and catering establishments menus that don't implement HACCP systems. Lastly, the environmental image of establishments that don't use HACCP systems induce cross contamination (presence: 29% *E.coli* 32% *L.monocytogenes*, 31% *Coliforms*).

CONCLUSION: The environmental microbiological image of establishments that apply HACCP systems is according to the recommended microbiological safety specifications. The effective and efficient preserve of establishments and food processing equipment, reduces the contamination risk. The application of a consistent sanitization program for the establishments and equipment prevents microbial development in producing area. The contribution of a HACCP system is indicated by the total improvement regarding to operation and organization of catering establishments. Entrepreneurs ought to apply, evaluate and develop similar preventive systems with no regard at the cost, because the outcome is vital for Public Health.

Key words: HACCP, Public health, Mass caterers, Catering establishments, Food safety, Biological hazards.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Το σύστημα H.A.C.C.P

Το σύστημα H.A.C.C.P αποτελεί μία επιστημονική, λογική και συστηματική προσέγγιση στην αναγνώριση, στην εκτίμηση της επικινδυνότητας και της σοβαρότητας, καθώς και στον έλεγχο των μικροβιολογικών, χημικών και φυσικών κινδύνων που σχετίζονται με όλα τα στάδια παραγωγής ενός τροφίμου, από την ανάπτυξη και την συγκομιδή των πρώτων υλών μέχρι την τελική χρήση του, η οποία διασφαλίζει ότι ο τρόφιμο είναι ασφαλές να καταναλωθεί.

Σε αντίθεση με την παραδοσιακή προσέγγιση των αναλύσεων στο τελικό προϊόν, το σύστημα H.A.C.C.P ενσωματώνει τον έλεγχο της ασφάλειας του τροφίμου μέσα στο σχεδιασμό της παραγωγικής διαδικασίας. Έτσι το σύστημα H.A.C.C.P αποτελεί μία προληπτική προσέγγιση και κατά συνέπεια είναι πολύ αποδοτική και κερδοφόρα σε σχέση με το κόστος εφαρμογής της (cost-effective). Το 1983 η επιτροπή Joint FAO/WHO Codex Alimentarius Commission υποστηρίζει το σύστημα H.A.C.C.P ως την πλέον οικονομικά αποδοτικότερη (cost-effective) προσέγγιση που είχε επινοηθεί μέχρι στιγμής για την διασφάλιση της ασφάλειας των τροφίμων (Motarjemi F, 1996), (Τζιά Κ. Τ., 1996).

Στο σημείο αυτό κρίνεται αναγκαίο να παρατεθεί ο ορισμός της Υγιεινής, που έδωσε ο FAO/WHO το 1979. καθώς συνιστά το πλαίσιο ανάπτυξης όλων των ενεργειών που προβλέπονται από το H.A.C.C.P «Υγιεινή είναι το σύνολο των προφυλάξεων και των μέτρων που πρέπει να λαμβάνονται κατά την παραγωγή, επεξεργασία, αποθήκευση και την διάθεση των τροφίμων, ούτως ώστε να είναι αισθητικώς αποδεκτά από τον καταναλωτή, να μην προκαλούν βλάβη στην υγεία του, να έχουν την ικανότητα να συντηρούνται εύκολα και να ανταποκρίνονται προς τους σταθερότυπους ή τις κατευθυντήριες γραμμές που θεσπίστηκαν από την πολιτεία ή την βιομηχανία» (FAO/WHO, 1997).

Ο όρος H.A.C.C.P είναι ακρωνύμιο του Hazard Analysis of Critical Control Points και αποδίδεται στην Ελληνική γλώσσα με τον όρο Α.Κ.Κ.Σ.Ε. δηλαδή «Ανάλυση Κινδύνων Κρίσιμων Σημείων Ελέγχου». Το σύστημα H.A.C.C.P ως σύστημα ελέγχου για τα τρόφιμα, είναι άμεσα συνδεδεμένο με την υγιεινή και ασφάλεια αυτών. Σχεδιάζεται με σκοπό τη εξάλειψη συναφών προβλημάτων, έχοντας επιβεβαιώσει τη ύπαρξη σημείων ελέγχου σε κάθε στάδιο της παραγωγικής διαδικασίας όπου είναι δυνατόν να παρουσιαστούν επικίνδυνες ή κρίσιμες καταστάσεις (αναγνώριση, εκτίμηση και έλεγχος των υγειονομικών κινδύνων) (Αρβανιτογιάννης Ι, 2001).

1.2 Αρχές εφαρμογής του H.A.C.C.P

Σύμφωνα με την έκδοση της NACMCF (1992), το H.A.C.C.P αποτελείται από τις ακόλουθες 7 αρχές (Τζιά Κ. Τ., 1996) (FAO/WHO, 1997):

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

Αρχή 2^η: Προσδιορισμός των σημείων/ διεργασιών/ φάσεων λειτουργίας, που μπορούν να ελεγχθούν, για να εξαφανίσουν ένα κίνδυνο ή να ελαχιστοποιήσουν την πιθανότητα εμφάνισης του (Κρίσιμο Σημείο Έλεγχου-CCP). Ο όρος «φάση λειτουργίας» σημαίνει κάθε στάδιο στην παραγωγή και / ή στην επεξεργασία του τροφίμου, συμπεριλαμβανομένων και των πρώτων υλών, της παραλαβής τους και / ή της παραγωγής, συγκομιδής, μεταφοράς, σχηματισμού, επεξεργασίας, αποθήκευσης κτλ.

Αρχή 3^η : Καθορισμός των κρίσιμων ορίων, τα οποία πρέπει να ικανοποιούνται, ώστε να εξασφαλίζεται ότι κάθε Κρίσιμο Σημείο Ελέγχου (CCP) βρίσκεται υπό έλεγχο.

Αρχή 4^η: Εγκατάσταση ενός συστήματος παρακολούθησης των Κρίσιμων Σημείων Ελέγχου (CCP's) και των κρίσιμων ορίων τους. Καθιέρωση των διαδικασιών επεξεργασίας των αποτελεσμάτων της παρακολούθησης, με σκοπό τη ρύθμιση της παραγωγής και την διατήρηση αυτής υπό έλεγχο.

Αρχή 5^η: Καθορισμός των διορθωτικών ενεργειών, οι οποίες πρέπει να πραγματοποιούνται, όποτε το σύστημα παρακολούθησης δείχνει ότι ένα συγκεκριμένο CCP βρίσκεται εκτός ελέγχου, δηλαδή ότι εμφανίζεται απόκλιση από ένα καθορισμένο κρίσιμο όριο.

Αρχή 6^η: Εγκατάσταση ενός αποτελεσματικού συστήματος αρχειοθέτησης και καταγραφής του σχεδίου H.A.C.C.P.

Αρχή 7^η: Προσδιορισμός των διαδικασιών επαλήθευσης, που επιβεβαιώνουν ότι το σύστημα H.A.C.C.P λειτουργεί σωστά και αποτελεσματικά.

1.3 Πλεονεκτήματα του συστήματος H.A.C.C.P

Το H.A.C.C.P είναι ένα σύστημα αλληλοδιαδεχόμενων και αλληλοεξαρτώμενων ενεργειών, με στόχο την εξασφάλιση του υψηλότερου δυνατού βαθμού ασφαλείας και προστασίας των τροφίμων. Τόσο οι κίνδυνοι που προσδιορίζονται όσο και τα προληπτικά μέτρα αυτών, δεν παρουσιάζονται απαραίτητα για πρώτη φορά. Αυτό όμως που είναι νέο, είναι ο τρόπος με τον οποίο τοποθετούνται οι διάφορες ενέργειες σε λογική σειρά, ώστε να εκτιμηθεί η επικινδυνότητα και η σοβαρότητα των κινδύνων κατά την παραγωγική διαδικασία, να προσδιοριστούν τα CCP's και οι τρόποι παρακολούθησης αυτών, με αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση της πιθανότητας εμφάνισης κινδύνων για τη δημόσια υγεία. Εάν το σύστημα H.A.C.C.P εφαρμόζεται σωστά, τότε δεν υπάρχει άλλο σύστημα ή μέθοδος που να παρέχει τον ίδιο βαθμό ασφαλείας στα τρόφιμα (Τζιά Κ. Τ., 1996).

Το H.A.C.C.P παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα κατά τη εφαρμογή του, τόσο για την βιομηχανία τροφίμων όσο και για τον καταναλωτή αλλά και το κράτος. Πρώτα από όλα το σύστημα αυτό βρίσκει εφαρμογή σε διάφορες περιοχές της τροφικής αλυσίδας. Έτσι λοιπόν μπορεί να χρησιμοποιηθεί (Motarjemi F, 1996) (Moy G, 1994).

✓ Ως μέθοδος της διασφάλισης της ασφαλείας του τροφίμου στην πρωτογενή παραγωγή, στην επεξεργασία, στην βιομηχανική παραγωγή και στην προετοιμασία των τροφίμων.

✓ Ως εργαλείο για την επιθεώρηση στον έλεγχο των τροφίμων. Οδηγεί στην πιο αποτελεσματική επιθεώρηση των επιχειρήσεων τροφίμων, καθώς ο ρόλος των επιθεωρητών θα εστιάζεται στην αξιολόγηση (assessment) του σχεδίου H.A.C.C.P και στην επικύρωση ότι είναι σωστά σχεδιασμένο και λειτουργεί αποτελεσματικά.

✓ Στη μελέτη των διεργασιών παρασκευής τροφίμων και στην αναγνώριση και αξιολόγηση της επικίνδυνης συμπεριφοράς των εργαζομένων, όπου θα πρέπει να εστιάζονται οι προσπάθειες επιμόρφωσης όσον αφορά την υγιεινή.

✓ Στη διαχείριση των προγραμμάτων της ασφαλείας των τροφίμων για να αναγνωριστούν οι μεγαλύτεροι κίνδυνοι (risks) για τη δημόσια υγεία, έτσι ώστε να τεθούν σε προτεραιότητα οι ανάλογες προσπάθειες επέμβασης.

✓ Το σύστημα H.A.C.C.P ξεπερνά πολλούς από τους περιορισμούς του παραδοσιακού τρόπου προσέγγισης του ελέγχου της ασφαλείας του τροφίμου [που γενικά βασιζόταν στις «ταχείες» (snap shot) επιθεωρήσεις και στις αναλύσεις στο τελικό προϊόν], περιλαμβανομένων:

- Της δυσκολίας συγκέντρωσης και εξέτασης επαρκούς αριθμού δειγμάτων, ώστε τα αποτελέσματα να είναι αντιπροσωπευτικά.
 - Του μεγάλου χρονικού διαστήματος που απαιτείται για να εξαχθούν τα αποτελέσματα.
 - Του μεγάλου κόστους που προκύπτει από τις αναλύσεις στο τελικό προϊόν και την ανάκληση των προϊόντων στην περίπτωση που υπάρχει ένδειξη μόλυνσης.
 - Του προσδιορισμού των προβλημάτων χωρίς να γίνεται κατανοητή η αιτία.
 - Των ορίων των «ταχέων» τεχνικών των επιθεωρήσεων για την πρόβλεψη των πιθανών προβλημάτων σχετικά με την ασφάλεια των τροφίμων.
- ✓ Το H.A.C.C.P έχει τη δυνατότητα να προσδιορίσει όλους τους πιθανούς, λογικά αναμενόμενους κινδύνους, μικροβιολογικούς, χημικούς ή φυσικούς ακόμα και αν δεν έχουν υπάρξει αντίστοιχα περιστατικά στο παρελθόν. Έτσι είναι ιδιαίτερα χρήσιμο για καινούριες διαδικασίες.
- ✓ Το σύστημα H.A.C.C.P είναι ικανό να περιλάβει τις αλλαγές που προκύπτουν, όπως μια εξέλιξη στο σχεδιασμό του εξοπλισμού, βελτιώσεις στις διαδικασίες παραγωγής και τεχνολογικές εξελίξεις που σχετίζονται με το προϊόν.
- ✓ Επίσης βοηθά στο να εστιαστούν και να κατευθυνθούν οι προσπάθειες στο πιο κρίσιμο σημείο της επιχείρησης τροφίμων.
- ✓ Μπορεί να μειώσει τις απώλειες προϊόντων που οφείλονται σε αλλοιώσεις.
- ✓ Μέσα στα πλαίσια του συστήματος μπορεί κανείς να περιμένει βελτίωση στις σχέσεις ανάμεσα: στους παραγωγούς των τροφίμων και τους επιθεωρητές και ανάμεσα στους παραγωγούς και στους καταναλωτές. Το σύστημα H.A.C.C.P παρέχει μια γερή επιστημονική βάση που αποδεικνύει ότι έχουν ληφθεί όλα τα απαραίτητα μέτρα για να μη φτάσει ο κίνδυνος στον καταναλωτή. Με αυτόν τον τρόπο, ενισχύεται η πίστη ότι τα προϊόντα είναι ασφαλή και έτσι προωθείται τόσο η εμπιστοσύνη στην βιομηχανία τροφίμων. Όσο και η σταθερότητα των επιχειρήσεων τροφίμων.
- ✓ Το σύστημα αυτό μπορεί να εφαρμοστεί σε όλη την αλυσίδα τροφίμων, από τις πρώτες ύλες μέχρι το τελικό προϊόν, π.χ. στη συγκομιδή, στην παραγωγική διαδικασία ή επεξεργασία, στη μεταφορά και στη διανομή, στην προετοιμασία και στην κατανάλωση.
- ✓ Η εφαρμογή του H.A.C.C.P είναι η πιο αποδοτική οικονομικά μέθοδος της διασφάλισης της ασφάλειας των τροφίμων και της πρόληψης των τροφικών ασθενειών και δηλητηριάσεων.

1.4 Ιστορική αναδρομή

Η ιδέα του H.A.C.C.P πρωτοπαρουσιάστηκε την δεκαετία του 1960 στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής. Πρωτεργάτες της ανάπτυξης του συστήματος ήταν η εταιρία τροφίμων Pillsbury Corporation και η NASA (Aeronautics & Space Administration).

Την περίοδο εκείνη τα εργαστήρια του Αμερικανικού στρατού, ανέπτυξαν ένα σύστημα παροχής «απόλυτων ασφαλών» τροφίμων προς τους αστροναύτες, κατά την διάρκεια που εκείνοι βρίσκονταν στο διάστημα. Η μεθοδολογία του H.A.C.C.P αναπτύχθηκε κατά το πρότυπο ανάλογων μεθοδολογιών, που προϋπήρχαν σε άλλους βιομηχανικούς τομείς (χημική βιομηχανία, πυρηνική βιομηχανία, αεροναυπηγική). Ο λόγος που οδήγησε στην ανάπτυξη ενός τέτοιου συστήματος, ήταν η ανάγκη παραγωγής ασφαλών τροφίμων υψηλής ποιότητας για τους αστροναύτες, καθώς ο κλασικός τρόπος επιθεώρησης και ελέγχου των τροφίμων (για ύπαρξη παθογόνων μικροοργανισμών), δεν παρείχε τον αναγκαίο βαθμό ασφαλείας για την ανάγκη των διαστημικών πτήσεων. Το παραπάνω σύστημα, το οποίο πρωτοεμφανίστηκε επίσημα με την ονομασία H.A.C.C.P το 1971, στη διάρκεια του Εθνικού Συνεδρίου για την προστασία των τροφίμων (ΗΠΑ), αποτέλεσε την πρώτη έκδοση του H.A.C.C.P , που στη συνέχεια της εξέλιξής του τροποποιήθηκε και βελτιώθηκε σημαντικά. Οι σημαντικότεροι σταθμοί στην πορεία του H.A.C.C.P είναι οι παρακάτω (Αρβανιτογιάννης Ι, 2001) :

- ❖ 1959 Συνεργασία NASA και Αμερικανικού στρατού για την παρασκευή ασφαλών τροφίμων για τα πληρώματα των διαστημοπλοίων.
- ❖ 1963 Δημιουργία του Codex Alimentarius (Διεθνής Κώδικας Τροφίμων) από FAO (Food and Agriculture Organization – Οργανισμός Τροφίμων Γεωργίας του ΟΗΕ) και WHO.
- ❖ 1969 Δημιουργία διεθνή κώδικα υγιεινής τροφίμων από την επιτροπή του Codex Alimentarius.
- ❖ 1971 Πρώτη παρουσίαση του H.A.C.C.P κατά τη διάρκεια του Εθνικού Συνεδρίου για την προστασία των τροφίμων (ΗΠΑ).
- ❖ 1978 Αναγνώριση της ανάγκης της εφαρμογής του H.A.C.C.P και εκτός ΗΠΑ (από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας). Ο ΠΟΥ συστήνει την εισαγωγή της μεθοδολογίας H.A.C.C.P (για πρώτη φορά με αυτή την ονομασία) και σε συνεργασία με την Διεθνή Επιτροπή για τις μικροβιολογικές προδιαγραφές τροφίμων, εκδίδει έκθεση που περιέχει τις αρχές του συστήματος

- ❖ 1989 Έκδοση οδηγού H.A.C.C.P , ο οποίος περιλαμβάνει 7 νέες αρχές και τους κυριότερους ορισμούς.
- ❖ 1993 Το H.A.C.C.P γίνεται υποχρεωτικό στην Ε.Ε με την οδηγία 93/43, εκδίδονται και πληθώρα σχετικών οδηγιών. Παράλληλα, ενσωματώνεται στον κώδικα υγιεινής τροφίμων του Codex Alimentarius. Σύμφωνα με την οδηγία 93/43 η εφαρμογή του H.A.C.C.P είναι υποχρεωτική σε κάθε επιχείρηση τροφίμων και ποτών, είτε εμπορική, είτε μεταποιητική και εφαρμόζεται από τις μεγαλύτερες επιχειρήσεις. Η κοινοτική οδηγία 93/43, οριζόντια οδηγία για την υγιεινή όλων των τροφίμων με ισχύ από 14/1/1996, υποχρεώνει δηλαδή όλους τους επαγγελματίες που ασχολούνται με τα τρόφιμα, να λάβουν μέτρα για την υγιεινή και την ποιότητα των προϊόντων τους.
- ❖ 2002 Το Ευρωπαϊκό Κοινοβούλιο και το Συμβούλιο καθορίζει τις γενικές αρχές και τις απαιτήσεις για τα τρόφιμα, με την ίδρυση της Ευρωπαϊκής Αρχής για την ασφάλεια των τροφίμων (EFSA) και τον καθορισμό διαδικασιών σε θέματα τροφο-ασφάλειας [Κανονισμός (ΕΚ) 178/2002]
- ❖ 2004 Αντικατάσταση της Οδηγίας 93/43 με τον Κανονισμό 852/2004 «για την υγιεινή των τροφίμων». Σύμφωνα με τον παραπάνω Κανονισμό της Ε.Ε όλες οι επιχειρήσεις τροφίμων θα πρέπει να αναπτύξουν και να εφαρμόσουν τεκμηριωμένα το σύστημα H.A.C.C.P μέχρι το τέλος του 2005. Εξαιρέση για την εφαρμογή του H.A.C.C.P αποτελούν οι επιχειρήσεις:
 - ο Στην πρωτογενή παραγωγή τροφίμων για ιδιωτική χρήση
 - ο Στην οικιακή Παρασκευή, χειρισμό και αποθήκευση τροφίμων για ιδιωτική κατανάλωση.
 - ο Στην άμεση προμήθεια από τον παραγωγό μικρών ποσοστών πρωτογενών προϊόντων (προϊόντα πρωτογενούς παραγωγής περιλαμβανομένων των προϊόντων εδάφους, της κτηνοτροφίας, της θύρας και της αλιείας) στον τελικό καταναλωτή ή στα τοπικά καταστήματα λιανικής πώλησης που προμηθεύουν άμεσα τον τελικό καταναλωτή.
 - ο Στα κέντρα συλλογής και βυρσοδεψίας, τα οποία εμπίπτουν στον ορισμό της επιχείρησης τροφίμων.

Παράλληλα, ακολούθησαν οι Κανονισμοί 853/2004 «Ειδικοί κανόνες υγιεινής για τα τρόφιμα ζωικής προέλευσης» και 854/2004 «Καθορισμός ειδικών διατάξεων για την οργάνωση των επίσημων ελέγχων στα προϊόντα ζωικής προέλευσης που προορίζονται για κατανάλωση από τον άνθρωπο».

1.5 Εφαρμογή του H.A.C.C.P στην Ελλάδα

Όπως προαναφέρθηκε η πλήρης και υποχρεωτική εφαρμογή του H.A.C.C.P έγινε στις αρχές της δεκαετίας του 1990 με την θέσπιση της Κοινοτικής Οδηγίας 93/43 ΕΟΚ και την συγγραφή από την επιτροπή του Codex Alimentarius οδηγιών για την ορθή εφαρμογή του. Η υποχρεωτική εφαρμογή του επιβάλλεται από την Ελληνική Νομοθεσία (ΦΕΚ 1219/04-10-2000) με την οποία ενεργοποιείται ο εθνικός φορέας Ε.Φ.Ε.Τ (Ενιαίος Φορέας Ελέγχου Τροφίμων) για τον έλεγχο εφαρμογής συστημάτων H.A.C.C.P στις επιχειρήσεις, καθώς επίσης και με την Υπουργική απόφαση 487 (Κ.Υ.Α. 487/21/09/2000), με την οποία ενσωματώθηκε στην Εθνική μας νομοθεσία η οδηγία 93/43.

Σύμφωνα με αυτή, θεσπίζονται οι γενικοί κανόνες ορθής υγιεινής πρακτικής για τα τρόφιμα και οι διαδικασίες για την τήρησή τους. Καθιερώνεται επομένως, η υποχρεωτική ανάπτυξη και εφαρμογή ενός συστήματος H.A.C.C.P με την ευθύνη των ίδιων των επιχειρήσεων, το οποίο στη συνέχεια επαληθεύεται για την ορθή εφαρμογή του από το κράτος μέσω του Ε.Φ.Ε.Τ (Ενιαίος Φορέας Ελέγχου Τροφίμων) και των συναρμόδιων υπηρεσιών των Νομαρχιακών Αυτοδιοικήσεων. Παράλληλα, προβλέπεται και η σύνταξη οδηγιών ορθής υγιεινής πρακτικής ανά ειδικότητες, διαδικασία που έχει αναλάβει ο Ε.Φ.Ε.Τ, επίσης καθορίζονται οι γενικές απαιτήσεις για τους χώρους, τις εγκαταστάσεις, τον εξοπλισμό, το προσωπικό, τη μεταφορά, την παροχή νερού κ.α.

Αξίζει ακόμα να σημειωθεί, πως επιχειρήσεις τροφίμων όπως αυτές χαρακτηρίζονται από τη Νομοθεσία, χαρακτηρίζονται οι επιχειρήσεις δημόσιες ή ιδιωτικές, που ασκούν μία ή περισσότερες από τις παρακάτω δραστηριότητες: παρασκευή, μεταποίηση, παραγωγή, συσκευασία, αποθήκευση, μεταφορά, διανομή, διακίνηση και προσφορά προς πώληση ή διάθεση τροφίμων (άρθρο 2 της οδηγίας 93/43 ΕΟΚ).

Στην Ελλάδα και για όλες τις χώρες της Ε.Ε ισχύει πλέον και ο Κανονισμός 852/2004, με την υποχρεωτική εφαρμογή του H.A.C.C.P για όλες τις επιχειρήσεις τροφίμων. Έτσι λοιπόν στην Ελλάδα, η ανάπτυξη και εφαρμογή ενός συστήματος H.A.C.C.P συνιστά νομοθετική επιταγή και ελέγχεται από τον Ε.Φ.Ε.Τ (Ενιαίος Φορέας Ελέγχου Τροφίμων) (ΚΥΑ 15523/20-08-2006/ΥΠΙΑΝ).

1.6 Το σύστημα H.A.C.C.P και η σημασία της παραγωγής ασφαλών τροφίμων.

Η ασφάλεια των τροφίμων έχει μέγιστη σημασία τόσο για τους παραγωγούς και προμηθευτές, όσο και για τους καταναλωτές: Η διάθεση στην αγορά μη ασφαλών τροφίμων μπορεί να προκαλέσει στους παραγωγούς- προμηθευτές (Τζιά Κ. Π., 2005):

- ✓ Δικαστικές αγωγές
- ✓ Καταβολή αποζημιώσεων
- ✓ Δυσφήμιση
- ✓ Νομικές κυρώσεις στους υπευθύνους, ακόμα και φυλάκιση
- ✓ Οικονομική καταστροφή
- ✓ Κλείσιμο της επιχείρησης

Από την άλλη μεριά στους καταναλωτές μπορεί να προκαλέσει:

- ✓ Ασθένεια- Τραυματισμό
- ✓ Μόνιμη Βλάβη στην Υγεία
- ✓ Θάνατο

1.7 Ανάπτυξη του Συστήματος H.A.C.C.P

Ανάπτυξη του Συστήματος H.A.C.C.P στα νοσοκομεία

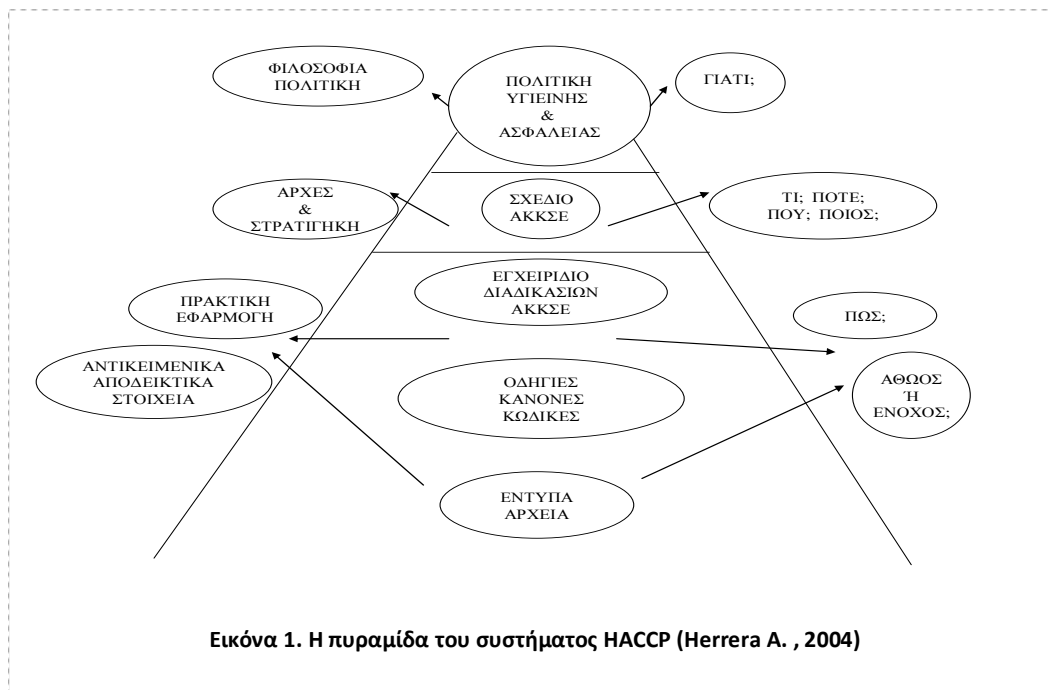
Ο ρόλος της διοίκησης των επιχειρήσεων μαζικής εστίασης είναι καταλυτικός στη ανάπτυξη και στην εφαρμογή του συστήματος H.A.C.C.P . Η Διοίκηση πρέπει να πειστεί για την αναγκαιότητα του συστήματος ώστε να παρέχει τις απαιτούμενες διευκολύνσεις στην Ομάδα H.A.C.C.P και να διαθέτει τα απαραίτητα κονδύλια που απαιτούνται. Η πολιτική της πρέπει να είναι ξεκάθαρη στο θέμα της ασφάλειας των παραγόμενων προϊόντων και να ανταποκρίνεται τόσο στους στόχους της επιχείρησης μαζικής εστίασης, όσο και στις απαιτήσεις των σιτιζομένων. Στις μικρές επιχειρήσεις ο ιδιοκτήτης πρέπει να είναι μέλος της ομάδας, έτσι ώστε να έχει πληρέστερη εικόνα των απαιτήσεων του συστήματος (Kirby, 1994).

Ανάπτυξη του Συστήματος H.A.C.C.P στις επιχειρήσεις

Η επιχείρηση πρέπει να καθιερώσει και να τηρεί ένα σύστημα H.A.C.C.P , ώστε να διασφαλίζει ότι όλοι οι γνωστοί εν δυνάμει κίνδυνοι έχουν αναγνωρισθεί και ότι όλοι οι σχετικοί κίνδυνοι ελέγχονται με τέτοιο τρόπο, ώστε το παραγόμενο τρόφιμο να είναι ασφαλές. Επίσης η επιχείρηση πρέπει να καθιερώσει και να τηρεί τεκμηρίωση που να αποδεικνύει ότι το σύστημα H.A.C.C.P έχει καθιερωθεί σύμφωνα με τις απαιτήσεις ενός προτύπου (Herrera A. , 2004).

Η επιχείρηση πρέπει να καταρτίσει ένα σχέδιο H.A.C.C.P , το οποίο θα ορίζει λεπτομερώς:

- ✓ Τους σχετικούς κινδύνους.
- ✓ Τα σημεία στα οποία πρέπει να ελέγχονται οι σχετικοί κίνδυνοι (Κρίσιμα Σημεία Ελέγχου).
- ✓ Τις μεθόδους παρακολούθησης που πρέπει να γίνουν, εάν η παρακολούθηση δείξει ότι ένα κρίσιμο σημείο ελέγχου δεν είναι υπό έλεγχο.
- ✓ Τον ορισμό υπευθύνου για την παρακολούθηση/ έλεγχο κάθε κρίσιμου σημείου ελέγχου.
- ✓ Την εφαρμογή όλων των διαδικασιών που υποστηρίζουν το σύστημα H.A.C.C.P
- ✓ Τα σημεία όπου τεκμηριώνεται η παρακολούθηση / έλεγχος.



1.8 Πολιτική ποιότητας , υγιεινής και ασφάλειας

Οι επιχειρήσεις μαζικής εστίασης πρέπει να θεωρούν υποχρέωσή τους την επίτευξη και διατήρηση υψηλών προτύπων ποιότητας, υγιεινής και ασφάλειας για όλα τα προϊόντα του. Τα πρότυπα αυτά πρέπει να είναι προσηλωμένα στις αρχές και στις απαιτήσεις των πλέον σύγχρονων και αποδεκτών εφαρμογών και πρακτικών με προσανατολισμό και στόχο την ποιότητα, την υγιεινή και την ασφάλεια των τροφίμων, την ικανοποίηση των καταναλωτών- πελατών και δευτερευόντος την οικονομία.

Για την εκπλήρωση των απαιτήσεων αυτών έχουν θεσπιστεί και εφαρμόζονται κατάλληλες διαδικασίες που διασφαλίζουν ότι μόνο τα αποδεκτά προϊόντα από άποψης ποιότητας και ασφάλειας, που πληρούν τις απαιτήσεις της Εθνικής και Κοινοτικής Νομοθεσίας, διατίθενται στην αγορά.

Η διοίκηση της επιχείρησης μαζικής εστίασης έχει ορίσει τους σκοπούς, τους στόχους και τη δέσμευση της στην ποιότητα, την υγιεινή και την ασφάλεια. Οι επιμέρους στόχοι της επιχείρησης ως προς την ποιότητα, την υγιεινή και την ασφάλεια είναι (Schothorst, 2004):

- ✓ Η παροχή υψηλών ποιοτικών προδιαγραφών των προϊόντων
- ✓ Η χρήση των πλέον προηγμένων τεχνολογικά μεθόδων για την παραγωγή και διάθεση προϊόντων με σταθερή βελτίωση της ποιότητας και εξασφάλιση της υγιεινής και ασφάλειάς τους.
- ✓ Η έγκαιρη και ασφαλής παράδοση των προϊόντων, σύμφωνα με τους κοινά αποδεκτά όρους των συμβάσεων.
- ✓ Η εξασφάλιση συνθηκών που εγγυώνται την υγιεινή και ασφάλεια των παραγόμενων προϊόντων.
- ✓ Η εκπαίδευση και η προσήλωση όλων των εργαζομένων στη συνεχή προσπάθεια για βελτίωση της ποιότητας εργασίας και της ασφάλειας των προϊόντων.
- ✓ Η προσαρμογή των προμηθευτών στις προσυμφωνημένες ποιοτικές ή τεχνικές προδιαγραφές, στους οικονομικούς όρους και στους προκαθορισμένους χρόνους παράδοσης των πρώτων υλών.

Η παραλαβή αρίστης ποιότητας πρώτων υλών, η εκτέλεση κάθε εργασίας σωστά από τη αρχή, η παραγωγή υψηλών προδιαγραφών των προϊόντων και η έγκαιρη και ασφαλής παράδοση των προϊόντων είναι αρχές που θα πρέπει να διέπουν κάθε δραστηριότητα της επιχείρησης μαζικής εστίασης.

Η διοίκηση, τα στελέχη και όλοι οι εργαζόμενοι στην επιχείρηση μαζικής εστίασης πρέπει να τηρούν την προκαθορισμένη «Πολιτική» της επιχείρησης και να προωθούν κάθε ενέργεια που προάγει και συντηρεί την ποιότητα, την υγιεινή και την ασφάλεια των προϊόντων.

Η διοίκηση και τα διευθυντικά στελέχη της επιχείρησης μαζικής εστίασης πρέπει να παρέχουν στο προσωπικό (1) επαρκή πληροφόρηση και εκπαίδευση για την εκπλήρωση των καθηκόντων τους και (2) να συντηρούν ευχάριστο κλίμα ανάμεσα στη Επιχείρηση, τους εργαζόμενους και το εργασιακό περιβάλλον.

Όλοι οι εργαζόμενοι της επιχείρησης μαζικής εστίασης πρέπει να διακατέχονται από το πνεύμα και να εναρμονίζονται με το γράμμα της Πολιτικής Ποιότητας, Υγιεινής και Ασφάλειας της Επιχείρησης. (Richards J, 1993).

1.9 Στάδια ανάπτυξης ενός συστήματος H.A.C.C.P

Η επιτυχής εφαρμογή των αρχών του H.A.C.C.P απαιτεί μία καλά προσδιορισμένη και συνεπή μεθοδολογία. Μία διαφορετική προσέγγιση είναι να γίνει η εφαρμογή των 7 αρχών του H.A.C.C.P. μέσω της ανάπτυξης των 12 ανεξάρτητων σταδίων του συστήματος. Επομένως λοιπόν για τη σωστή εφαρμογή των αρχών του H.A.C.C.P. απαιτείται η ακολουθία των παρακάτω βημάτων, όπως προσδιορίζονται στη λογική ακολουθία της εφαρμογής του συστήματος H.A.C.C.P. (Jones, Food safety, 1992).

| |
|------------------------------------------------------------------------------|
| 1. Επιλογή της ομάδας H.A.C.C.P |
| 2. Περιγραφή του Προϊόντος |
| 3. Προσδιορισμός της χρήσης του Προϊόντος |
| 4. Κατασκευή διαγράμματος ροής |
| 5. Επαλήθευση διαγράμματος ροής |
| 6. Καταγραφή - σε όλα τα στάδια -κινδύνων και αντίστοιχων προληπτικών μέτρων |
| 7. Καθορισμός των CCP's με εφαρμογή του "Διαγράμματος Αποφάσεων" |
| 8. Καθορισμός των κρίσιμων ορίων |
| 9. Εγκατάσταση συστήματος παρακολούθησης των CCP's |
| 10. Καθορισμός διορθωτικών ενεργειών για τις αποκλίσεις |
| 11. Εγκατάσταση συστήματος αρχειοθέτησης και καταγραφής |
| 12. Προσδιορισμός διαδικασιών επαλήθευσης |

Εικόνα 2. Στάδια ανάπτυξης σχεδίου HACCP (Μογ, 1994)

1.9.1 Επιλογή της ομάδας H.A.C.C.P

Το πρώτο και σημαντικότερο στάδιο για την ανάπτυξη ενός συστήματος H.A.C.C.P είναι η συγκρότηση της Ομάδας H.A.C.C.P. Βασική προϋπόθεση πριν από την συγκρότηση της ομάδας αυτής είναι η ενημέρωση όλου του προσωπικού από την διοίκηση της επιχείρησης, για να επισημανθεί η αναγκαιότητα καθώς και τα πλεονεκτήματα που το σύστημα H.A.C.C.P παρέχει, έτσι ώστε να πειστούν οι εργαζόμενοι να συνεργαστούν στην υλοποίησή του.

Στην ομάδα συμμετέχει προσωπικό από διάφορους τομείς, όπως οι υπεύθυνοι διασφάλισης ποιότητας, παραγωγής, τεχνικών υπηρεσιών, των τμημάτων έρευνας και ανάπτυξης καθώς και αποθήκευσης και διακίνησης των προϊόντων, το οποίο επιλέγεται με βάση τις ευθύνες, τις γνώσεις και τις εμπειρίες τους στην επιχείρηση, τις γνώσεις τους και τις εμπειρίες τους στα προϊόντα, στις διαδικασίες και τους κινδύνους που σχετίζονται με τον στόχο της μελέτης H.A.C.C.P.. Είναι σημαντικό η ομάδα να μην συγκροτείται σύμφωνα με την ιεραρχία της επιχείρησης, αλλά με βάση αντικειμενικά κριτήρια (Untermann, 1996).

Η συγκεκριμένη ομάδα είναι υπεύθυνη για τη συλλογή όλων των απαραίτητων στοιχείων, που θα αποτελέσουν την βάση για την σωστή ανάπτυξη και την εφαρμογή του συστήματος H.A.C.C.P.. Επίσης εκτός από τα μέλη του προσωπικού της επιχείρησης που θα εφαρμόσει το H.A.C.C.P.. Είναι ιδιαίτερα σημαντικό να συμμετέχουν και εξωτερικοί συνεργάτες, που είναι συνήθως άτομα πεπειραμένα στην διαχείριση όλων των πιθανών βιολογικών, χημικών ή φυσικών κινδύνων που συνδέονται με το προϊόν και τη διαδικασία. Αυτοί μπορεί να είναι ειδικοί οργανισμοί, εταιρίες παροχής υπηρεσιών του δημοσίου ή ιδιωτικού τομέα, οι οποίοι μαζί με την συμμετοχή της διοίκησης της επιχείρησης μαζικής εστίασης θα συγκεντρώσουν και θα χρησιμοποιήσουν, όλη την απαραίτητη γνώση για μια γόνιμη εγκατάσταση του συστήματος H.A.C.C.P.. (Worsfold, 2001).

Συνεπώς τα άτομα που απαρτίζουν την ομάδα H.A.C.C.P. είναι υπεύθυνα για την διεξαγωγή της ανάλυσης κινδύνου, τον προσδιορισμό των πιθανών κινδύνων σε κάθε βήμα της παραγωγικής διαδικασίας που πρέπει να προληφθούν και να ελεγχθούν, τον καθορισμό των κρίσιμων ορίων, την οργάνωση τακτικών παρακολούθησης και επαλήθευσης του συστήματος, ακόμα για την λήψη των διορθωτικών μέτρων που πρέπει να ληφθούν σε περίπτωση αποκλίσεων και απώλειας ελέγχου και τέλος για την τελική επικύρωση του συστήματος H.A.C.C.P..

1.9.2 Περιγραφή του προϊόντος

Το δεύτερο βήμα, αποτελεί την πλήρη περιγραφή του προϊόντος που παράγεται από τη επιχείρηση. Αυτή η περιγραφή συμβάλει στην εκτίμηση των πιθανών κινδύνων, οι οποίοι μπορεί να προέλθουν από τα συστατικά του προϊόντος ή ακόμα και από τα υλικά συσκευασίας του. Περιλαμβάνει πληροφορίες για τη σύνθεση του προϊόντος (συστατικά), τον τρόπο με τον οποίο παράγεται και συσκευάζεται το κάθε προϊόν αλλά και τη μέθοδο διανομής. Όσο αφορά για τη μέθοδο διανομής, πρέπει να περιγράφεται με σαφήνεια εάν το

τρόφιμο πρέπει να διανέμεται παγωμένο, κατεψυγμένο ή σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (Τζιά Κ. Π., 2005).

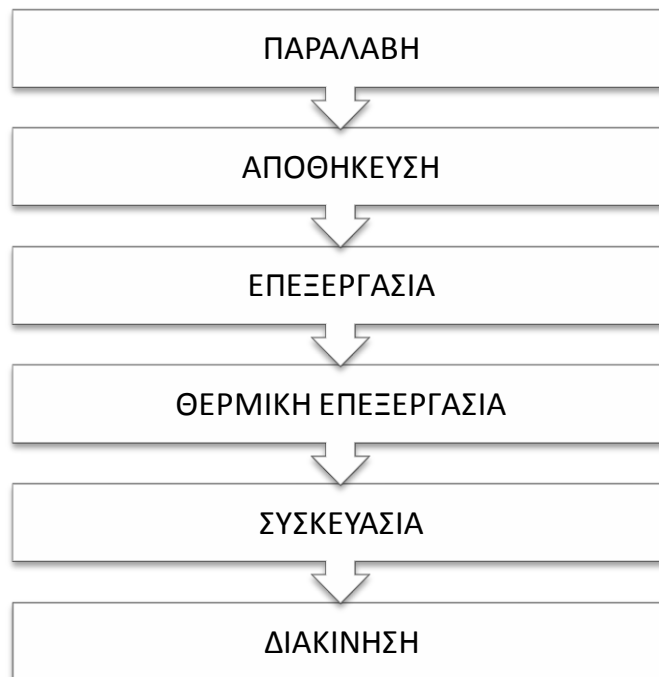
1.9.3 Προσδιορισμός της σχεδιαζόμενης χρήσης του προϊόντος.

Η σχεδιαζόμενη χρήση του προϊόντος πρέπει να βασίζεται στην αναμενόμενη χρήση του προϊόντος από τον τελικό χρήστη ή τον καταναλωτή. Σε συγκεκριμένες περιπτώσεις, θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη οι ευαίσθητες ομάδες πληθυσμού, π.χ. στην τροφοδοσία ιδρυμάτων.

1.9.4 Κατασκευή του διαγράμματος ροής της παραγωγικής διαδικασίας

Ένα εξίσου σημαντικό βήμα, είναι η κατασκευή του διαγράμματος ροής της παραγωγικής διαδικασίας, στο οποίο θα παρουσιάζονται ξεκάθαρα όλα τα επιμέρους στάδια στην παραγωγή των προϊόντων, από το πρώτο στάδιο της προμήθειας των πρώτων υλών μέχρι το τελευταίο, όπου τα προϊόντα θα είναι έτοιμα για την διακίνηση. Το διάγραμμα ροής θα πρέπει να είναι ευανάγνωστο και εύκολο στην παρακολούθηση όλων των σταδίων παραγωγής (Pierson, 1992).

Παράδειγμα διαγράμματος ροής παρουσιάζεται στην εικόνα 3 που ακολουθεί:



Εικόνα 3. Παράδειγμα διαγράμματος ροής εργασιών (Pierson, 1992)

1.9.5 Επαλήθευση του διαγράμματος ροής

Η επιβεβαίωση των διαγραμμάτων ροής που θα συνταχθούν για κάθε διεργασία θα πρέπει να γίνει με αναφορά σε κάθε στάδιο της παραγωγικής διαδικασίας, επαληθεύοντας κάθε σημείο που αναγράφεται στο διάγραμμα. Με την επαλήθευση του διαγράμματος ροής διεργασίας, πιστοποιείται η ακρίβεια και η πληρότητα του διαγράμματος. Ειδικότερα, στα παραπάνω πλαίσια θα πρέπει να ελεγχθούν όλες οι λεπτομέρειες, όπως για παράδειγμα το σημείο και η θερμοκρασία συντήρησης ενός συγκεκριμένου συστατικού.

Αξίζει να σημειωθεί ότι ο βασικός σκοπός του διαγράμματος ροής κάθε διεργασίας είναι η εντόπιση κάθε σημείου της παραγωγικής διαδικασίας όπου είναι δυνατό να εμφανιστεί κίνδυνος.

Επίσης, σημειώνεται πως η ένταξη κάθε εγγράφου που σχετίζεται με την ανάπτυξη του συστήματος H.A.C.C.P. όπως και του αντίστοιχου αναφορικά με την επαλήθευση του διαγράμματος ροής, θα πρέπει να περιλαμβάνει την ημερομηνία, το όνομα και την υπογραφή του υπεύθυνου σύνταξής του (Pierson, 1992).

1.9.6 Καταγραφή όλων των κινδύνων σε όλα τα στάδια της παραγωγής και των αντίστοιχων προληπτικών μέτρων (Αρχή 1^η – Ανάλυση Κινδύνου)

Μια λεπτομερής ανάλυση κινδύνου (Hazard Analysis) είναι το κλειδί στην προετοιμασία ενός αποτελεσματικού σχεδίου H.A.C.C.P.. Εάν δεν πραγματοποιηθεί σωστά, τότε το σύστημα H.A.C.C.P. δεν θα είναι αποτελεσματικό, ανεξάρτητα με το πόσο καλά ακολουθείται. Ο σκοπός της ανάλυσης του κινδύνου είναι η ανεύρεση όλων των πιθανών κινδύνων που η ύπαρξή τους θα μπορούσε να καταστήσει ένα τρόφιμο επισφαλές για την δημόσια υγεία (Oliveira, 2001).

Οι κίνδυνοι που αναζητούνται, αναλύονται και εκτιμώνται, μπορεί να είναι βιολογικοί, χημικοί ή φυσικοί. Αναμφισβήτητα, είναι ιδιαίτερος σημαντικό να εξετασθούν στην ανάλυση κινδύνου, τα συστατικά και οι πρώτες ύλες, κάθε βήμα στην διαδικασία παραγωγής, οι συνθήκες αποθήκευσης και διανομής των προϊόντων, καθώς και η τελική χρήση του τροφίμου από τον ίδιο τον καταναλωτή.

Σ' αυτό το στάδιο δηλαδή, θα οριστούν οι κίνδυνοι που είναι δυνατόν να εμφανιστούν στην παραγωγική διαδικασία, ενώ παράλληλα θα προσδιοριστούν και οι προληπτικές ενέργειες αποτροπής του κάθε κινδύνου. Προληπτικά μέτρα / ενέργειες είναι αυτές οι δράσεις και ενέργειες, οι οποίες είναι απαραίτητες για να εξαφανιστούν οι κίνδυνοι ή να μειωθεί η επίπτωσή τους ή η εμφάνισή τους σε αποδεκτά επίπεδα.

Περισσότερα από ένα προληπτικά μέτρα μπορεί να απαιτούνται για τον έλεγχο ενός συγκεκριμένου κινδύνου και περισσότεροι από ένας κίνδυνοι μπορεί να ελέγχονται από ένα συγκεκριμένο προληπτικό μέτρο. Στις προληπτικές ενέργειες εντάσσονται τα φυσικά, χημικά ή άλλα μέσα, τα οποία θα χρησιμοποιηθούν για να ελέγξουν κάθε κίνδυνο που έχει προσδιοριστεί σε κάποιο από τα βήματα της παραγωγικής διαδικασίας. Βέβαια, η σωστή ανίχνευση βιολογικών, χημικών ή φυσικών κινδύνων κατά την παραγωγική διαδικασία προϋποθέτει την γνώση χημικών, φυσικών και μικροβιολογικών χαρακτηριστικών των τροφίμων (π.χ. κρέας, συστατικά, πρόσθετα), όπως επίσης και τον τρόπο με τον οποίο είναι δυνατόν μια διεργασία να επηρεάσει αυτά τα χαρακτηριστικά. Πολύ χρήσιμη είναι και η γνώση της αλληλεπίδρασης μεταξύ των συστατικών που συνθέτουν το κάθε τρόφιμο (Τζιά Κ. Π., 2005).

Η ομάδα H.A.C.C.P., λαμβάνοντας υπόψη της κάθε τμήμα του διαγράμματος ροής, αναπτύσσει μία λίστα πιθανών βιολογικών, χημικών ή φυσικών κινδύνων που μπορεί να εισαχθούν, να αυξηθούν ή να ελεγχθούν σε κάθε βήμα τη παραγωγικής διαδικασίας. Στη συνέχεια ακολουθεί το στάδιο της αξιολόγησης και της εκτίμησης του κάθε κινδύνου, με βάση την εμπειρία, τα υπάρχοντα επιδημιολογικά στοιχεία και την βιβλιογραφία. Αναζητείται έπειτα η δυνατότητα προληπτικών ενεργειών-μέτρων για την απαλοιφή του κάθε κινδύνου. Κίνδυνοι οι οποίοι έχουν πολύ μικρή πιθανότητα να εμφανιστούν, θα πρέπει επίσης να καταγράφονται, όπως επίσης και ο λόγος για τον οποίο δεν θα πρέπει να δοθεί ιδιαίτερη σημασία για ορισμένους από αυτούς.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, οι κίνδυνοι που εντοπίζονται και αναλύονται μπορεί να είναι βιολογικοί, χημικοί ή φυσικοί (Αρβανιτογιάννης Ι, 2001). Συγκεκριμένα:

1.9.6.1 Βιολογικοί Κίνδυνοι

Ο όρος βιολογικός κίνδυνος, συμπεριλαμβάνει τους μικροοργανισμούς που μπορούν να βλάψουν την ανθρώπινη υγεία, όπως τα βακτήρια, τα παράσιτα, τα πρωτόζωα και οι ιοί.. Συχνά αγροτικά προϊόντα αλλά και ζώα, τα οποία προορίζονται για κατανάλωση (από τον άνθρωπο), είναι φορείς ενός μεγάλου αριθμού βακτηρίων. Μπορεί βέβαια, από τη πλευρά της δημόσιας υγείας τα περισσότερα βακτήρια να είναι ακίνδυνα, ωστόσο υπάρχουν ορισμένα, τα λεγόμενα παθογόνα, τα οποία μπορούν να προκαλέσουν ασθένεια ή ακόμα και θάνατο στον άνθρωπο. Ο αριθμός και το είδος των βακτηρίων διαφέρουν από τρόφιμο σε τρόφιμο, από ζώο σε ζώο, από μια γεωγραφική περιοχή σε μία άλλη, ακόμα και από τη μέθοδο η οποία χρησιμοποιείται για τη συγκομιδή ενός προϊόντος ή από τον τρόπο εκτροφής και σφαγής ενός ζώου.

Από τη άλλη πλευρά, κατά την διάρκεια της παραγωγής, επεξεργασίας, συσκευασίας, μεταφοράς, συντήρησης και διανομής, ένα τρόφιμα μπορεί να εκτεθεί σε μικροβιακή μόλυνση. Μερικά από τα κυριότερα παθογόνα βακτήρια τα οποία προκαλούν τροφικές δηλητηριάσεις είναι: *Salmonella*, *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica*, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum* και *Escherichia coli* O157:H7.

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, ως βιολογικοί κίνδυνοι χαρακτηρίζονται οι μικροοργανισμοί που μπορούν να προκαλέσουν τροφιμογενής λοιμώξεις στον άνθρωπο. Οι σημαντικότεροι από αυτούς, που απαντώνται ευρέως στο φυσικό περιβάλλον, είναι η Λιστέρια, ο Σταφυλόκοκκος και τα Κολοβακτηριοειδή (*Eserichia Coli*). Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, έχουν καταγραφεί παγκοσμίως μεγάλες εκρήξεις λοιμώξεων προερχόμενες από την κατανάλωση μολυσμένων τροφίμων.

Παρακάτω, αναφέρονται μερικά ενδεικτικά παραδείγματα:

Η.Π.Α

2005 : μολύνθηκαν 304 άτομα ύστερα από κατανάλωση μολυσμένης γαλοπούλας με σαλμονέλα, ενώ καταγράφηκε 1 θάνατος.

2007: στην πολιτεία της Georgia των Η.Π.Α, 2 από τις μεγαλύτερες βιομηχανίες παραγωγής φυστικοβούτυρου ενοχοποιήθηκαν για το θάνατο 1 ατόμου από σαλμονέλωση και για 628 κρούσματα. Αιτία ήταν η εισαγωγή υγρασίας στις πρώτες ύλες, στα πρώτα στάδια παραγωγής του προϊόντος, με αποτέλεσμα την ανάπτυξη και εξάπλωση της σαλμονέλας κατά μήκος της γραμμής παραγωγής και την επιμόλυνση του τελικού προϊόντος (D'Aoust J. M., 2007).

Ιαπωνία

1999: 53 άτομα κατανάλωσαν προπαρασκευασμένο φαγητό που περιείχε μολυσμένο κρόκο αυγού με σταφυλόκοκκο, με αποτέλεσμα 21 να ασθενήσουν και 8 να χρειαστούν νοσοκομειακή περίθαλψη. Σε δείγματα κοπράνων των 8 ασθενών και στα υπολείμματα των γευμάτων τους απομονώθηκε και τυποποιήθηκε το ίδιο στέλεχος του *S. aureus*. Το συμβάν έλαβε χώρα σε χώρο μαζικής εστίασης, δηλαδή στο εστιατόριο της εταιρείας που εργάζονταν.

Βραζιλία

2003: 31 άτομα αρρώστησαν από την κατανάλωση μολυσμένου τροφίμου, ως αποτέλεσμα ελλιπούς προσωπικής υγιεινής από εργαζομένους σε εστιατόριο. Ο εργαστηριακός έλεγχος έδειξε την παρουσία του ίδιου στελέχους σταφυλόκοκκου στο τρόφιμο καθώς και στη ρινοφαρυγγική κοιλότητα και τα νύχια των 4 από τους 5

εργαζόμενους του εστιατορίου. Τα στοιχεία των ερευνών δείχνουν ότι 30-50% των εργαζομένων που επεξεργάζονται τρόφιμα είναι δυνητικοί φορείς και βασική πηγή μόλυνσης των τροφίμων.

Αντιστοίχως, η μόλυνση τροφίμων με *E.coli*, από το είδος των κολοβακτηριοειδών, έχει ενοχοποιηθεί για μεγάλες επιδημικές εκρήξεις. Σε 4 πολιτείες της δυτικής Αμερικής, τον Νοέμβριο του 1992, συνέβη μια από τις μεγαλύτερες επιδημίες μέσω της κατανάλωσης μοσχαρίσιου κιμά που οφειλόταν στο 0117:H7 στέλεχος της *E.coli*. Σ' αυτή την επιδημία, 724 άτομα νόσησαν ενώ 4 παιδιά πέθαναν.

1.9.6.1.1 *Staphylococcus aureus* & σταφυλοκοκκικές εντεροτοξίνες

Ο *Staphylococcus aureus* ανήκει στο γένος *Staphylococcus* της οικογένειας *Micrococcaceae*. Η οικογένεια περιλαμβάνει τα γένη *Staphylococcus*, *Micrococcus* και *Planococcus*, τα οποία διαχωρίζονται με βάση τα χαρακτηριστικά του Πίνακα 1.

Πίνακας 1. Διαφορικά χαρακτηριστικά των γενών της οικογένειας *Micrococcaceae* (Buchanan, 1974)

| Χαρακτηριστικό | <i>Micrococcus</i> | <i>Staphylococcus</i> | <i>Planococcus</i> |
|-------------------------------------|--------------------|-----------------------|--------------------|
| Κόκκοι + Gram | + | + | + |
| Παραγωγή καταλάσης | + | + | + |
| Ζύμωση της γλυκόζης (αναεροβίως) | - | + | + |
| Κινητικότητα | - | - | + |
| Αναλογία G +C (moles%) | 66-75 | 30-40 | 39-52 |

Στο γένος *Staphylococcus* αναγνωρίζονται τρία είδη: ο *S.aureus*, ο *S.epidermidis* και ο *S.saprophyticus* (Buchanan, 1974). Τα είδη αυτά διαφοροποιούνται με βάση τα χαρακτηριστικά του πίνακα 2.

Εξάλλου από το 1966 ο Baird -Parker πρότεινε την ταξινόμηση των σταφυλόκοκκων και μικρόκοκκων σε υποομάδες με βάση τα χαρακτηριστικά που περιγράφονται στον πίνακα 3.

Ως *S. aureus* χαρακτηρίζονται τα στελέχη που ανταποκρίνονται στα χαρακτηριστικά της υποομάδας I του γένους *Staphylococcus*.

Η ταξινόμηση αυτή δεν έχει γίνει ακόμη επίσημα παραδεκτή, παρά το γεγονός ότι χρησιμοποιείται από πολλούς ερευνητές.

Πίνακας 2. Χαρακτηριστικά διαφοροποιήσεως των ειδών του γένους *Staphylococcus* (Buchanan, 1974)

| Χαρακτηριστικό | <i>S.aureus</i> | <i>S.epidermidis</i> | <i>S.saprophyticus</i> |
|--------------------------------|-----------------|----------------------|------------------------|
| Παραγωγή πηκτάσης | + | - | - |
| Ζύμωση μαννιτόλης (αεροβίως) | + | d | d |
| Ζύμωση μαννιτόλης (αναεροβίως) | + | - | - |
| Παραγωγή α-τοξίνης | + | - | - |
| Θερμοανθεκτική DNase | + | - | - |

d=διάφορη αντίδραση

Πίνακας 3. Σχήμα ταξινόμησης σταφυλόκοκκων και μικρόκοκκων κατά Baird- Parker (Baird-Parker, 1966)

| Χαρακτηριστικό | Ομάδα I | | | | | | Ομάδα II | | | | | | | |
|--------------------------------|--------------------------|----|-----|----|---|----|------------------|---|---|---|---|---|---|---|
| | Staphylococcus Rosenbach | | | | | | Micrococcus Cohn | | | | | | | |
| | I | II | III | IV | V | VI | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| Χρωστική (ροζ) | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Παραγωγή οξέος από τη γλυκόζη: | | | | | | | | | | | | | | |
| αεροβίως | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | ± | ± |
| αναεροβίως | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Παραγωγή πηκτάσης | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Παραγωγή φωσφατάσης | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - |
| Παραγωγή ακετοΐνης | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - |
| Παραγωγή οξέος από: | | | | | | | | | | | | | | |
| αραβινόζη | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | V | + | - | - |
| λακτόζη | + | + | V | - | + | V | - | + | V | + | + | + | - | - |
| μαλτόζη | + | + | - | V | + | V | V | + | + | + | + | + | - | ± |
| μαννιτόλη | + | - | - | - | - | + | - | - | + | + | + | + | - | - |

± : Ασθενής ή αρνητική

V : Διάφορη αντίδραση

Κλινικά συμπτώματα

Τα συμπτώματα περιλαμβάνουν ναυτία, έμετο, κοιλιακές κράμπες και διάρροια. Άλλα πιθανά συμπτώματα είναι πονοκέφαλος, γενική αδυναμία, ζαλάδα, ρίγη και εφίδρωση. Η έναρξη των συμπτωμάτων συμβαίνει μεταξύ μιας και 7 ωρών, συνήθως 2 με 4 ώρες, μετά την κατανάλωση μολυσμένης με το βακτήριο τροφής. Τα συμπτώματα της ασθένειας υποχωρούν και η ανάρρωση είναι ταχεία, συνήθως μετά από 2 μέρες. Ο δείκτης θνησιμότητας είναι πολύ χαμηλός, με θνητότητα που ποικίλει από 0,03% για το γενικό πληθυσμό έως 4,4% για πιο ευαίσθητους πληθυσμούς, όπως είναι τα παιδιά και οι ηλικιωμένοι (Montvill, 2001).

Επιδημιολογία - Πηγές και ξενιστές

Οι σταφυλόκοκκοι είναι ευρέως διαδεδομένοι και υπάρχουν στην επιφάνεια του σώματος των θερμόαιμων ζώων. Αν και συνήθως τα περισσότερα είδη αποικίζουν τους βλεννογόνους και το δέρμα, συνιστώντας μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας, είναι δυνητικά παθογόνοι μικροοργανισμοί και συχνά προκαλούν μόλυνση μέσω μιας ανοιχτής πληγής. Οι άνθρωποι είναι φορείς δυνητικά παθογόνων σταφυλόκοκκων και θεωρούνται ως οι ξενιστές που συμβάλλουν στη διασπορά του μικροοργανισμού σε άλλα άτομα καθώς και στα τρόφιμα. Όντως, περίπου τα μισά από τα γνωστά στελέχη αποικίζουν είτε αποκλειστικά τον ανθρώπινο οργανισμό (π.χ. *S. cohnii*) ή ανθρώπους και ζώα (π.χ. *S. aureus*). Το ανθρώπινο δέρμα αποτελεί το φυσικό περιβάλλον του *S. epidermidis* και *S. haemolyticus*.

Τα ζώα αποτελούν σημαντική πηγή μόλυνσης από σταφυλόκοκκο. Η μαστίτιδα, μια ασθένεια συνήθως προκαλούμενη από *S. aureus*, είναι μείζονος ενδιαφέροντος για την βιομηχανία γάλακτος και μια πιθανή απειλή για την δημόσια υγεία, αφού μπορεί να ευθύνεται για την μόλυνση του γάλακτος και άλλων προϊόντων πριν και κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας τους.

1.9.6.1.2 *Salmonella*

Οι Σαλμονέλες ανήκουν στην οικογένεια των Εντεροβακτηριοειδών (*Enterobacteriaceae*), η οποία περιλαμβάνει τις φυλές και τα γένη που καταγράφονται στον πίνακα 4 (Edwards, 1972).

Οι Σαλμονέλες είναι αρνητικά κατά Gram κοκκοβακτηρίδια διαστάσεων 0,6 x 2μm, κινητά με περίτριχες βλεφαρίδες, αερόβια ή προαιρετικώς αναερόβια, μη σπορογόνα και δεν διαθέτουν έλυτρο. Εξαιρεση αποτελούν οι *S. pullorum* και *S. gallinarum* που είναι ακίνητες και οι *S. typhi*, *S. paratyphi* και *S. dublin* που παράγουν ένα ειδικό περίβλημα που μοιάζει με έλυτρο (Edwards, 1972), (Buchanan, 1974).

Η παρουσία των Σαλμονελών στα τρόφιμα είναι ανεπιθύμητη. Οι περισσότερες χώρες έχουν θεσπίσει σταθερότυπους σχετικά με τα ανεκτά επίπεδα σαλμονελών σ' αυτά. Με εξαίρεση τις *S. typhi* και *S. paratyphi* A και C (για τις οποίες η μολύνουσα δόση στα τρόφιμα είναι από 1-10 κύτταρα) απαιτείται συνήθως μεγάλος σχετικά αριθμός κυττάρων για την πρόκληση τροφολοιμώξεων. Άγνωστος όμως είναι ο ελάχιστος αριθμός κυττάρων των υπολοίπων Σαλμονελών τα οποία προσλαμβάνόμενα από τον άνθρωπο μπορούν να προκαλέσουν λοίμωξη σε αυτόν. Γι' αυτόν το λόγο θα πρέπει να αποτελεί κανόνα, ότι και

ένα ακόμη κύτταρο Σαλμονέλας είναι ικανό να προκαλέσει λοίμωξη όταν βρίσκεται μέσα σε τρόφιμο στο οποίο μπορούν να δημιουργηθούν κατάλληλες συνθήκες πολλαπλασιασμού ή όταν το τρόφιμο πρόκειται να καταναλωθεί από ευαίσθητα άτομα, όπως παιδιά, γέροντες ή ασθενείς. Εξάλλου έχει αποδειχθεί ότι η πρόσληψη από τον άνθρωπο μικρού αριθμού, μη οικολογικά προσαρμοσμένων σ' αυτόν ειδών σαλμονελών, δημιουργεί ασυμπτωματικούς φορείς (Thatcher F.S., 1968), (Bowmer, 1965).

Η συνθήκες που μπορεί να αναπτυχθεί η σαλμονέλα είναι: θερμοκρασία από τους 2-54°C με βέλτιστη τους 35-37°C, ΡΗ από 4,0 – 9,5 με βέλτιστο εύρος 6,5 – 7,5 και ενεργό νερό 0,93 ή μεγαλύτερο.

Πίνακας 4. Ταξινόμηση Εντεροβακτηριοειδών κατά (Edwards, 1972)

| | | |
|----------|----------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|
| ΦΥΛΗ I | ΓΕΝΟΣ I ΓΕΝΟΣ II | ESCHERICHEAE Escherichia Shigella |
| ΦΥΛΗ II | ΓΕΝΟΣ I | EDWARDSIELLEAE Edwardsiella |
| ΦΥΛΗ III | ΓΕΝΟΣ I ΓΕΝΟΣ II ΓΕΝΟΣ III | SALMONELLEAE Salmonella Arizona Citrobacter |
| ΦΥΛΗ IV | ΓΕΝΟΣ I ΓΕΝΟΣ II ΓΕΝΟΣ III ΓΕΝΟΣ IV | KLEBSIELLEAE Klebsiella Enterobacter Aerobacter Serratia |
| ΦΥΛΗ V | ΓΕΝΟΣ I ΓΕΝΟΣ II | PROTEAEAE Proteus Providencia |

Κλινικά συμπτώματα- Επιδημιολογία

Τα κλινικά συμπτώματα της ανθρώπινης σαλμονέλλωσης περιλαμβάνουν έναν μεγάλο αριθμό διαταραχών, όπως παρουσιάζεται στον παρακάτω πίνακα (D'Aoust J. M., 2007).

| ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ | TYPHOID /PARATYPHOID | NON- TYPHOID |
|-----------------------|-------------------------------|--------------|
| Περίοδος επώασης | 8-28 Μέρες | 8-72 Ώρες |
| Διάρροια | + (δυσκοιλιότητα) | +++ (υδαρής) |
| Κοιλιακοί πόνοι | ++ | +++ |
| Πυρετός | ++ | + (<48 ΩΡΕΣ) |
| Συστημική εξάπλωση | +++ (≥7 μέρες από την έναρξη) | + |
| Ροζ κηλίδες | + | - |
| Διάρκεια οξείας φάσης | ≤ 30Μέρες | ≤ 5 Μέρες |

Η συχνότητα της εμφάνισης των συμπτωμάτων εκτιμούνται χρησιμοποιώντας μια εμπειρική κλίμακα από [+] έως [+++]

Θηλαστικά, πτηνά, τρωκτικά, ερπετά, αμφίβια και έντομα συμβάλλουν στην παραμονή της σαλμονέλλας στο περιβάλλον, δρώντας ως ξενιστές, ενώ παράλληλα μπορούν να μολύνουν τον άνθρωπο μέσω άμεσης επαφής ή έμμεσα, με τη μόλυνση των επιφανειακών υδάτων. Κατόπιν με τη χρήση τους για άρδευση, αλλά και στα εκτροφεία ψαριών και οστρακοειδών η μόλυνση μεταδίδεται στον άνθρωπο. Ο επιπολασμός της σαλμονέλλας στα ζώα που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή κρέατος και στα ωμά παράγωγά τους διαφέρει από χώρα σε χώρα. Για παράδειγμα, η επίπτωση της σαλμονέλλας σε σφάγια κοτόπουλου και χοιρινού ποικίλλει από 10,5 έως 62,5 % και από 0,8 έως 91,8% αντίστοιχα (D'Aoust J. , 2000).

1.9.6.1.3 Κολοβακτηριοειδή – Εντερικής προελεύσεως κολοβακτηριοειδή-*E.coli*

Την οικογένεια των εντεροβακτηριοειδών απαρτίζουν διάφορα γένη των οποίων τα είδη είναι αρνητικά κατά Gram βακτηρίδια, αερόβια ή προαιρετικώς αναερόβια, ασπορογόνα και ζυμώνουν τη γλυκόζη με παραγωγή οξέος και αερίου (Buchanan, 1974).

Τα κολοβακτηριοειδή συνιστούν μια ευρύτερη ομάδα της οικογένειας των εντεροβακτηριοειδών και χαρακτηρίζονται από την ικανότητά τους να ζυμώνουν την λακτόζη με παραγωγή οξέος και αερίου. Η παρουσία τους στα τρόφιμα υποδηλώνει, ως ένα βαθμό, μόλυνση του τροφίμου άμεσα ή έμμεσα με εντερικό περιεχόμενο ανθρώπου ή ζώων. Κατά συνέπεια το τρόφιμο περιέχει πιθανώς και άλλους μικροοργανισμούς εντερικής προελεύσεως (*salmonella*, *shigella*, εντερικής προελεύσεως ιούς κλπ.). Επομένως τα κολοβακτηριοειδή αποτελούν “δεικτη” της υγιεινής καταστάσεως ενός

τροφίμου. Οι αντιπρόσωποι των κολοβακτηριοειδών ανήκουν στα γένη *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* και *Klebsiella*.

Επειδή όμως ορισμένα είδη του γένους *Enterobacter* και του γένους *Klebsiella* προσαρμόζονται και επιβιώνουν για πολύ μεγάλο χρονικό διάστημα στο περιβάλλον, η ανεύρεσή τους στα τρόφιμα και ιδιαίτερα στα τρόφιμα φυτικής προελεύσεως ή στο νερό, δεν υποδηλώνει πάντα εντερική ρύπανση.

Αντίθετα η ανεύρεση εντερικής προελεύσεως κολοβακτηριοειδών (faecal coliforms) υποδηλώνει με μεγαλύτερη πιθανότητα εντερική μόλυνση. Τα εντερικής προελεύσεως κολοβακτηριοειδή αντιπροσωπεύονται κυρίως από την *E.coli* I (πίνακας 5) και δευτερευόντως από τους τύπους II και IV του *Enterobacter cloacae* οι οποίοι όμως δεν παράγουν ινδόλη. Θετική δοκιμή ινδόλης και παραγωγή αερίου από τη λακτόζη στους $44,5 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ χαρακτηρίζουν την *E.coli* (Thatcher F.S., 1968). Ασφαλέστερα βέβαια η *E.coli* ταξινομείται με τις δοκιμές IMViC, οπότε εφόσον ανταποκρίνεται στον τύπο ++-- (πίνακας 5) θεωρείται ως εντερικής προελεύσεως (Thatcher F.S., 1968), (ΑΡΗΑ, 1976).

Εξάλλου ορισμένα στελέχη της *E.coli*, τα οποία χαρακτηρίζονται ως εντεροπαθογόνα (EEC) έχουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον για την υγιεινή των τροφίμων, γιατί εκτός από τη σημασία τους ως δεικτών εντερικής ρυπάνσεως των τροφίμων, αποδείχθηκε ότι μπορούν να προκαλέσουν τροφική λοίμωξη με έντονα γαστρεντερικά συμπτώματα (Magier, 1973).

Για τη σωστή εκτίμηση της μικροβιολογικής ποιότητας ενός τροφίμου είναι σκόπιμο να προσδιορίζονται και οι τρεις ομάδες εντεροβακτηριοειδών (κολοβακτηριοειδή, εντερικής προελεύσεως κολοβακτηριοειδή, *E.coli*).

Πίνακας 5. Ταξινόμηση κολοβακτηριοειδών με βάση τις δοκιμές IMViC* (Thatcher F.S., 1968)

| Είδος - Τύπος | Παραγωγή αερίου στους 44- 44,5°C | Ινδόλη | Methyl red | Voges Proskauer | Κιτρικά |
|-------------------------------|----------------------------------------|--------|------------|--------------------|---------|
| Escherichia coli | | | | | |
| Τύπος I (τυπικά) | + | + | + | - | - |
| Τύπος II | - | - | + | - | - |
| Ενδιάμεσοι (Intermediates) | | | | | |
| Τύπος I | - | - | + | - | + |
| Τύπος II | - | + | + | - | + |
| Enterobacter aerogenes | | | | | |
| Τύπος I | - | - | - | + | + |
| Τύπος II | - | + | - | + | + |
| Enterobacter cloacae | - | - | - | + | + |
| Άτυπα | | | | | |
| Τύπος I | - | + | + | - | - |
| Τύπος II | + | - | + | - | + |
| Τύπος VI | + | - | - | + | + |
| Άτυπα άλλων τύπων | Αντιδράσεις διάφορες | | | | |

*I= Indole, M= Methyl Red, V= Vogues Proskauer, iC= Citrate

Κλινικά συμπτώματα

Μία μόλυνση με εντεροαιμοραγική *E.coli* (enterohemorrhagic *E.coli*, EHEC) μπορεί να έχει πολλά και διαφορετικά συμπτώματα. Το πιο κοινό είναι η αιμορραγική κολίτιδα (hemorrhagic colitis, HC) ή αιματηρή διάρροια. Ξεκινάει με κοιλιακές κράμπες και διάρροια που στην αρχή είναι υδαρής και στη συνέχεια γίνονται αιματηρές. Ο ασθενής μπορεί να έχει χαμηλό ή και καθόλου πυρετό. Ο χρόνος επώασης είναι από 2-10 μέρες και είναι πολύ μεγαλύτερος από άλλες μολύνσεις που προκαλούν διάρροια. Ναυτία, εμετός, πονοκέφαλοι και ρίγος έχουν επίσης αναφερθεί. Η εισαγωγή στο νοσοκομείο κατά τη διάρκεια του HC μπορεί να φτάσει μέχρι και το 82%, όπου αντιμετωπίζονται τα συμπτώματα αλλά δεν υπάρχει θεραπεία για την ασθένεια.

Επιδημιολογία

Τα βοοειδή και τα πρόβατα είναι οι κύριες δεξαμενές μεταφοράς της *E.coli* 0157, αλλά και τα ζώα της φάρμας ή τα άγρια ζώα μπορεί να μεταφέρουν την μόλυνση και να συνδράμουν στην οδό της μόλυνσης του περιβάλλοντος. Τα περιττώματα των ζώων είναι η κύρια πηγή μόλυνσης του περιβάλλοντος και η συνεχόμενη εισροή τους σε αυτό είναι εν μέρη αιτία συνεχιζόμενης μόλυνσης.

Η μετάδοση από το περιβάλλον προς τον άνθρωπο και τα ζώα γίνεται μέσω του νερού, των απορριμμάτων, των τροφίμων και αποτελούν σοβαρό κίνδυνο. Η *E. Coli* 0157 μπορεί να επιζήσει για περισσότερο από ένα χρόνο (σύμφωνα με καλλιέργεια κοπράνων προβάτου σε εργαστήριο). Επίσης υπάρχει και η μετάδοση από άνθρωπο σε άνθρωπο ύστερα από κοντινή επαφή με ασθενή που έχει διάρροια.

1.9.6.1.4 *Listeria monocytogenes*

Η *L. monocytogenes* απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1924 στο Cambridge από τον Murray και τους συνεργάτες του, σε κουνέλια που είχαν πεθάνει από μία άγνωστη για την εποχή ασθένεια, η οποία προκαλούσε ασυνήθιστη αύξηση των μονοκυττάρων στο αίμα. Γι' αυτόν το λόγο το παθογόνο ονομάστηκε *Bacterium monocytogenes*. Το 1940 ο Ririe έδωσε στο γένος το όνομα *Listeria*, αφιερώνοντάς το στον Άγγλο χειρουργό Sir Joseph Lister.

Το γένος *Listeria* δεν ανήκει ακόμα σε μια καλά ορισμένη οικογένεια βακτηρίων, αλλά είναι ταξινομικά κοντά με την οικογένεια του *Lactobacillaceae*, και περιλαμβάνει έξι είδη: *L.monocytogenes*, *L. ivanivii*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. grayi*. Η *Listeria* είναι αναερόβια και όχι πολύ απαιτητική, με αρκετά μεγάλη αντοχή σε αντίξοες συνθήκες του περιβάλλοντος. Παρόλα αυτά δεν παράγει σπόρους. Οι λιστέριες συνήθως εμφανίζονται σαν Gram θετικοί βάκιλοι (0,5x 1μm), που περιβάλλονται από τριχοειδή μαστίγια. Οι θερμοκρασίες ανάπτυξης κυμαίνονται σε ένα μεγάλο εύρος, από (-)1⁰C έως (+)45⁰C και με ένα εύρος pH από 4.0 - 9.5. Είναι τα πιο θερμοάντοχα μη σπορογόνα βακτήρια και απενεργοποιούνται στους 72⁰C για 15'' ή με άλλους ανάλογους συνδυασμούς.

Η περίοδος επώασης είναι από 1 μέρα μέχρι 3 μήνες, με μέσο όρο για τους ενήλικες τις 3 εβδομάδες, για τα νεογνά μερικές μέρες και για τις ενδο-ουρηθρικές μολύνσεις 30 μέρες

Κλινικά συμπτώματα

Η *L.monocytogenes* είναι ένα εξελισσόμενο παθογόνο που έχει προσαρμοστεί σε εχθρικά περιβάλλοντα και έχει αρχίσει να γίνεται εξαιρετικά ανθεκτικό στα αντιβιοτικά. Παρά τη μεγάλη διάχυσή του στο περιβάλλον, τα λαχανικά, τα ζώα και τα φαγητά, η *Listeria* είναι σπάνια. Άνθρωποι με αδύναμο αμυντικό σύστημα ύστερα από μεγάλες χειρουργικές επεμβάσεις (νεφρά, συκώτι, καρδιά), ή με χρόνιες παθολογικές ασθένειες, βρίσκονται σε μεγαλύτερο κίνδυνο για μόλυνση από *Listeria*. Η κλινική εικόνα χαρακτηρίζεται κυρίως από νευρολογικά συμπτώματα που μοιάζουν με εκείνα του *C.botulinum* (McLauchlin, 2004). Η *Listeria* μπορεί να αφήσει στον άρρωστο χρόνιες επιπλοκές ή υπολειμματική κατάσταση που απαιτεί θεραπεία αποκατάστασης για πολλούς μήνες, ενώ μπορεί να προκαλέσει το θάνατο.

Η λοίμωξη στον υγιή ενήλικο είναι συνήθως ασυμπτωματική ή μοιάζει με μέτριας μορφής γρίπη. Σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να εμφανίσει μηνιγγίτιδα ή σηψαιμία (κυρίως σε ανθρώπους μεγάλης ηλικίας ή ανοσοκατεσταλμένους). Η μόλυνση εγκύων γυναικών είναι συνήθως μέτρια. Αλλά αν γίνει στο 1ο τρίμηνο της εγκυμοσύνης μπορεί να οδηγήσει σε αποβολή. Στο 3^ο τρίμηνο της εγκυμοσύνης μπορεί να προκαλέσει το θάνατο του νεογνού ή μηνιγγίτιδα με σηψαιμία, μέσα σε 48 ώρες από την μόλυνση. Η θνητότητα είναι περίπου 50% όταν πρόκειται για λοίμωξη στη διάρκεια του πρώτου τριμήνου της εγκυμοσύνης και 25% όταν η λοίμωξη λάβει χώρα στη διάρκεια του τρίτου τριμήνου. Η θνητότητα είναι επίσης υψηλή σε ανθρώπους ηλικίας άνω των 60. Ακόμα, έχει αναγνωρισθεί ότι μπορεί να προκαλέσει εμπύρετες γαστρεντερικές διαταραχές.

Επιδημιολογία

Η *Listeria* έχει παγκόσμια κατανομή. Σύμφωνα με τις καταγεγραμμένα κρούσματα, τα βρέφη κάτω του ενός έτους και οι ηλικιωμένοι πάνω από τα 70 χρόνια, είναι αυτοί που βρίσκονται σε μεγαλύτερο κίνδυνο. Περίπου το 15% των λοιμώξεων αφορούν στις έγκυες γυναίκες. Αυτές οι παρατηρήσεις μπορεί να περιέχουν απόκλιση επιβεβαίωσης εξαιτίας της σοβαρότητας της λοίμωξης (υπό-δήλωση). Περίπου 150 περιστατικά Λιστερίωσης αναφέρονται κάθε χρόνο στο Ηνωμένο Βασίλειο, λίγο μεγαλύτερη από την επίπτωση της υπόλοιπης Ευρώπης που είναι 2 περιστατικά ανά εκατομμύριο κατοίκων το χρόνο. Η επίπτωση στο Ηνωμένο Βασίλειο ήταν σχεδόν διπλάσια για την χρονική περίοδο 1987-1999. Στην Ιταλία υπήρξε μία τροφιμογενής έκρηξη κρουσμάτων το 1997 με 1500 κρούσματα. Σε αντίθεση με την χαμηλά δηλούμενη επίπτωση, στο Ηνωμένο Βασίλειο

έχουν περίπου 70 θανάτους ανά χρόνο. Τα περισσότερα κρούσματα παρατηρούνται στα τέλη του καλοκαιριού και στην αρχή του φθινοπώρου, όπου η Λιστερίωση στα ζώα είναι στο μέγιστο βαθμό της.

Μετάδοση- Πηγές- Ξενιστές

Η *L.monocytogenes* εμφανίζει μεγάλη εξάπλωση στο περιβάλλον και μπορεί να βρεθεί στα απόβλητα, στο χώμα, τα επιφανειακά νερά, στα λαχανικά. Ένας μεγάλος αριθμός οικόσιτων και άγριων ζώων φυσικούς ξενιστές της λιστέριας. Είναι εξαιρετικά ανθεκτικό βακτήριο και μπορεί να επιβιώσει σε ξηρασία, κατάψυξη και απόψυξη, παραμένοντας ενεργό στο χώμα και στα σιλό των ζωοτροφών για περισσότερο από 2 χρόνια.

Η κύρια οδός μόλυνσης των ανθρώπων είναι η κατανάλωση μολυσμένου φαγητού. Ο οργανισμός μπορεί να επιβιώσει και να αναπτυχθεί σε θερμοκρασίες αρκετά χαμηλές, όπως 0 °C (με βέλτιστη θερμοκρασία 30-37 °C), είναι σχετικά ανθεκτικό στο αλάτι και τα νιτρικά και δεν αφήνει σημάδια μόλυνσης του τροφίμου, ακόμα και όταν τα επίπεδα μόλυνσης είναι υψηλά. Η *Listeria* είναι ενδημική σε περιβάλλοντα επεξεργασίας των τροφίμων.

Πολλά φαγητά έχουν συσχετισθεί για τη μεταφορά της μόλυνσης. Τα κύρια χαρακτηριστικά τους είναι: υψηλά επεξεργασμένα τρόφιμα, ουδέτερο pH, μεγάλη διάρκεια ζωής, τρόφιμα έτοιμα για κατανάλωση (χωρίς περαιτέρω μαγείρεμα).

Άριστα «οχήματα μεταφοράς» είναι επεξεργασμένα τρόφιμα όπως το πατέ, τα μη παστεριωμένα μαλακά τυριά, το βούτυρο, τα sandwiches, τα cook-chill γεύματα, ψάρια, κρύα κρέατα, σαλάτες και hot-dogs.

Άλλες οδοί μόλυνσης μπορεί να είναι η άμεση επαφή με ζώα που έχουν δερματική μόλυνση (κυρίως επαγγελματική μόλυνση), άμεση επαφή με το περιβάλλον, έκθεση σε προϊόντα του τοκετού κατά την διάρκεια του τοκετού, νοσοκομειακή μετάδοση με διασταυρούμενη μόλυνση (cross infection) ή μέσω των νοσηλευτριών και των χειρουργικών νεφρικών επεμβάσεων.

1.9.6.2 Χημικοί Κίνδυνοι

Οι χημικοί κίνδυνοι μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο κατηγορίες:

1. Φυσικές δηλητηριώδεις χημικές ουσίες, προερχόμενες από φυσικά συστατικά τροφίμων και όχι από περιβαλλοντική, γεωγραφική, βιομηχανική ή άλλη επιμόλυνση. Ως παράδειγμα αναφέρονται οι αφαλατοξίνες και οι μυκοτοξίνες.

2. Δηλητηριώδεις χημικές ουσίες οι οποίες προστίθενται στα τρόφιμα (σκόπιμα ή μη) σε κάποιο στάδιο της παραγωγικής διαδικασίας (καλλιέργεια, συγκομιδή, αποθήκευση, επεξεργασία, συσκευασία, διανομή). Αυτή η κατηγορία περιλαμβάνει ουσίες όπως οι μικροβιοκτόνες, οι εντομοκτόνες, τα λιπάσματα, τα υπολείμματα φαρμάκων και αντιβιοτικών, τα συντηρητικά τροφίμων, καθώς επίσης και οι λιπαντικές ουσίες, τα καθαριστικά και οι βαφές.

1.9.6.3 Φυσικοί Κίνδυνοι

Ως φυσικός κίνδυνος ορίζεται η μη φυσιολογική ύπαρξη οποιουδήποτε φυσικού σώματος στα τρόφιμα, το οποίο μπορεί να προκαλέσει πληγή ή νόσο στον καταναλωτή που θα χρησιμοποιήσει το συγκεκριμένο τρόφιμο. Φυσικοί κίνδυνοι μπορεί να προκληθούν από μία μεγάλη ποικιλία ξένων σωμάτων, όπως *γυαλί, μέταλλο, πλαστικό, λίθοι* κ.τ.λ. πρέπει όμως να επισημανθεί ότι ξένα σώματα τα οποία δεν είναι σε θέση να προκαλέσουν πληγή ή ασθένεια στον καταναλωτή δεν αποτελούν φυσικό κίνδυνο, ακόμα και αν αισθητικά είναι μη αποδεκτά από τον καταναλωτή. Καταστάσεις οι οποίες είναι δυνατόν να οδηγήσουν στην εμφάνιση φυσικών κινδύνων αποτελούν:

1. Ο κακός σχεδιασμός ή η κακή συντήρηση μηχανών ή συσκευών επεξεργασίας (π.χ. κομμάτια μετάλλου μπορούν να εισέλθουν στα τρόφιμα από μηχανήματα τα οποία έχουν φθαρεί ή δεν έχουν συντηρηθεί)
2. Οι ακατάλληλες παραγωγικές διαδικασίες ή η ανεπαρκής εκπαίδευση του προσωπικού (π.χ. απροσεξία ή έλλειψη γνώσης της σωστής τροφοδοσίας της μεταφορικής ταινίας μπουκαλιών μπορεί να προκαλέσει το σπάσιμο αυτών).

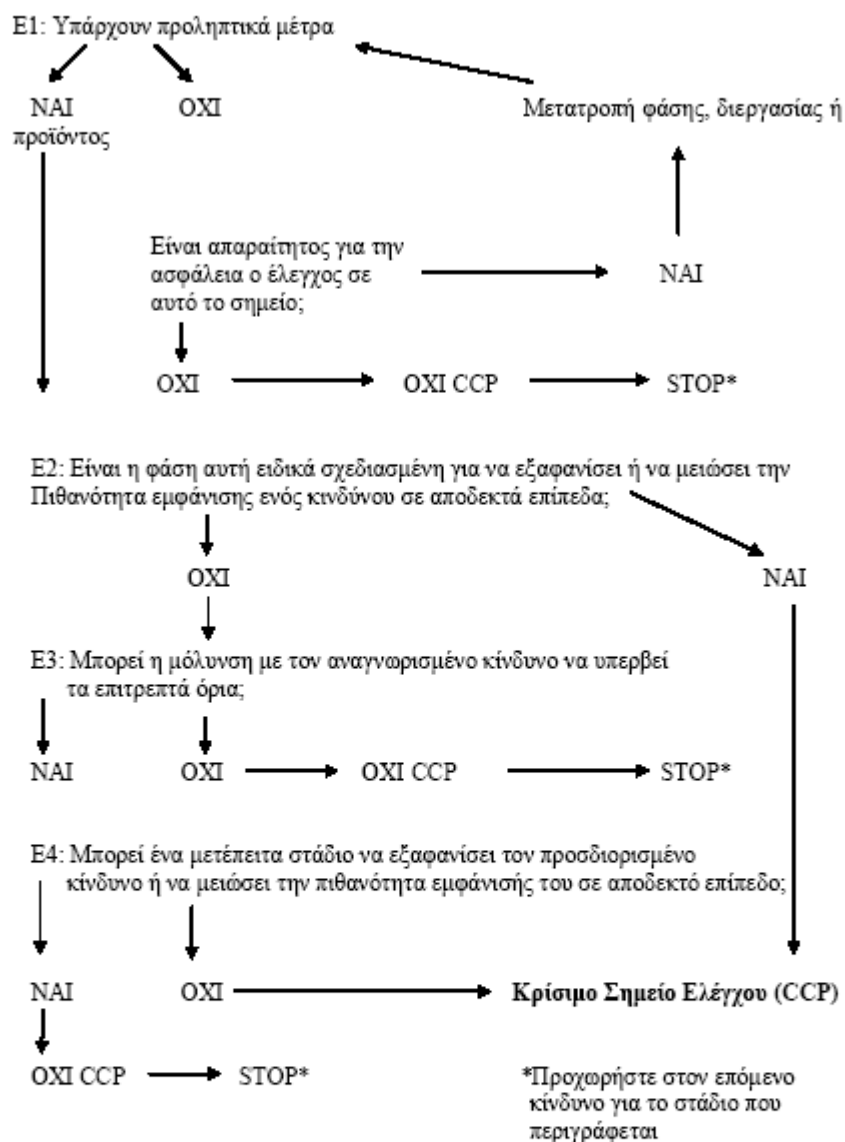
1.9.7 Καθορισμός των CCP's εφαρμόζοντας το διάγραμμα αποφάσεων (Αρχή 2^η)

Σύμφωνα με τη παραπάνω αρχή, εντοπίζονται τα Κρίσιμα Σημεία Ελέγχου (CCP's) στο στάδιο ή στα στάδια, στα οποία ο έλεγχος είναι καθοριστικής σημασίας για τη πρόληψη, την εξαφάνιση ή την μείωση ενός κινδύνου σε επιτρεπτά όρια, ώστε να καταστεί δυνατή η επίτευξη του στόχου της παραγωγής ασφαλών τροφίμων.

Μέχρι την εφαρμογή της προαναφερόμενης αρχής, στην διαδικασία ανάπτυξης του συστήματος H.A.C.C.P., έχουν ήδη ανιχνευθεί οι βιολογικοί, χημικοί, φυσικοί κίνδυνοι στις πρώτες ύλες και στα συστατικά τα οποία χρησιμοποιούνται στα διάφορα παραγωγικά στάδια, ενώ επίσης έχουν προσδιοριστεί και οι προληπτικές ενέργειες για κάθε επιμέρους κίνδυνο. Χρησιμοποιώντας τις παραπάνω πληροφορίες, η επόμενη ενέργεια στο

σχεδιασμό του συστήματος H.A.C.C.P., είναι ο εντοπισμός των σημείων εκείνων στην παραγωγική διαδικασία στα οποία θα εφαρμοστούν οι προληπτικές ενέργειες. (CCP's).

Στην διαδικασία της εκτίμησης, για το ποια σημεία θα αποτελούν κρίσιμα σημεία ελέγχου μπορεί να χρησιμοποιηθεί το διάγραμμα αποφάσεων/ δένδρογραμμα (decision tree) ή κάποιο άλλο εργαλείο εκτίμησης (logical process). Το διάγραμμα αποφάσεων θα βοηθήσει, μέσα από μία σειρά ερωτήσεων στην διαπίστωση αν το εξεταζόμενο σημείο της παραγωγικής διαδικασίας αποτελεί κρίσιμο σημείο (critical point). Παράδειγμα ενός διαγράμματος αποφάσεων (decision tree) παρουσιάζεται στην εικόνα 4 που ακολουθεί (Jones, Food safety, 1992):



Εικόνα 4. Διάγραμμα Αποφάσεων για CCP's (Jones, Food safety, 1992)

1.9.8 Καθορισμός των κρίσιμων ορίων για τα CCP's (Αρχή 3^η – Critical Limits)

Στα πλαίσια της παραπάνω αρχής, καθορίζονται τα κρίσιμα όρια στα σημεία ελέγχου, με τα οποία διαχωρίζεται το αποδεκτό από το μη αποδεκτό, όσον αφορά την πρόληψη, την εξάλειψη ή την μείωση των κινδύνων που έχουν ήδη εντοπιστεί. Ως «κρίσιμο όριο» μπορεί να οριστεί «η μέγιστη ή ελάχιστη τιμή στην οποία ένας βιολογικός, χημικός ή φυσικός κίνδυνος πρέπει να ελεγχθεί σε ένα κρίσιμο σημείο ελέγχου, ώστε να αποφευχθεί, να εξαφανιστεί ή να ελαττωθεί σε ένα επιτρεπτό όριο η εμφάνισή του στο τρόφιμο». Τα κρίσιμα όρια, οφείλουν να είναι επιστημονικά τεκμηριωμένα. Εκφράζονται σαν αριθμοί ή παράμετροι που απορρέουν και βασίζονται σε παρατηρήσεις / μετρήσεις παραγόντων, όπως για παράδειγμα (Pierson, 1992).

- ✓ Θερμοκρασία / Χρόνος
- ✓ Υγρασία
- ✓ Ενεργό νερό aw
- ✓ pH
- ✓ Συγκέντρωση αλάτων
- ✓ Ποσοστό χλωρίου

1.9.9 Εγκατάσταση συστήματος παρακολούθησης των CCP's και των κρίσιμων ορίων τους (Αρχή 4^η)

Στο στάδιο αυτό αναπτύσσεται ένα σύστημα παρακολούθησης των κρίσιμων σημείων ελέγχου (CCP's) και των κρίσιμων ορίων τους. Εφαρμόζεται μια οργανωμένη αλληλουχία από παρατηρήσεις και μετρήσεις, με σκοπό τον έλεγχο των CCP's αν είναι εντός των προβλεπόμενων ορίων, ενώ παράλληλα δημιουργείται και αρχείο καταγραφής για κάθε μελλοντική χρήση.

Η παρακολούθηση και ο έλεγχος των κρίσιμων σημείων ελέγχου (CCP's) είναι ουσιαστικός στο σύστημα H.A.C.C.P., δεδομένου ότι αν ο έλεγχος καταδεικνύει ότι υπάρχει τάση για κάποιο κρίσιμο σημείο ελέγχου (CCP) να ξεφύγει από τα προβλεπόμενα κρίσιμα όρια, τότε μετά την συγκεκριμένη προειδοποίηση, λαμβάνονται όλα τα απαραίτητα μέτρα προκειμένου να προληφθεί η απώλεια ελέγχου και η απόκλιση από ένα κρίσιμο όριο.

Παράλληλα, όταν παρουσιαστεί μία απώλεια ελέγχου λαμβάνονται άμεσα διορθωτικά μέτρα για την αποκατάστασή της. Αξίζει να σημειωθεί πως ο έλεγχος πρέπει να είναι συνεχής, ενώ θα πρέπει να πραγματοποιείται από ειδικά εκπαιδευμένα άτομα του προσωπικού, τα οποία και θα αναλαμβάνουν τη παρακολούθηση και μέτρηση των CCP's, έχοντας πλήρη επίγνωση της σπουδαιότητας της παρακολούθησης και της σωστής

καταγραφής των αποτελεσμάτων ελέγχου που έκαναν. Όλα τα σχετικά αρχεία αποτελεσμάτων, θα πρέπει να φέρουν την ημερομηνία διεξαγωγής του ελέγχου και να υπογράφονται από τον υπεύθυνο /-ους διεξαγωγής του (Stevenson, 1995).

1.9.10 Καθορισμός των διορθωτικών ενεργειών για τις αποκλίσεις από τα κρίσιμα όρια (Αρχή 5^η)

Το επόμενο βήμα είναι η καθιέρωση διορθωτικών ενεργειών σε περίπτωση που η παρακολούθηση υποδείξει ότι ένα κρίσιμο σημείο ελέγχου (CCP) βρίσκεται εκτός ελέγχου και αποκλίνει από τα προβλεπόμενα κρίσιμα όρια. Όπως καθορίζονται τα κρίσιμα όρια για κάθε κρίσιμο σημείο ελέγχου (CCP) έτσι καθορίζονται και οι διορθωτικές ενέργειες σε περίπτωση απόκλισης.

Επειδή το σύστημα H.A.C.C.P., είναι ένα σύστημα που βασίζεται κυρίως στην πρόληψη προβλημάτων πριν αυτά επιδράσουν βλαβερά στα τρόφιμα και κατά συνέπεια επιφέρουν αρνητικές επιπτώσεις στην υγεία των καταναλωτών, οφείλει να αναπτύσσει κατάλληλους σχεδιασμούς στην περίπτωση που κάποιο κρίσιμο σημείο ελέγχου (CCP) ξεφύγει από τα κρίσιμα όρια (δηλαδή τις απαραίτητες διορθωτικές ενέργειες που πρέπει να γίνουν ώστε το CCP να επανέλθει εντός ορίων).

Οι διορθωτικές ενέργειες θα πρέπει να περιλαμβάνουν τον καθορισμό και κατ'επέκταση την διόρθωση της αιτίας της μη συμμόρφωσης, ενώ σε κάθε περίπτωση θα πρέπει να καταγράφονται και οι τυχόν αποκλίσεις και όλες οι λαμβανόμενες διορθωτικές ενέργειες (Stevenson, 1995).

1.9.11 Εγκατάσταση συστήματος αρχειοθέτησης και καταγραφής του σχεδίου H.A.C.C.P. (Αρχή 6^η)

Αποτελεσματική και ακριβής αρχειοθέτηση έχει ιδιαίτερη σημασία στην εφαρμογή του συστήματος H.A.C.C.P.. Η τήρηση των αρχείων αποδεικνύει την λειτουργία του συστήματος, βοηθάει στην ιχνηλασιμότητα των προϊόντων και των συστατικών που χρησιμοποιήθηκαν (σε περίπτωση προβλήματος), βοηθάει σε περίπτωση ανάκλησης των προϊόντων, συντελεί στην διάγνωση προβλημάτων στην παραγωγική διαδικασία και παρέχει την απαραίτητη υποστήριξη σε περίπτωση νομικών προβλημάτων.

Παράδειγμα αρχείων:

- ✓ Περιγραφή παραγωγικής διαδικασίας
- ✓ Περιγραφή προϊόντων, λίστα συστατικών
- ✓ Διαγράμματα ροής προϊόντων

- ✓ Ανάλυση επικινδυνότητας
- ✓ Καθορισμός CCP's
- ✓ H.A.C.C.P. plan

1.9.12 Καθορισμός των διαδικασιών επαλήθευσης του συστήματος H.A.C.C.P.

(Αρχή 7^η)

Μετά την ολοκλήρωση του συστήματος H.A.C.C.P. και την εφαρμογή του στην επιχείρηση, καθιερώνονται διαδικασίες επαλήθευσης του συστήματος H.A.C.C.P..

Το σύστημα H.A.C.C.P. επαληθεύεται για τη σωστή λειτουργία του και διερευνάται η τυχόν ανάγκη επανασχεδιασμού σε κάποιο σημείο του συστήματος (Τζιά Κ. Τ., 1996) (FAO/WHO, 1997).

Παραδείγματα επαλήθευσης:

- ✓ Αναλυτικός έλεγχος των διαδικασιών παρακολούθησης.
- ✓ Βαθμονόμηση θερμομέτρων που χρησιμοποιούνται για μέτρηση των ορίων CCP's/
- ✓ Δειγματοληπτικός έλεγχος για μικροβιολογικές αναλύσεις πρώτων υλών, ενδιάμεσων ή τελικών προϊόντων.
- ✓ Επανασχεδιασμός των διορθωτικών ενεργειών σε περίπτωση απόκλισης.

1.10 Προαπαιτούμενα εφαρμογής H.A.C.C.P.

Η παραγωγή ασφαλών και ποιοτικών τροφίμων μέσω της εφαρμογής του συστήματος H.A.C.C.P. στις επιχειρήσεις μαζικής εστίασης, προϋποθέτει την «δόμηση» του συστήματος πάνω σε ένα στέρεο έδαφος προαπαιτούμενων συνθηκών και προγραμμάτων (FAO/WHO, 1997). Τα προαπαιτούμενα προγράμματα παρέχουν και εξασφαλίζουν τους βασικούς περιβαλλοντικούς και λειτουργικούς όρους που είναι απαραίτητοι για τη παραγωγή ασφαλών, θρεπτικών τροφίμων. Οι επιχειρήσεις μαζικής εστίασης που πρόκειται να εμπλακούν στην ανάπτυξη και εφαρμογή συστημάτων H.A.C.C.P., πρέπει να αναπτύξουν και να τεκμηριώσουν προγράμματα τουλάχιστον για :

- α)Κτιριακές εγκαταστάσεις
- β)Μεταφορά και αποθήκευση
- γ)Εξοπλισμό
- δ)Προσωπικό
- ε)Εξυγίανση και έλεγχο βλαβερών εντόμων και ζώων
- στ)Ανάκληση προϊόντων
- ζ)Αρχεία καταγραφής

Αναλυτικότερα:

α) Κτιριακές εγκαταστάσεις

Ιδιαίτερος σημαντικό για τις μονάδες μαζικής εστίασης που πρόκειται να εφαρμόσουν Η.Α.Σ.Σ.Ρ., συνιστά το γεγονός να βρίσκεται σε ένα υγιές περιβάλλον, χωρίς την ύπαρξη γειτονικών πηγών περιβαλλοντικής μόλυνσης. Παράλληλα, θα πρέπει να διαπιστωθεί εάν οι υπάρχουσες εγκαταστάσεις επαρκούν για την παραγωγή μέγιστου όγκου προϊόντος, εάν τα παράθυρα είναι σφραγισμένα ή κλεισμένα με προστατευτικές σίτες. Σημαντικό επίσης είναι να υπάρχει απομόνωση μεταξύ των παραγωγικών δραστηριοτήτων ώστε να αποφεύγονται επιμολύνσεις, ενώ όπου είναι απαραίτητο, να υπάρχουν γραπτά προγράμματα δράσης και διαγράμματα παραγωγικής διαδικασίας.

β) Μεταφορά και αποθήκευση

Η εταιρία θα πρέπει να αναπτύξει πρόγραμμα ελέγχου των μεταφορικών της μέσων, π.χ. έλεγχος καθαριότητας, έλεγχος υγιεινής, έλεγχος των οργάνων θερμοκρασίας. Η παραλαβή των απαιτούμενων πρώτων υλών (τρόφιμα, μη τρόφιμα, υλικά συσκευασίας) θα πρέπει να πραγματοποιείται σε συγκεκριμένο χώρο ξεχωριστά από τον χώρο παραγωγής, ενώ τα συστατικά τα οποία απαιτούν ψύξη, πρέπει να αποθηκεύονται στους 4° C ή και λιγότερο και να ελέγχονται επαρκώς. Επιπλέον, όλες οι παραλαμβανόμενες χημικές ουσίες πρέπει να αποθηκεύονται σε ξηρό και καλά αεριζόμενο χώρο. Τέλος, σημαντικό είναι τα έτοιμα προϊόντα να αποθηκεύονται και να υπόκεινται σε χειρισμούς, υπό συνθήκες που δεν επιτρέπουν την υποβάθμισή τους (επιμόλυνση, θερμοκρασία, υγρασία).

γ) Εξοπλισμός

Ο εξοπλισμός της κάθε μονάδας είναι απαραίτητο να έχει σχεδιαστεί, κατασκευαστεί και εγκατασταθεί με τέτοιο τρόπο ώστε να είναι εύκολος ο καθαρισμός, η εξυγίανση, η συντήρηση και ο έλεγχός του. Επιφάνειες του εξοπλισμού ή άλλα υλικά που έρχονται σε επαφή με τα τρόφιμα (π.χ. μαχαιροπίρουνα) θα πρέπει να είναι λεία, μη διαβρωτικά, μη απορροφητικά, μη τοξικά, χωρίς ανωμαλίες στην επιφάνειά τους, χωρίς ραγίσματα και να μπορούν να αντέξουν επαναλαμβανόμενους καθαρισμούς και εξυγιάνσεις. Τέλος, το πρόγραμμα συντήρησης και επίβλεψης του εξοπλισμού θα πρέπει να τηρείται με συνέπεια και επίγνωση της σπουδαιότητάς του.

δ) Προσωπικό

Οι επιχειρήσεις μαζικής εστίασης οφείλουν να προνοούν για τη συνεχή επιμόρφωση του προσωπικού τους, με την ανάπτυξη γραπτών προγραμμάτων εκπαίδευσης και αξιολόγησης του προσωπικού τους. Η εκπαίδευση στοχεύει στη διαμόρφωση εργαζομένων με ικανοποιητική γνώση, κατάρτιση, δεξιότητα και ικανότητα να συμβάλλουν θετικά στη διαχείριση της υγείας και της ασφάλειας. Συντελεί επίσης και στη μεταβολή της αντίληψης και της συμπεριφοράς των εμπλεκόμενων σε αυτήν. Η εκπαίδευση αυτή μπορεί να πραγματοποιηθεί, είτε πριν από την πρόσληψη των εργαζομένων (σε κάποια προηγούμενη εργασία ή ειδική σχολή), είτε αμέσως μετά την πρόσληψή τους ή με εκπαιδευτικά προγράμματα κατά την διάρκεια της απασχόλησής τους (συνεχιζόμενη κατάρτιση).

Τέλος, οι επιχειρήσεις οφείλουν να αναπτύξουν μια συγκεκριμένη πολιτική για τον έλεγχο μεταδοτικών νοσημάτων. Προσωπικό το οποίο νοσεί ή είναι φορέας μολυσματικής ασθένειας δεν εργάζεται στο χώρο παραγωγής και επεξεργασίας τροφίμων. Σε κάθε περίπτωση, η κατάλληλη και συνεχής εκπαίδευση του προσωπικού, συντελεί στην λειτουργία και στην ύπαρξη ενός ζωντανού συστήματος διαχείρισης ασφάλειας τροφίμων.

ε) Εξυγίανση και έλεγχος επιβλαβών εντόμων και ζώων

Τα τμήματα παραγωγής των τροφίμων σε μια επιχείρηση μαζικής εστίασης, πρέπει να αναπτύσσουν πρόγραμμα καθαρισμού και εξυγίανσης για όλο τον εξοπλισμό τους, που να περιλαμβάνει: το όνομα του υπεύθυνου για τον καθαρισμό, την συχνότητα που γίνεται η εργασία, τα χημικά και η συγκέντρωση που χρησιμοποιείται στην διαδικασία καθαρισμού και απολύμανσης, καθώς και την ακολουθούμενη μεθοδολογία καθαρισμού και εξυγίανσης.

Επίσης, πρέπει ακόμα να έχει προβλεφθεί και ένα πρόγραμμα ελέγχου των επιβλαβών εντόμων και ζώων, που να περιλαμβάνει το όνομα του υπεύθυνου διεξαγωγής του συγκεκριμένου προγράμματος, το όνομα του φορέα που έχει αναλάβει το πρόγραμμα, όλες τις χημικές ουσίες που θα χρησιμοποιηθούν καθώς και τις κατάλληλες συγκεντρώσεις τους, τις τοποθεσίες στο χώρο που θα εφαρμοστούν, την μέθοδο που θα ακολουθήσουν και τη συχνότητα χρήσης, μία κάτοψη του χώρου των εγκαταστάσεων με όλες τις παγίδες, το είδος και την συχνότητα ελέγχου για την διαπίστωση της αποτελεσματικότητας του προγράμματος.

ζ) Αρχεία καταγραφής

Τα αρχεία καταγραφής κάθε μονάδας θα πρέπει να είναι ευανάγνωστα και να παρέχουν την σωστή πληροφόρηση για κάθε γεγονός, συνθήκη ή διεργασία. Επίσης, πρέπει να υφίσταται και η δυνατότητα εντοπισμού αλλαγών ή λαθών στα αρχεία. Κάθε αλλαγή ή εισαγωγή στα αρχεία πραγματοποιείται από υπεύθυνα και εξουσιοδοτημένα άτομα. Κρίσιμα αρχεία θα πρέπει να ελέγχονται από εξειδικευμένο προσωπικό, ενώ τα αρχεία πρέπει να φυλάσσονται στον χώρο της εκάστοτε εταιρίας και να είναι πάντα διαθέσιμα για τον έλεγχο από τις αρμόδιες αρχές ελέγχου.

1.11 Εφαρμογή του H.A.C.C.P. σε χώρους μαζικής εστίασης- Δυσκολίες εφαρμογής του H.A.C.C.P.

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 θεωρείται ότι είναι υψηλής επικινδυνότητας, ειδικά αυτοί που προσφέρουν τρόφιμα τα οποία συνδέονται συχνότερα με επιδημίες τροφικών δηλητηριάσεων. Αυτό είναι αναμενόμενο, καθώς στην περίπτωση που κάποιο τρόφιμο που προσφέρεται σε αυτές τις επιχειρήσεις είναι μολυσμένο, υπάρχει αυξημένος κίνδυνος εξάπλωσης της τροφικής δηλητηρίασης, εφόσον θα το καταναλώσουν περισσότερα άτομα. Επίσης, κάποιες από τις επιχειρήσεις αυτές παρέχουν γεύματα σε ευαίσθητες ομάδες του πληθυσμού, όπως οι ηλικιωμένοι, παιδιά, ασθενείς, γεγονός το οποίο απαιτεί την αδιαμφισβήτητη ασφάλεια των προσφερόμενων τροφίμων (Guzewich, 1986).

Παρόλα αυτά, μέχρι στιγμής το H.A.C.C.P. έχει εφαρμοστεί κυρίως στη βιομηχανία παραγωγής τροφίμων (food manufacture industry) και από πολλούς θεωρείται ότι είναι ένα σύστημα που μπορεί να εφαρμοστεί μόνο στις μεγάλης κλίμακας βιομηχανίες και όχι στις μικρές επιχειρήσεις τροφίμων και τους χώρους μαζικής εστίασης. Για παράδειγμα θεωρείται ότι δεν μπορεί να εφαρμοστεί στις επιχειρήσεις τροφοδοσίας (catering), όπου σε μία μόνο λειτουργία μπορεί 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).

Ακόμα μία δυσκολία που αντιμετωπίζεται κατά την εφαρμογή του συστήματος H.A.C.C.P. στους χώρους μαζικής εστίασης, είναι η έλλειψη επαρκούς ειδίκευσης και προσωπικού για να συγκεντρωθούν οι απαραίτητες επιστημονικές πληροφορίες που σχετίζονται με την ποικιλία των προϊόντων ή των γευμάτων που παράγονται και για να εξασφαλιστεί η επιτυχής συνέχιση των διεργασιών που θα πραγματοποιούνται. Ιδιαίτερα σημαντικό είναι να βρεθούν οι οικονομικοί πόροι που θα υποστηρίξουν την ανάπτυξη του συστήματος και την απαραίτητη εκπαίδευση. Αυτά τα προβλήματα εμφανίζονται ακόμα μεγαλύτερα στις μικρές από ότι στις μεγάλες επιχειρήσεις τροφοδοσίας (Thrope, 1989).

Επιπλέον, οι επιχειρήσεις αυτές αντιμετωπίζουν και τα προβλήματα που έχουν όλες οι μικρές και μεσαίες επιχειρήσεις. Έτσι θα πρέπει να αντιμετωπίσουν το πρόβλημα του περιορισμένου χρόνου και να εισάγουν τις ενέργειες που αφορούν το H.A.C.C.P. στο ήδη φορτωμένο πρόγραμμά τους. Σημαντικό είναι επίσης ότι αυτές οι επιχειρήσεις έχουν μικρότερη οικονομική δύναμη, γεγονός που έχει δύο επιπτώσεις. Αφενός κάνει το κόστος της εφαρμογής του συστήματος H.A.C.C.P. να φαίνεται ακόμα μεγαλύτερο λόγω του μικρότερου κέρδους και αφετέρου δεν μπορούν να ασκήσουν αρκετή πίεση στους προμηθευτές, να εφαρμόσουν και εκείνοι το σύστημα H.A.C.C.P. (Kirby, 1994).

Όμως το H.A.C.C.P. δημιουργήθηκε για να εφαρμοστεί σε όλη την αλυσίδα τροφίμων, από την καλλιέργεια μέχρι την τελική κατανάλωση και επομένως μέσα από τη σωστή οργάνωση μπορεί να υιοθετηθεί και από τη βιομηχανία παροχής τροφίμων (FAO/WHO, 1997).

Ένα ιδιαίτερα σημαντικό μέρος του προβλήματος της εφαρμογής του συστήματος είναι ο μεγάλος αριθμός των προϊόντων που παράγονται και που προέρχονται από ένα εξίσου μεγάλο αριθμό πρώτων υλών. Ο προσδιορισμός των κινδύνων που μπορεί να περιέχονται σε κάθε ένα από αυτά φαντάζει αδύνατος, όμως η αρχική κατηγοριοποίηση μπορεί να δώσει μία γενική άποψη για την επικινδυνότητα των τροφίμων και να στρέψει την προσπάθεια σε αυτά που αποτελούν μεγαλύτερη απειλή για τη Δημόσια Υγεία (Τζιά Κ. Τ., 1996).

Για να αντιμετωπιστούν οι δυσκολίες που αφορούν το προσωπικό, θα πρέπει να υπάρχει κατάλληλη εκπαίδευση. Είναι ένα νευραλγικό σημείο στην εφαρμογή του συστήματος, καθώς η βιομηχανία παροχής τροφίμων βασίζεται περισσότερο στο ανθρώπινο δυναμικό και λιγότερο στην αυτοματοποίηση. Είναι πολύ σημαντικό να γίνει κατανοητή η σημασία της ασφάλειας των τροφίμων και ότι αυτό επιτυγχάνεται μέσω του H.A.C.C.P., διότι για

να γίνει ο καθορισμός των μεθόδων παρακολούθησης είναι απαραίτητο να υπάρξει συνεργασία με τους χρήστες των διεργασιών (Guzewich, 1986) (Ehiri, 1995).

Όσον αφορά τον περιορισμένο χρόνο, θα πρέπει να γίνει από την αρχή της μελέτης σωστός προγραμματισμός για την όσο το δυνατόν αποδοτικότερη χρησιμοποίηση του διαθέσιμου χρόνου και τις συναντήσεις της ομάδας H.A.C.C.P.. Παράλληλα μπορεί να γίνει εφαρμογή του συστήματος κατά στάδια και να εξετάζεται κάθε ένα με τη σειρά του, αφού έχει εφαρμοστεί επιτυχώς το προηγούμενο. Είναι σημαντικό σε κάθε περίπτωση να γίνει κατανοητό ότι όλη η επιχείρηση πρέπει να ενημερωθεί για την ποιότητα και την ασφάλεια των τροφίμων. Η επιτυχής εφαρμογή του συστήματος βασίζεται στη συνεργασία και την καλή θέληση όλων των εργαζομένων της επιχείρησης (Ehiri, 1995) (Kirby, 1994).

Το πρόβλημα των περιορισμένων οικονομικών πόρων μπορεί να ξεπεραστεί, αφού στην περίπτωση των χώρων μαζικής εστίασης δεν απαιτούνται δραματικές αλλαγές στον εξοπλισμό στα πρώτα στάδια της εφαρμογής. Εξάλλου η εμπειρία έχει δείξει ότι το αρχικό κόστος για την εφαρμογή του H.A.C.C.P. ανακτάται γρήγορα από τη βελτίωση στην παραγωγικότητα, την ποιότητα και τα λιγότερα παράπονα από τους πελάτες. Αυτό το τελευταίο παίζει σημαντικό ρόλο στη βιομηχανία παροχής τροφίμων (Guzewich, 1986) (Kirby, 1994).

Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO) έχει προσδιορίσει τις διαδικασίες για την εφαρμογή του H.A.C.C.P. σε επιχειρήσεις παροχής τροφίμων (food service establishments), σε επιχειρήσεις πώλησης τροφίμων στο δρόμο (street food vending operations) και κουζίνες κατ'οίκον (home kitchens). Οι διαδικασίες αυτές έχουν εφαρμοστεί πειραματικά σε ένα μεγάλο αριθμό χώρων. Επίσης, πολλές χώρες έχουν αυξήσει την προσπάθεια τους για την εφαρμογή του H.A.C.C.P. και στις μικρές επιχειρήσεις, όπως π.χ. η Αγγλία, η οποία έχει αναπτύξει ειδικές οδηγίες για να διασφαλίσει την ασφάλεια των τροφίμων στις βιομηχανίες τροφοδοσίας, που είναι βασισμένες στις αρχές του H.A.C.C.P.. Γενικά το σύστημα H.A.C.C.P. αποτελεί την παγκοσμίως κοινή προσέγγιση στην ασφάλεια των τροφίμων (Motarjemi F, 1996) (Ehiri, 1995).

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.12 Σκοποί και στόχοι της έρευνας

Ο σκοπός της παρούσας έρευνας είναι ο μικροβιολογικός και ποιοτικός έλεγχος επιχειρήσεων μαζικής εστίασης και η σύγκριση αυτών σε σχέση με την εφαρμογή του Συστήματος Προληπτικής Υγιεινής HACCP.

Οι επιμέρους στόχοι της έρευνας είναι οι εξής:

- Ο έλεγχος της αποτελεσματικής εφαρμογής των Ορθών Πρακτικών Παραγωγής (GMP's, Good Manufacturing Practices) σε επιχειρήσεις μαζικής εστίασης (Fast Food, Ξενοδοχεία, εταιρίες Catering) που εφαρμόζουν Συστήματα Προληπτικής Υγιεινής HACCP.
- Η σύγκριση της εικόνας επιχειρήσεων μαζικής εστίασης που εφαρμόζουν το Σύστημα Προληπτικής Υγιεινής HACCP σε σχέση με επιχειρήσεις που δεν εφαρμόζουν στις παραγωγικές τους διαδικασίες το σύστημα HACCP
- Η εκτίμηση των παραγόντων και των διαδικασιών που συμβάλλουν στις αυξημένες πιθανότητες εμφάνισης κινδύνου μικροβιολογικής ασφάλειας σε συστήματα μαζικής εστίασης
- Η πρόταση εφαρμογής μέτρων και πρακτικών που θα συμβάλλουν στην βελτίωση της υγειονομικής ασφάλειας, στις διαδικασίες και τα παραγόμενα προϊόντα σε συστήματα μαζικής εστίασης.

2. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

2.1 Εργαστηριακές μέθοδοι

Ολική μεσόφιλη χλωρίδα

Η αρίθμηση των βακτηρίων που περιέχονται σ' ένα δείγμα τροφίμου γίνεται -στην καθημερινή πράξη- με τη χρήση στερεών κυρίως υποστρωμάτων, στα οποία γίνεται παραδεκτό, ότι τα ζωντανά βακτήρια μπορούν να αναπτυχθούν και κάθε μικροβιακό κύτταρο να δώσει μια ορατή αποικία.

Όμως αυτό είναι μερικώς μόνο αληθές, γιατί ούτε όλα τα βακτήρια που υπάρχουν σ' ένα δείγμα τροφίμου μπορούν ν' αναπτυχθούν με τη χρήση μιας ορισμένης τεχνικής ούτε οι αποικίες που θα αναπτυχθούν είναι βέβαιο ότι προέρχονται από ένα μόνο μικροβιακό κύτταρο.

Για τους λόγους αυτούς η εκτίμηση της μικροβιολογικής ποιότητας ενός τροφίμου βασίζεται στον προσδιορισμό του πληθυσμού διαφόρων ομάδων βακτηρίων (π.χ. αερόβια μεσόφιλα, ψυχότροφα, κολοβακτηριοειδή κλπ.), για κάθε μια από τις οποίες μπορεί να χρησιμοποιηθεί, με ικανοποιητικά αποτελέσματα, ορισμένη τεχνική.

Ο πληθυσμός των αερόβιων μεσόφιλων βακτηρίων, τα οποία με τη χρήση ορισμένου υποστρώματος και σε ορισμένη θερμοκρασία και χρόνο επώασης, μπορούν ν' αναπτυχθούν και να δώσουν από μία ορατή αποικία, χαρακτηρίζεται ως “**Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (OMX)**” ή “**Συνολικός Αριθμός Μεσόφιλων (ΣΑΜ)**”.

Βασική μέθοδος προσδιορισμού του πληθυσμού των ζώντων μεσόφιλων αερόβιων βακτηρίων αποτελεί η “**Πρότυπη μέθοδος αριθμήσεως σε τρυβλία**” (**Standard Plate Count**) ή αλλιώς “**μέθοδος ενσωματώσεως**“. Εκτός όμως από τη μέθοδο αυτή, έχουν προταθεί και άλλες μέθοδοι για την αρίθμηση της OMX, οι οποίες έχουν σχεδιαστεί για να εξυπηρετούν ειδικούς σκοπούς (π.χ. είδος τροφίμου, ταχύτητα, οικονομία υλικών κλπ.).

Στο κεφάλαιο αυτό θα αναπτυχθεί κυρίως η πρότυπη μέθοδος αριθμήσεως σε τρυβλία και δευτερευόντως ορισμένες από τις μεθόδους που έχουν προταθεί μέχρι σήμερα, οι οποίες είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν σε ειδικές περιπτώσεις.

2.1.1 Πρότυπη μέθοδος αριθμήσεως σε τρυβλία (STANDARD PLATE COUNT)

Είναι η περισσότερο ακριβής μέθοδος. Έχει τυποποιηθεί από άποψη υλικών και τεχνικής από την American Public Health Association (APHA) και αποτελεί την επίσημη (νομοθετημένη) μέθοδο προσδιορισμού της OMX των τροφίμων και του νερού σε πολλές χώρες.

Απαιτούμενα Υλικά

1. Αραιωτικό υγρό. Ανάλογα με το είδος του τροφίμου είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί ένα από τα αραιωτικά A-5, A-15 και A-17. Για το κρέας και τα κρεατοσκευάσματα συνιστάται το αραιωτικό A-15 (πεπτονούχο νερό 0,1%) γιατί αποδείχθηκε ότι προσφέρει περισσότερη προστασία στα βακτήρια (Straka, 1957), (Jayne-Williams, 1963).
2. Υπόστρωμα αριθμήσεως Plate Count Agar (B-80)
3. Τρυβλία Petri, γυάλινα ή πλαστικά μιας χρήσεως, διαμέτρου 85mm(ή μεγαλύτερης) και βάθους 12mm.
4. Σιφόνια, γυάλινα ή πλαστικά μιας χρήσεως, βαθμολογημένα για μικροβιολογική χρήση και χωρητικότητας από 0,1ml έως 11ml
5. Φιάλες αραιώσεως με βιδωτό πώμα, βαθμολογημένες για όγκο 99ml ή φιαλίδια, με βιδωτό πώμα, των 20-30ml.
6. Ηλεκτρικός ομοιογενοποιητής (Waring Blendor ή τύπου Stomacher).
7. Μετρητής αποικιών.
8. Ζυγός με ευαισθησία 0,1g.

Τεχνική

Προετοιμασία του δείγματος

Ανάλογα με το είδος του τροφίμου που πρόκειται να εξεταστεί γίνεται και η προετοιμασία του.

1. Στερεά τρόφιμα : Παίρνονται από διάφορα σημεία του δείγματος, με άσηπτο τρόπο, τεμάχια συνολικού βάρους 50-100g και μεταφέρονται σε στείρα ευρύστομη φιάλη ή στείρο ποτήρι ζέσεως, όπου με τη βοήθεια στείρου ψαλιδιού, λεπτοτεμαχίζονται. Από το αντιπροσωπευτικό αυτό δείγμα ζυγίζεται η ποσότητα που θα ομογενοποιηθεί.

2. Κατεψυγμένα τρόφιμα: Τα κατεψυγμένα τρόφιμα αποψύχονται σε θερμοκρασία 0-4 °C και στη συνέχεια προετοιμάζονται όπως στην παρ.1. Τα δείγματα δεν πρέπει να παραμένουν στη θερμοκρασία των 0-4 °C για περισσότερο από 18 ώρες (FDA, 1976). Από την ΑΡΗΑ (ΑΡΗΑ, 1976) προτείνεται ως εναλλακτική λύση η μη απόψυξη του δείγματος, αλλά η λήψη υλικού από διάφορα σημεία του με τη βοήθεια στείρου ηλεκτρονικού τρυπανιού. Τα τεμάχια που αποσπώνται συλλέγονται σε ειδικά διαμορφωμένο χωνί, όπως δείχνει η εικόνα 5. Συλλέγονται έτσι τεμάχια βάρους 50-100g και μεταφέρονται σε στείρο ποτήρι ζέσεως, όπου υποβάλλονται σε λεπτό τεμαχισμό. Από το τεμαχισμένο αυτό δείγμα ζυγίζεται η ποσότητα που θα ομογενοποιηθεί με το αραιωτικό υγρό.

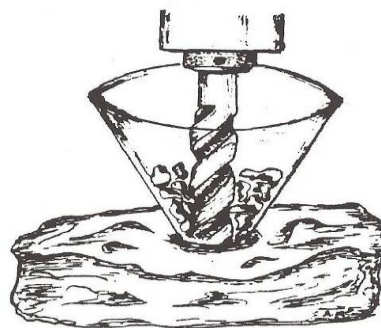
3.Ρευστά ή ημίρρευστα δείγματα: Το δείγμα αναμιγνύεται καλά μέσα στον περιέκτη του, με 20-25 αναστροφικές κινήσεις του περιέκτη. Εάν το δείγμα είναι γάλα ή άλλο

τρόφιμο της ίδιας ρευστότητας, η ανακίνηση κατά την (ΑΡΗΑ, 1976), πρέπει να είναι γρήγορη (25 αναστροφές σε χρόνο 7sec). Από το δείγμα αυτό και μέσα σε 3min από τη στιγμή της ανακινήσεως παίρνεται η ποσότητα που θα ομογενοποιηθεί με το αραιωτικό υγρό (Hartman, 1961).

Ομοιογενοποίηση του δείγματος

1. Για τα στερεά τρόφιμα, από το δείγμα που προετοιμάστηκε όπως στο 2.1.1 ζυγίζονται απευθείας στη φιάλη ομοιογενοποίησης 10g ή 11g ή 50g και ομοιογενοποιούνται με 90ml ή 99ml ή 450ml αραιωτικού υγρού αντιστοίχως. Η ομοιογενοποίηση γίνεται είτε σε ηλεκτρικό ομοιογενοποιητή, επί 2min σε ταχύτητα 8.000rpm είτε με τεχνική Stomacher (Sharpe A. J., 1972). Εάν το δείγμα χρειάζεται περισσότερο χρόνο για να ομοιογενοποιηθεί, τότε γίνονται ενδιάμεσες διακοπές στη λειτουργία του οργάνου για να μην υπερθερμανθεί το δείγμα.

2. Για τα ρευστά τρόφιμα, αφού προετοιμαστεί το δείγμα όπως στο 2.1.1, παίρνονται με στείρο σιφόνιο, 1ml ή 10ml ή 11ml και μεταφέρονται σε φιάλη αραιώσεως που περιέχει 9ml ή 90ml ή 99ml αραιωτικού υγρού αντιστοίχως. Ακολουθεί ομοιογενοποίηση με έντονη ανακίνηση της φιάλης με το χέρι σε τόξο 30-35cm επί 1min (ΑΡΗΑ, 1976).



Εικόνα 5. Λήψη δείγματος από κατεψυγμένο τρόφιμο με στείρο ηλεκτρικό τρυπάνι

3. Η ομοιογενοποίηση του δείγματος με το αραιωτικό γίνεται με τέτοιες αναλογίες ώστε συνήθως να προκύπτει αραιώση του δείγματος 1:10. Αυτό όμως δεν είναι υποχρεωτικό. Η αναλογία δείγματος και αραιωτικού για την πρώτη αραιώση, μπορεί να είναι διαφορετική, οπότε ανάλογα υπολογίζονται και οι επόμενες δεκαδικές αραιώσεις.

Παρασκευή διαδοχικών αραιώσεων

1. Μετά την ομογενοποίηση του δείγματος και την παρασκευή της αραιώσεως 1:10 γίνονται οι υπόλοιπες δεκαδικές αραιώσεις (1:100 , 1:1000 κλπ) με μεταφορά 1 ml ή 10ml ή 11ml σε 9ml ή 90ml ή 99ml αραιωτικού. Το σχήμα που θα ακολουθηθεί εξαρτάται από τον εξοπλισμό του εργαστηρίου. Γεγονός είναι ότι ο μεγαλύτερος όγκος του μεταφερόμενου υγρού αυξάνει την ακρίβεια της μεθόδου.

2. Η μεταφορά από τη μια φιάλη στην επόμενη γίνεται με το κατάλληλο ογκομετρικό σιφώνιο, το οποίο δεν πρέπει να έρθει σε επαφή με το αραιωτικό υγρό της φιάλης στην οποία μεταφέρεται το υλικό του, ούτε να αδειάζεται η τελευταία σταγόνα με το φύσημα του σιφωνίου.

3. Κάθε φιάλη, αμέσως μετά τη μεταφορά του δείγματος από την προηγούμενη, ανακινείται ισχυρά όπως στο 2.1.1 (βλέπε ομογενοποίηση του δείγματος). Εάν πρόκειται για φιαλίδια ή δοκιμαστικούς σωλήνες συνιστάται η χρήση κυκλομίκτη.

4. Όλες οι αραιώσεις πρέπει να παρασκευαστούν μέσα σε χρόνο 15min από τη στιγμή της ομογενοποίησης του δείγματος (FDA, 1976).

Ενοφθαλμισμός

1. Ο ενοφθαλμισμός γίνεται με την τεχνική της ενσωματώσεως σε τρυβλία.

2. Από τις δεκαδικές αραιώσεις που παρασκευάστηκαν (όπως στο παρασκευή διαδοχικών αραιώσεων), μεταφέρεται από κάθε αραιώση ποσότητα 1ml ή 0,1ml και αποθέτεται στο κέντρο του πυθμένα απλής ή διπλής σειράς τρυβλίων.

3. Σε κάθε τρυβλίο προσθέτονται 15 ml ρευστού υποστρώματος Plate Count Agar, το οποίο θερμοστατήθηκε σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 45-46°C. Η θερμοκρασία του υποστρώματος πρέπει να ελέγχεται με θερμόμετρο που έχει τοποθετηθεί σε φιάλη ή σωλήνα με νερό που θερμάνθηκε όπως και το υπόστρωμα.

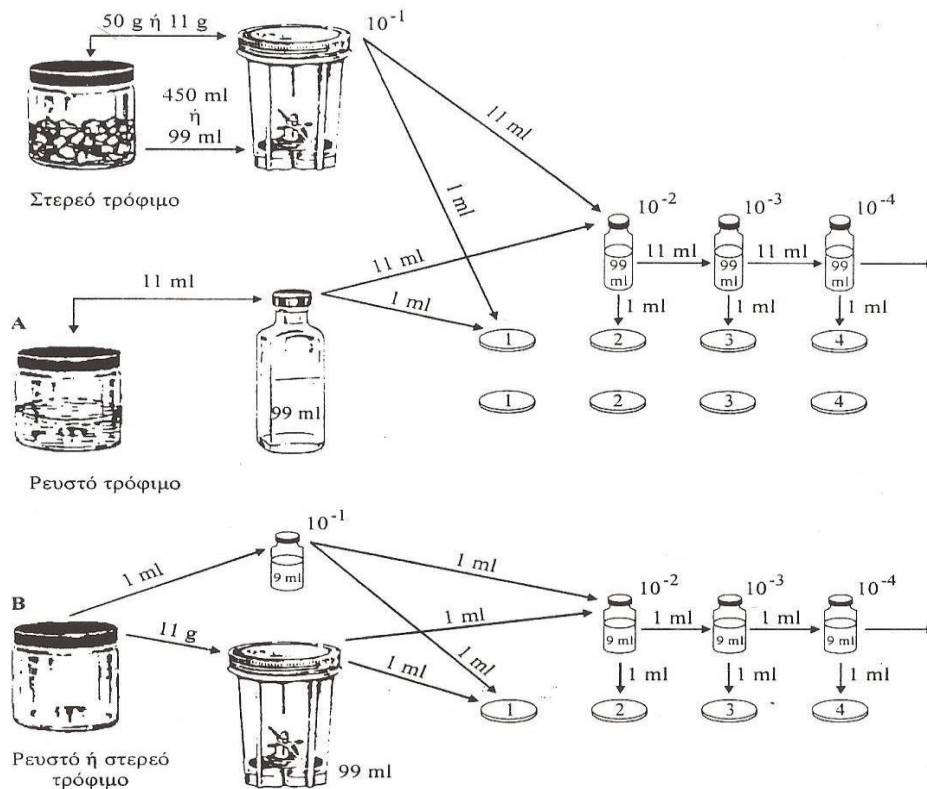
4. Η ενσωμάτωση του δείγματος με το ρευστό υπόστρωμα γίνεται με απαλές κυκλικές κινήσεις αρχικά και οριζόντιες στη συνέχεια. Πρέπει να αποφεύγεται ο διασκορπισμός του υποστρώματος προς τα τοιχώματα ή το κάλυμμα των τρυβλίων.

5. Σε κάθε ομάδα δειγμάτων τοποθετούνται και τρυβλία μάρτυρες για τον έλεγχο της στεριότητας των υλικών (αραιωτικού, τρυβλίων, υποστρώματος).

6. Η όλη εργασία από τη στιγμή της παρασκευής των αραιώσεων μέχρι τον ενοφθαλμισμό πρέπει να τελειώνει μέσα σε 20min (Huhtanen, 1972).

Επώαση

Η επώαση των ενοφθαλμισμένων τρυβλίων γίνεται συνήθως σε θερμοκρασία 32°C για 48±3 ώρες (ΑΡΗΑ, 1976), αλλά σε ορισμένες χώρες η επώαση γίνεται στους 35-37°C για 48±3 ώρες ή στους 32°C για 72 ώρες (ΑΟΑC, 1970), (FDA, 1976), (Harrigan, 1976). Εξάλλου σημαντικές διαφορές υπάρχουν σε σχέση με το είδος του τροφίμου. Παράδειγμα για τον προσδιορισμό της ΟΜΧ του θαλάσσιου νερού και των οστρακοειδών ο WHO (WHO, 1977) ορίζει επώαση στους 20°C επί 5 ημέρες.



Εικόνα 6. Υποδείγματα παρασκευής δεκαδικών αραιώσεων από τρόφιμα (A: Σύνηθες σχήμα, B: οικονομικό σχήμα)

Επιλογή τρυβλίων και αρίθμηση αποικιών

Μετά την επώαση επιλέγονται τα τρυβλία και αριθμούνται οι αποικίες των βακτηρίων που αναπτύχθηκαν σ' αυτά. Επειδή ο τρόπος επιλογής των τρυβλίων και αριθμώσεως των αποικιών επηρεάζει σοβαρά το τελικό αποτέλεσμα, έχουν θεσπιστεί από την ΑΡΗΑ κανόνες αριθμώσεως, τους οποίους ακολουθούν οι περισσότερες χώρες του κόσμου. Η αρίθμηση των αποικιών γίνεται με τη βοήθεια μετρητή αποικιών. Αριθμούνται όλες οι ορατές αποικίες. Η τελική επιλογή των τρυβλίων και ο τρόπος υπολογισμού του αριθμού των αποικιών γίνεται με βάση τους παρακάτω κανόνες της ΑΡΗΑ (ΑΡΗΑ, 1976) (Μάντης Α. , 1980).

1. Αριθμούνται και στη συνέχεια επιλέγονται μόνο τα τρυβλία που έχουν 30 έως 300 αποικίες.

2. Εάν μόνον ένα τρυβλίο έχει 30-300 αποικίες, τότε ο αριθμός των αποικιών πολλαπλασιάζεται με τον αντίστοιχο συντελεστή αραιώσεως (πχ. Για την αραιώση 1:100 με το 100) και το αποτέλεσμα εκφράζει το συνολικό αριθμό μεσόφιλων βακτηρίων (OMX ή ΣΑΜ) ανά g ή ml δείγματος (δείγμα 1, πίνακας 6).

3. Εάν 2 τρυβλία από δύο διαδοχικές αραιώσεις έχουν 30-300 αποικίες υπολογίζεται ο αριθμός βακτηρίων που προκύπτει από κάθε αραιώση και εξάγεται ο μέσος όρος, εκτός και εάν ο λόγος του αριθμού που προκύπτει από τη μεγαλύτερη αραιώση προς τον αριθμό που προκύπτει από τη μικρότερη, είναι μεγαλύτερος του 2. Στην τελευταία περίπτωση λαμβάνεται υπόψη μόνον ο αριθμός που προκύπτει από τη μικρότερη αραιώση (δείγμα 3, πίνακας 6).

4. Εάν όλα τα τρυβλία έχουν λιγότερες από 30 αποικίες, τότε το αποτέλεσμα εκφράζεται με βάση τον αριθμό των αποικιών του τρυβλίου της μικρότερης αραιώσεως (δείγμα 4 πίνακας 6).

5. Εάν κανένα τρυβλίο δεν εμφανίζει αποικίες, τότε το αποτέλεσμα εκφράζεται σαν μικρότερο από το συντελεστή της μικρότερης αραιώσεως (δείγμα 5 πίνακας 6).

6. Εάν όλα τα τρυβλία έχουν περισσότερες από 300 αποικίες, τότε επιλέγεται το τρυβλίο της μεγαλύτερης αραιώσεως και αριθμούνται οι αποικίες του με τη βοήθεια της τετραγωνισμένης οθόνης του μετρητή ή με την παρεμβολή μεταξύ τρυβλίου και οθόνης τετραγωνισμένης διάφανης μήτρας. Οι περισσότερες συχνές περιπτώσεις που μπορεί να εμφανισθούν είναι:

α) Λιγότερες από 10 αποικίες ανά cm^2 . Αριθμούνται σε διάταξη σταυρού 13 τετράγωνα (7 οριζοντίως και 6 καθέτως) και το άθροισμα των αποικιών πολλαπλασιάζεται επί 5, εφόσον χρησιμοποιούνται τρυβλία με εμβαδόν 65 cm^2 . Διαφορετικά υπολογίζεται ο αντίστοιχος συντελεστής.

β) Από 10 έως 100 αποικίες ανά cm^2 . Αριθμούνται 4 τετράγωνα, εξάγεται ο μέσος όρος και το αποτέλεσμα πολλαπλασιάζεται επί 65 και επί το συντελεστή αραιώσεως.

γ) Περισσότερες από 100 αποικίες ανά cm^2 . Ο αριθμός του συνόλου των αποικιών υπολογίζεται ως > 6.500 και το αποτέλεσμα σε 1g ως $> 6.500 \times$ το συντελεστή αραιώσεως (δείγμα 6, πίνακας 6).

7. Εάν χρησιμοποιηθεί διπλή σειρά τρυβλίων, τότε εξάγεται πρώτα ο μέσος όρος των τρυβλίων της ίδιας αραιώσεως και στη συνέχεια των δύο συνεχόμενων αραιώσεων, αφού τηρηθούν οι κανόνες των παραγράφων 1,2 και 3 (δείγματα 8 και 9, πίνακας 6).

8. Το τελικό αποτέλεσμα στρογγυλοποιείται στα 2 πρώτα ψηφία. Εάν το τρίτο ψηφίο είναι ίσο ή μεγαλύτερο από το 5 τότε το δεύτερο αυξάνει στον αμέσως επόμενο αριθμό (δείγμα 9, πίνακας 6).

Πίνακας 6. Παραδείγματα αριθμώσεως και εξαγωγής αποτελεσμάτων Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας σε δείγματα τροφίμων

| Αριθμός Δείγματος | Αριθμός Αποικιών ανά τρυβλίο | | Λόγος | OMX/g ή ml |
|-------------------|------------------------------|-----------|-------|------------|
| | 10^{-2} | 10^{-3} | | |
| 1 | 280 | 24 | - | 28.000 |
| 2 | 230 | 31 | 1:1,3 | 27.000 |
| 3 | 130 | 32 | 1:2,3 | 13.000 |
| 4 | 14 | 1 | - | 1.400 |
| 5 | 0 | 0 | - | <100 |
| 6 | ΠΔΑ* | 6870 | - | >6.500.000 |
| 7 | ΠΔΑ* | 4120 | - | 4.100.000 |
| 8 | 250 | 42 | 1:1 | 33.000 |
| | 280 | 38 | | |
| 9 | 220 | 43 | 1:2,1 | 19.000 |
| | 150 | 36 | | |

ΠΔΑ* :Πολυάριθμες, δεν αριθμούνται

2.1.2 Μέθοδος επιφανειακής εξαπλώσεως (SURFACE ή SPREAD PLATE METHOD)

Είναι μέθοδος εξίσου καλή με την πρότυπη μέθοδο τρυβλίων . Χρησιμοποιείται αναγκαστικά όταν το υπόστρωμα αριθμώσεως είναι αδιαφανές. Έχει το πλεονέκτημα να μην εκθέτει τα βακτήρια του δείγματος σε θερμοκρασία 45°C, η οποία πιθανόν να είναι βλαπτική για ορισμένα από αυτά (Vanderzant, 1965), (Thatcher, 1978).

Ορισμένοι ερευνητές υποστηρίζουν ότι η μέθοδος αυτή δίνει μεγαλύτερο αριθμό βακτηρίων σε σύγκριση με τη μέθοδο ενσωματώσεως, αλλά έχει το μειονέκτημα ότι χρησιμοποιεί μικρού όγκου ενοφθάλμισμα (0,1ml) γεγονός που την κάνει ακατάλληλη για δείγματα με μικρό αριθμό OMX (Punch, 1964), (Clark, 1967).

Απαιτούμενα Υλικά

Όλα τα υλικά της μεθόδου 2.1.1 και επιπλέον :

1.Γυάλινοι ράβδοι μήκους 20cm περίπου και πάχους 4mm, λυγισμένες στη φλόγα σε σχήμα Γ με κεφαλή 3cm περίπου. Μπορεί να χρησιμοποιηθούν και λυγισμένα σιφόνια Pasteur.

2.Ειδική τράπεζα περιστροφής τρυβλίων.

Τεχνική**Προετοιμασία των τρυβλίων**

Το υπόστρωμα αριθμίσεως ρευστοποιείται, ψύχεται στους 50°C και κατανέμεται ανά 15ml περίπου σε τρυβλία petri. Πριν από τη χρήση τους τα τρυβλία ελέγχονται με μεγεθυντικό φακό για τυχόν ύπαρξη, στην επιφάνεια του υποστρώματος, αποικιών επιμολύνσεως και ξεραίνονται σε κλίβανο επώσεως στους 50°C για 12 ώρες.

Προετοιμασία του δείγματος και των αραιώσεων

Γίνονται όπως περιγράφεται στο 2.1.1

Ενοφθαλμισμός

1. Από κάθε αραιώση ενοφθαλμίζεται επιφανειακά απλή ή διπλή σειρά τρυβλίων με 0,1ml το καθένα.
2. Το δείγμα τοποθετείται στο κέντρο της επιφάνειας του υποστρώματος
3. Το τρυβλίο τοποθετείται στην τράπεζα περιστροφής (ή περιστρέφεται με το χέρι) και με τη βοήθεια της ράβδου το δείγμα απλώνεται ομοιόμορφα και με προσοχή σε όλη την επιφάνεια.
4. Τα τρυβλία αφήνονται σε θερμοκρασία εργαστηρίου για μία ώρα περίπου και μετά επωάζονται ανεστραμμένα.

Επώση και αρίθμηση αποικιών

Γίνονται όπως περιγράφεται στο 2.1.1 (επώση) και (επιλογή τρυβλίων) , με τη διαφορά ότι το τελικό αποτέλεσμα εκφράζεται αφού ληφθεί υπόψη το μέγεθος του ενοφθαλμίσματος και ο βαθμός αραιώσεως. Παράδειγμα: Εάν ο αριθμός αποικιών που μετρήθηκαν σε τρυβλίο της αραιώσεως 10^{-3} , είναι 180, τότε το αποτέλεσμα είναι: $OMX/g \text{ ή } ml = 180 \times 1000 \times 10 = 1.800.000$.

2.1.3 Μέθοδος όρθιου σωλήνα (STANDING TUBE METHOD)

Πρόκειται για αρκετά καλή μέθοδο αριθμώσεως αποικιών βακτηρίων. Είναι παρόμοια με τη μέθοδο ενσωματώσεως σε τρυβλία (2.1.1) αλλά αντί για τρυβλία χρησιμοποιεί ορισμένο αριθμό σωλήνων για κάθε αραιώση (συνήθως πέντε). Αυτό έχει ως συνέπεια την αύξηση της ευαισθησίας της μεθόδου, γεγονός που την κάνει κατάλληλη για την αρίθμηση της OMX σε δείγματα με σχετικά μικρό πληθυσμό βακτηρίων.

Απαιτούμενα Υλικά

1. Δοκιμαστικοί σωλήνες 180x 180mm
2. Αραιωτικό υγρό (A-5, A-15)
3. Plate Count Agar (B-80)

Τεχνική (WHO, 1977)

Προετοιμασία του δείγματος – Αραιώσεις

Η προετοιμασία του δείγματος και οι αραιώσεις γίνονται όπως στο 2.1.1

Ενοφθαλμισμός

1. Από κάθε αραιώση ενοφθαλμίζονται 5 σωλήνες οι οποίοι περιέχουν 10ml ρευστό, θερμοκρασίας 45°C υπόστρωμα Plate Count Agar , με 1ml ο καθένας.
2. Όταν πρόκειται για ρευστά δείγματα, γίνεται ενοφθαλμισμός και από το αναραιωτό δείγμα.
3. Κάθε σωλήνας που ενοφθαλμίζεται αναστρέφεται, αφού πωματιστεί με το βύσμα του, ώστε να αναμιχθεί καλά το δείγμα με το υπόστρωμα και στη συνέχεια βυθίζεται σε κρύο νερό για να στερεοποιηθεί σε κάθετη στήλη.

Επώαση

Οι σωλήνες επωάζονται στους $32 \pm 1^\circ\text{C}$ για 48 ώρες.

Αρίθμηση αποικιών και έκφραση αποτελέσματος

1. Επιλέγονται για αρίθμηση οι 5 σωλήνες μιας μόνο αραιώσεως, προτίμηση εκείνης της αραιώσεως στην οποία οι αποικίες που προέκυψαν από το ενοφθάλμισμα διαχωρίζονται καλά, έχουν ικανοποιητικό μέγεθος κυμαίνονται σε αριθμό από 20-100 ανά σωλήνα.

2.Αριθμούνται οι αποικίες και στους πέντε σωλήνες της ίδιας αραιώσεως. Η αρίθμηση γίνεται με τη βοήθεια μεγεθυντικού φακού και σε κατάλληλο φωτισμό.

3.Αθροίζονται οι αποικίες που αριθμήθηκαν και στους πέντε σωλήνες, το άθροισμα διαιρείται με το 5 και το πηλίκο πολλαπλασιάζεται με το βαθμό αραιώσεως.

Παράδειγμα: Έστω ότι αριθμήθηκαν οι πέντε σωλήνες της αραιώσεως 1:1000 και έδωσαν 45,40,48,60 και 66 αποικίες αντίστοιχα. Το αποτέλεσμα είναι:

$$\text{OMX} / \text{ml ή g} = [(45+40+48+60+66)/5] \times 10^3 = 52 \times 10^3 = 52.000$$

2.1.4 Μέθοδος σταγόνων άγαρ (AGAR DROPLETS METHOD)

Έχει προταθεί από τους Sharpe και Kilsby (Sharpe A. K., 1971) σαν γρήγορη και οικονομική από άποψη υλικών μέθοδος κατάλληλη για εργαστήρια με μεγάλο φόρτο εξετάσεως δειγμάτων. Μπορεί να δώσει αποτελέσματα για δείγματα με μικρό ή μεγάλο φορτίο OMX.

Απαιτούμενα Υλικά

1. Αραιωτικό υγρό (A-5 ή A-15)
2. Plate Count Agar (B-80), το οποίο έχει κατανεμηθεί σε φιαλίδια ανά 9ml
3. Τρυβλία petri, γυάλινα ή μιας χρήσεως.
4. Σιφώνια Pasteur ικανά να αποδίδουν σταγόνες 0,033ml ή σιφώνια του 0,1ml

Τεχνική

Παρασκευή Αραιώσεων

1. Ζυγίζονται 10g δείγματος που προετοιμάζεται όπως στο 2.1.1 και ομοιογενοποιούνται σε ηλεκτρικό ομογενοποιητή με 90ml αραιωτικού (αραίωση 1:10).

2. Ρευστοποιείται το Plate Count Agar και θερμοστατείται στους 45°C σε υδατόλουτρο. Για κάθε δείγμα απαιτούνται 3 φιαλίδια με υπόστρωμα.

3. Με στείρο σιφόνιο μεταφέρεται 1ml από την αραιώση 1:10 στο πρώτο φιαλίδιο. Γίνεται καλή ανάμιξη και με σιφόνιο Pasteur μεταφέρονται 3 σταγόνες (0,1ml) στο επόμενο και από αυτό πάλι 3 σταγόνες στο τελευταίο. Έτσι παρασκευάζονται αραιώσεις της τάξεως 10^{-2} , 10^{-4} και 10^{-6} .

Ενοφθαλμισμός

Από κάθε φιαλίδιο, αμέσως μετά την ανάμιξη του δείγματος με το υπόστρωμα, παίρνεται υλικό και αφήνεται με μορφή σταγόνων, στον πυθμένα στείρου τρυβλίου. Οι σταγόνες σχηματίζονται κατά μήκος μιας γραμμής που χαράζεται στην εξωτερική επιφάνεια του τρυβλίου. Γίνονται συνολικά 5 τέτοιες εναποθέσεις των τριών σταγόνων η κάθε μία (0,1ml).

Επώαση

Τα τρυβλία επωάζονται ανάστροφα στους 30°C για 48 ώρες

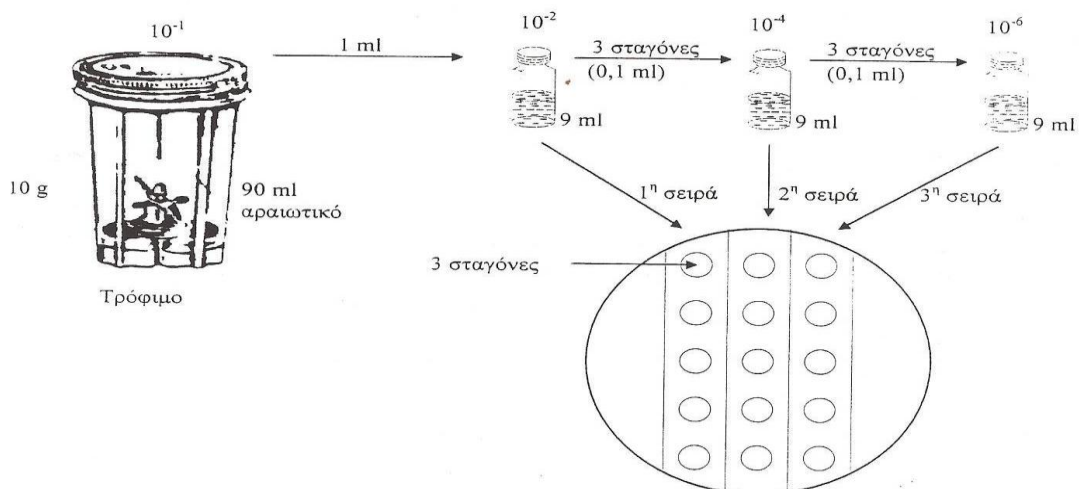
Αρίθμηση Αποικιών

1. Οι αποικίες που σχηματίζονται στις περιοχές εναποθέσεως των σταγόνων, αριθμούνται με τη βοήθεια στερεοσκοπίου (μεγέθυνση 10 φορές) ή με ειδικό σύστημα προβολής σε οθόνη.

2. Επιλέγονται για αρίθμηση οι σταγόνες μιας σειράς (κατά προτίμηση εκείνης που οι αποικίες δεν υπερβαίνουν τις 100 ανά σταγόνα (του 0,1 ml)).

3. Εάν οι αποικίες είναι λιγότερες από 100 ανά σταγόνα, τότε αριθμούνται οι αποικίες και στις 5 σταγόνες (κάθε σταγόνα αντιπροσωπεύει ενοφθάλμισμα 0,1 ml από την αντίστοιχη αραιώση) και το άθροισμά τους πολλαπλασιάζεται επί 2 και επί το συντελεστή αραιώσεως.

4. Εάν αριθμούνται 100-200 αποικίες ανά σταγόνα, τότε αριθμούνται οι αποικίες 2 μόνο σταγόνων και το άθροισμα πολλαπλασιάζεται επί 5 και επί το συντελεστή αραιώσεως.



Εικόνα 7. Σχηματική παράσταση προσδιορισμού ΟΜΧ με τη μέθοδο σταγόνων άγαρ

2.1.5 Μέθοδος σπειροειδούς ενοφθαλμισμού τρυβλίων (SPIRAL PLATE COUNT METHOD ή SPC) (Gilchrist JE, 1973)

Είναι σύγχρονη μέθοδος, αποτέλεσμα της προσπάθειας για αυτοματισμό στις μικροβιολογικές εξετάσεις των τροφίμων. Διακρίνεται από ταχύτητα και οικονομία σε υλικά και προσωπικό. Ένα μόνο άτομο μπορεί να εξετάσει 10-50 δείγματα την ώρα. Απαιτεί όμως ειδικό εξοπλισμό σε συσκευές και όργανα.

Απαιτούμενα Υλικά

1.Συσκευή σπειροειδούς ενοφθαλμισμού (Spiral platter), ρυθμισμένη να ενοφθαλμίζει στην επιφάνεια τρυβλίου με μορφή συνεχούς αρχιμήδειας σπείρας όγκο δείγματος ίσο με 0,035ml

2.Μετρητής αποικιών εφοδιασμένος με ειδική μήτρα ή οθόνη, ειδικά διαβαθμισμένη ώστε να συσχετίζει ορισμένη επιφάνεια του τρυβλίου με ορισμένο όγκο δείγματος.

3.Συσκευή κενού

4.Φιάλη κενού για παγίδευση-απόρριψη υγρών

5.Τρυβλία petri 150x15mm

6.Ποτήρια ζέσεως των 5ml ή πλαστικά μιας χρήσεως

7.Διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου (εμπορίου) 5% (NaOCl)

8.Στείρο αραιωτικό υγρό (A-5, A-15)

9.Υπόστρωμα αριθμήσεως (B-80)

Τεχνική

Προετοιμασία τρυβλίων με υπόστρωμα

Παρασκευάζεται το υπόστρωμα αριθμήσεως, κατανέμεται σε φιάλες, αποστειρώνεται και φέρεται για θερμοστάτηση σε υδατόλουτρο 60-70°C. Στη συνέχεια κατανέμεται σε τρυβλία ανά 40-50ml. Σε όλα τα τρυβλία κατανέμεται ακριβώς η ίδια ποσότητα ώστε να σχηματίζεται στοιβάδα του αυτού ύψους. Τα τρυβλία τοποθετούνται σε επίπεδη τράπεζα, αφήνονται να στερεοποιηθούν, συσκευάζονται σε σάκους από πολυαιθυλένιο και συντηρούνται ανεστραμμένα στους 0-4°C μέχρι ένα μήνα. Πριν από τη χρήση τους φέρονται σε θερμοκρασία δωματίου και ελέγχονται. Η επιφάνεια τους δεν πρέπει να είναι υγρή ή ανώμαλη και κυρίως δεν πρέπει να φέρει ούτε μία αποικία από επιμόλυνση.

Προετοιμασία του δείγματος

Εάν πρόκειται για στερεό ή παχύρευστο τρόφιμο, προετοιμάζεται η αραιώση 1:10 όπως στο 2.1.1, διαφορετικά το δείγμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί και αναραίωτο.

Προετοιμασία της συσκευής ενοφθαλμισμού

Η ειδική συσκευή ελέγχεται καθημερινά πριν από κάθε περίοδο λειτουργίας, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Ρυθμίζεται η γωνία του στύλου ενοφθαλμισμού σε σχέση με την επιφάνεια της τράπεζας τοποθέτησεως τρυβλίων. Για τον έλεγχο της γωνίας τοποθετείται μια καλυπτρίδα στην άκρη του στύλου. Εάν η καλυπτρίδα είναι παράλληλη με την τράπεζα και απέχει 1mm περίπου, η γωνία είναι καλή. Ο στύλος απολυμαίνεται με διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου και εκπλένεται με στείρο αραιωτικό υγρό. Αυτό γίνεται πάντοτε πριν από την αναρρόφηση δείγματος.

Ενοφθαλμισμός

Μετά την προετοιμασία της συσκευής γίνεται αναρρόφηση του δείγματος με τη βοήθεια χαμηλού κενού. Όταν ο σωλήνας από τεφλόν και η σύριγγα γεμίσουν με δείγμα κλείνεται η διπλής ενεργείας βαλβίδα που είναι προσαρμοσμένη στη σύριγγα. Τοποθετείται ένα τρυβλίο στην περιστρεφόμενη τράπεζα ενοφθαλμισμού, προσαρμόζεται ο στύλος ενοφθαλμισμού στην επιφάνεια του υποστρώματος και η συσκευή μπαίνει σε λειτουργία. Το τρυβλίο μαζί με την τράπεζα περιστρέφεται με σταθερή ταχύτητα και το δείγμα ενοφθαλμίζεται πάνω στην επιφάνεια του άγαρ σε μορφή αρχιμήδειας σπείρας. Η συσκευή σταματάει αυτόματα όταν τελειώσει ο ενοφθαλμισμός του δείγματος (0,035ml). Απομακρύνεται το τρυβλίο αφού τοποθετηθεί το κάλυμμά του, επαναφέρεται ο στύλος στην αρχική του θέση και η συσκευή προετοιμάζεται για το επόμενο δείγμα (έκπλυση-απολύμανση-έκπλυση).

Επώαση

Τα τρυβλία που ενοφθαλμίστηκαν, αφού στεγνώσουν επιφανειακά, τοποθετούνται ανεστραμμένα σε επώαση $32\pm 1^{\circ}\text{C}$ για 48 ± 3 ώρες. Μετά το τέλος της επώασεως εξετάζονται τα τρυβλία και αριθμούνται οι αποικίες με τη βοήθεια της ειδικής μήτρας αριθμήσεως.

Μήτρα αριθμώσεως (counting grid)

Η μήτρα αριθμώσεως παριστάνει αποτύπωση του πυθμένα του τρυβλίου (εικόνα 8). Η επιφάνειά της διαιρείται με τέσσερις διαμέτρους σε οκτώ ίσους κυκλικούς τομείς και κάθε τομέας διαιρείται σε τέσσερα τμήματα από αντίστοιχα τόξα ομόκεντρων κύκλων. Τα τμήματα κάθε τομέα αριθμούνται από την περιφέρεια προς το κέντρο με τους αριθμούς 1,2,3 και 4.

Κανόνες αριθμώσεως

Μετά την επώαση το τρυβλίο τοποθετείται στο μετρητή αποικιών και ρυθμίζεται η θέση του ώστε το κέντρο του να ταυτίζεται με το κέντρο της βαθμολογημένης μήτρας. Η αρίθμηση των αποικιών γίνεται με βάση τον κανόνα των 20.

1. Κανόνας των 20: Επιλέγεται ένας από τους κυκλικούς τομείς και αρχίζει η αρίθμηση των αποικιών από το τμήμα αριθ.1 προς το κέντρο, μέχρις ότου μετρηθούν 20 αποικίες. Η αρίθμηση συνεχίζεται μέχρις ότου αριθμηθούν όλες οι αποικίες του τμήματος στο οποίο υπάρχει η 20^η αποικία.

Παράλληλα με τον αριθμό των αποικιών σημειώνεται και ο αριθμός του τμήματος στο οποίο μετρήθηκε η 20^η αποικία.

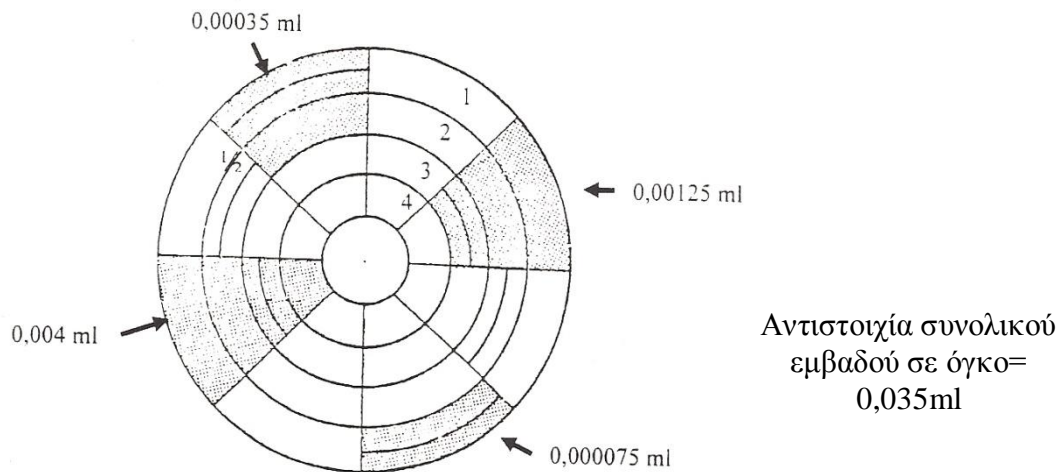
Αριθμούνται επίσης οι αποικίες που υπάρχουν στα αντίστοιχα τμήματα του αντίθετου κυκλικού τομέα.

Προσθέτονται οι αποικίες των τμημάτων και των δύο τομέων και το άθροισμα διαιρείται με τον όγκο του δείγματος που αντιστοιχεί στην αντίστοιχη περιοχή, δηλαδή:
Αριθμός βακτηρίων/ml=Αριθμός αποικιών που μετρήθηκαν/Όγκος σε ml του δείγματος
Εάν ο ενοφθαλμισμός έγινε από την αραίωση 1:10, τότε το αποτέλεσμα πολλαπλασιάζεται επί 10.

Παράδειγμα: Εάν μετρήθηκε το υπ' αριθ.1 τμήμα σε 2 αντίθετους κυκλικούς τομείς και έδωσε 25 και 35 αποικίες τότε, δεδομένου ότι ο αντίστοιχος όγκος του δείγματος που απλώνεται στα 2 αυτά τμήματα είναι $2 \times 0,000075=0,00015\text{ml}$ (εικόνα 8), έχουμε:
 $(25+35)/0,00015 = 40.000/\text{ml}$ (ή $400.000 \times 10 = 4 \times 10^6/\text{g}$ εφόσον πρόκειται για στερεό τρόφιμο)

2. Εάν αριθμούνται περισσότερες από 75 αποικίες στο τμήμα αριθμ.1, ενός τομέα, τότε το αποτέλεσμα εκφράζεται σαν $> 500.000/\text{ml}$

3. Εάν σε ολόκληρο κυκλικό τομέα αριθμούνται λιγότερες από 20 αποικίες τότε αριθμούνται οι αποικίες σε όλο το τρυβλίο petri και ο αριθμός διαιρείται με το 0,035 (συνολικός όγκος δείγματος που απλώνεται στο τρυβλίο)
4. Εάν αριθμούνται λιγότερες από 20 αποικίες σε όλο το τρυβλίο το αποτέλεσμα εκφράζεται σαν $< 500/\text{ml}$



Εικόνα 8. Μήτρα αριθμίσσεως αποικιών (μέθοδος σπειροειδούς ενοφθαλμισμού τρυβλίων)

2.2 Απομόνωση και αρίθμηση του *Staphylococcus aureus*

2.2.1 Παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη και την επιβίωση

Εφόσον η βιομηχανία τροφίμων επικεντρώνει το ενδιαφέρον της στον *S.aureus*, το μεγαλύτερο κομμάτι της βιβλιογραφίας που αφορά στο γένος του *Staphylococcus* έχει επικεντρωθεί σε αυτό το είδος.

Χρησιμοποιώντας δεδομένα από το ICMSF (1996), ο *S.aureus* έχει την ικανότητα να αναπτύσσεται υπό ένα μεγάλο εύρος θερμοκρασιών (7-48 °C), με ευνοϊκότερες θερμοκρασίες από 35 έως 40°C (πίνακας 2). Οι μικροοργανισμοί θανατώνονται άμεσα σε θερμοκρασίες που εφαρμόζονται στην παστερίωση αλλά η αντοχή στην θερμότητα μπορεί να αυξηθεί σε ξηρά και με υψηλή περιεκτικότητα σε λίπος τρόφιμα. Οι συνθήκες ανάπτυξης μπορούν, επίσης, να επηρεάσουν την αντοχή των κυττάρων στη θερμότητα, με την αύξηση αυτής σε θερμοκρασίες ανάπτυξης 37 °C και άνω και με μείωση αυτής σε θερμοκρασίες ανάπτυξης 20 °C και κάτω. Οι μικροοργανισμοί είναι πολύ ανθεκτικοί στην ψύξη και τήξη, ενώ επιβιώνουν σε τρόφιμα που συντηρούνται σε θερμοκρασίες μικρότερες των -20 °C.

Ο *Staphylococcus aureus* είναι ικανός να αναπτυχθεί σε pH από 4 έως 10, με ευνοϊκότερες τιμές από 6 έως 7. Έχει φανεί ότι κάποια στελέχη του είδους είναι ικανά να

αναπτυχθούν σε pH μικρότερο του 4,3, εφόσον ένα ανόργανο οξύ, όπως το HCl, χρησιμοποιηθεί ως το καυστικό μέσο. Παρόλαυτα, υπό την παρουσία οργανικού οξέος, τα όρια του pH είναι υψηλότερα (ICMSF, 1996).

Σε ότι αφορά στην ενεργότητα του νερού (a_w), τα αναγνωρισμένο κατώτερο όριο είναι 0,86.

Τα όρια για την ανάπτυξη και την παραγωγή εντεροτοξινών, σε ότι αφορά στην θερμοκρασία, το pH και την ενεργότητα του νερού δίνονται στον πίνακα 7.

Πίνακας 7. Όρια για την ανάπτυξη του *S.aureus* και την παραγωγή εντεροτοξινών

| Παράγοντας | Ανάπτυξη* | | Παραγωγή εντεροτοξινών* | |
|----------------------------|-------------|-----------------|-------------------------|--------------|
| | Ευνοϊκότερη | Εύρος | Ευνοϊκότερη | Εύρος |
| Θερμοκρασία (°C) | 37 | 7-48 | 40-45 | 10-48 |
| pH | 6-7 | 4-10 | 7-8 | 4,5-9,6 ^ |
| Ενεργότητα νερού (a_w) | 0,98 | 0,83→ 0,99** | 0,98 | 0,87→ 0,99^^ |

*Τα όρια για την ανάπτυξη και την παραγωγή τοξινών είναι για τον *S.aureus* υπό τις καταλληλότερες συνθήκες

** Αερόβια (αναερόβια $a_w=0,90-0,99$)

^ Αερόβια (αναερόβια το κατώτερο όριο pH είναι 5,0)

^^ Αερόβια (αναερόβια $a_w=0,92->0,99$)

Η μόλυνση των τροφίμων μπορεί να συμβεί λόγω ελλιπούς εφαρμογής κανόνων υγιεινής σε οποιοδήποτε τμήμα της τροφικής αλυσίδας. Αν η μόλυνση συνδυαστεί με αποθήκευση σε θερμοκρασίες και περιόδους, που μπορούν να ευνοήσουν τη σημαντική ανάπτυξη, μπορεί να συντεθεί SE. Οι σταφυλόκοκκοι αποικούν επίσης σε εξοπλισμούς επεξεργασίας τροφίμων που είναι δύσκολο να καθαριστούν, όπως συσκευές άλεσης και επιφάνειες κοπής. Η μελέτη 700 και παραπάνω ξεσπασμάτων υπέδειξε τις σύνηθες συνθήκες που συνδέονται με την ανάπτυξη ασθενειών που προέρχονται από τρόφιμα:

- Ανεπαρκής ψύξη
- Προετοιμασία φαγητού σε χρόνο πολύ πριν από το χρόνο κατανάλωσης
- Ελλιπής προσωπική υγιεινή
- Ανεπαρκές μαγείρεμα ή ζέσταμα
- Επιμήκυνση της χρήσης σκευών σερβιρίσματος κατά το σερβίρισμα φαγητού (Montvill, 2001).

Η αρίθμηση του *S. aureus* στα τρόφιμα γίνεται για τρεις κυρίως λόγους (FDA, 1976):

1. Για τον έλεγχο τροφίμων υπόπτων προκλήσεως τροφικών τοξινώσεων. Στην περίπτωση αυτή η ανεύρεση μεγάλου αριθμού σταφυλόκοκκων σε συνδυασμό με τα εκδηλωθέντα συμπτώματα στα άτομα που υπέστησαν την τροφοδηλητηρίαση είναι ενδεικτική σε μεγάλο βαθμό υπάρξεως σταφυλοκοκκικής εντεροτοξίνης στο ύποπτο τρόφιμο.

2. Για να διερευνηθεί εάν το τρόφιμο που εξετάζεται μπορεί να αποβεί αίτιο σταφυλοκοκκικής τοξινώσεως όταν οι συνθήκες συντηρήσεώς του ευνοούν το σχηματισμό εντεροτοξίνης.

3. Για να διερευνηθεί εάν οι συνθήκες παρασκευής του τροφίμου είναι ικανοποιητικές από απόψεως υγιεινής. Σε ορισμένες κατηγορίες τροφίμων (κρέμες, παγωτά κλπ) οι σταφυλόκοκκοι είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν σαν δείκτες των συνθηκών υγιεινής που επικρατούν κατά την παρασκευή τους.

Τα περισσότερα τρόφιμα τα οποία έχουν ενοχοποιηθεί για την πρόκληση σταφυλοκοκκικής τοξινώσεως περιέχουν μεγάλο αριθμό σταφυλόκοκκων, μεγαλύτερο του 50×10^4 /g (Thatcher F.S., 1968) και συνήθως της τάξεως των 50×10^6 - 200×10^6 /g, ανάλογα με τη φύση του τροφίμου. Οι σταφυλοκοκκικές εντεροτοξίνες εάν σχηματιστούν παραμένουν δραστικές μέσα στα τρόφιμα και δεν αδρανοποιούνται ούτε με θερμική κατεργασία γιατί είναι θερμοάντοχες, ούτε με μακρόχρονη συντήρηση του τροφίμου. Γενικά συνθήκες του τροφίμου ή επεξεργασία του που ελαττώνουν ή εξαφανίζουν τον υπεύθυνο για την παραγωγή τοξίνης πληθυσμό *S.aureus*, δεν επιδρούν στις εντεροτοξίνες. Γι' αυτό δεν είναι σπάνιο να συμβεί κρούσμα σταφυλοκοκκικής τροφικής τοξινώσεως από τρόφιμο στο οποίο δεν ανιχνεύονται σταφυλόκοκκοι.

Η ανεύρεση μικρού αριθμού σταφυλόκοκκων σ' ένα τρόφιμο δεν θεωρείται ικανοποιητική απόδειξη για την ενοχοποίησή του ως υπεύθυνου τροφικής τοξινώσεως. Η απομόνωση εντεροτοξίνης από ύποπτο τρόφιμο είναι τεκμήριο ενοχής αλλά η μη απομόνωση δεν απαλλάσσει το τρόφιμο, λόγω των περιορισμένων δυνατοτήτων των μεθόδων ανιχνεύσεως εντεροτοξινών (Minor, 1976).

Επειδή όμως η αναζήτηση εντεροτοξινών σ' ένα τρόφιμο είναι εργασία πολύπλοκη, δαπανηρή και απαιτεί χρόνο και ειδικό εργαστηριακό εξοπλισμό, ο υγειονομικός έλεγχος περιορίζεται στην αναζήτηση και αρίθμηση του *S. aureus* και μόνο σε ειδικές περιπτώσεις (ύποπτο τρόφιμο) γίνεται διερεύνηση για ύπαρξη εντεροτοξινών

2.2.2 Αρίθμηση Σταφυλόκοκκων που παράγουν πηκτάση

Η αρίθμηση σταφυλόκοκκων που παράγουν πηκτάση μπορεί να γίνει (Chou, 1969):

A) Με μεθόδους απευθείας ενοφθαλμισμού στερεών υποστρωμάτων χωρίς να προηγηθεί εμπλουτιστική φάση.

B) Με μεθόδους που στηρίζονται στην τεχνική των πολλαπλών σωλήνων (MPN) και οι οποίες χρησιμοποιούν είτε μόνο υγρά υποστρώματα είτε συνδυασμό υγρών και στερεών υποστρωμάτων.

Απαιτούμενα Υλικά

1. Υγρό αραιώσεως . Χρησιμοποιείται ανάλογα με το τρόφιμο, ένα από τα υγρά αραιώσεως που αναφέρονται στο παράρτημα (A-5 , A-10, A-17)
2. *Staphylococcus* Enrichment Broth (B-95)
3. Υπόστρωμα Giolitti και Cantoni (B-33)
4. Salt Meat Broth (B-91)
5. Tellurite Glycine Agar ή TGA (B-98)
6. Tellurite Polymyxine Egg Yolk Agar ή TPEY (B-100)
7. Baird – Parker Medium (B-4α)
8. Mannitol Salt Agar (B-54)
9. Πλάσμα ανθρώπου ή κονίκλου

Τεχνική**Προετοιμασία δείγματος και αραιώσεων**

Γίνεται όπως περιγράφεται στο 2.1.1

Μέθοδος πολλαπλών σωλήνων

Εφαρμόζεται σε τρόφιμα τα οποία περιέχουν μικρό αριθμό *S. aureus* (<100/g)

2.2.3 Ταχεία Μέθοδος MPN (Wilson E, 1959)**1. Εμπλουτιστική φάση:**

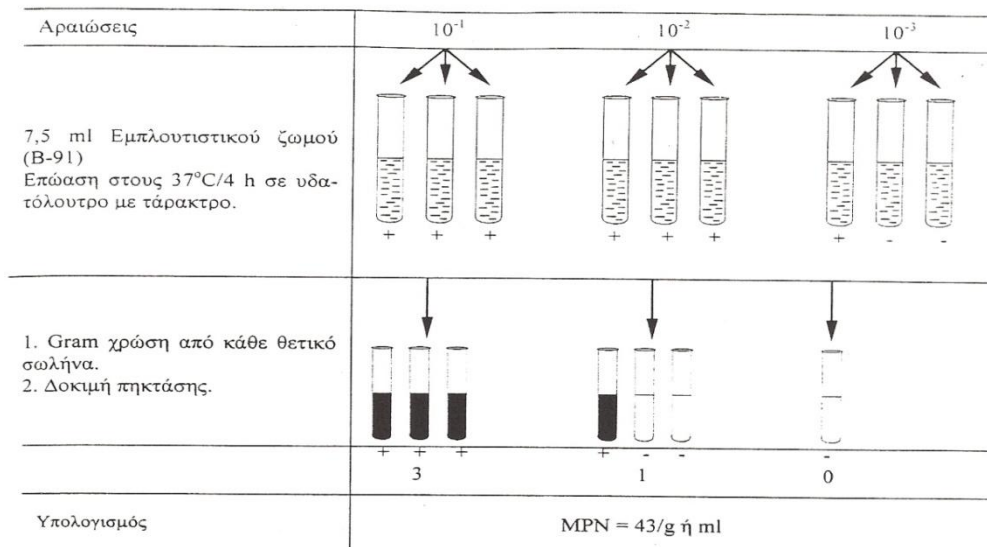
Από τις κατάλληλες διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις του τροφίμου χρησιμοποιούνται τουλάχιστον 3 για τον ενοφθαλμισμό τριπλής ή πενταπλής σειράς σωλήνων οι οποίοι περιέχουν 7,5ml *Staphylococcus* Enrichment Broth. Ο όγκος του ενοφθαλμίσματος είναι 1ml. Έτσι η τελική συγκέντρωση του NaCl σε κάθε σωλήνα που ενοφθαλμίζεται μειώνεται στο 6%.

Επώαση στους 37 °C για 4 ώρες σε υδατόλουτρο που διαθέτει τάρρακτρο.

2. Επιβεβαιωτική δοκιμή :

Από τους σωλήνες που παρουσιάζουν ανάπτυξη παρασκευάζονται επιχρίσματα τα οποία εξετάζονται μικροσκοπικώς και εφόσον διαπιστωθεί η ύπαρξη θετικών κατά Gram κόκκων με χαρακτηριστική διάταξη πραγματοποιείται η δοκιμή της πηκτάσης με τη μέθοδο των σωλήνων .

Θετική δοκιμή πηκτάσης επιβεβαιώνει θετικότητα του αντίστοιχου σωλήνα. Έτσι ο συνδυασμός των θετικών σωλήνων στις διάφορες αραιώσεις οδηγεί με τη βοήθεια των πινάκων Mc Crady σε αριθμό MPN/g ή ml τροφίμου (εικόνα 9)



Εικόνα 9. Ταχεία μέθοδος αριθμώσεως σταφυλόκοκκων

2.2.4 Βραδεία Μέθοδος MPN

Κατά τη βραδεία μέθοδο γίνεται συνδυασμός υγρών εμπλουτιστικών και στερεών εκλεκτικών υποστρωμάτων. Έχουν προταθεί περισσότεροι από ένας συνδυασμοί με καλά αποτελέσματα.

1. Συνδυασμός N⁰ 1 (Καραϊωάννογλου, 1975):

A) Εμπλουτιστική Φάση: Όπως και στην ταχεία μέθοδο. Η επώαση όμως των σωλήνων γίνεται σε κλίβανο θερμοκρασίας 37°C για 18-24 ώρες.

B) Προκαταρκτική Δοκιμή: Από τους σωλήνες της εμπλουτιστικής φάσεως που παρουσιάζουν ανάπτυξη γίνεται επιφανειακός ενοφθαλμισμός σε τρυβλία petri που περιέχουν υπόστρωμα Tellurite Glycine Agar.

Επώαση: στους 37°C για 24-48 ώρες

Γ) Επιβεβαιωτική Δοκιμή: Τρυβλία που παρουσιάζουν μαύρες, γυαλιστερές, υπεγειρόμενες αποικίες διαμέτρου 0,5-1mm είναι ενδεικτικά υπάρξεως σταφυλόκοκκων που παράγουν πηκτάση στον αντίστοιχο σωλήνα και αραιώση. Επιλέγονται 1-2 χαρακτηριστικές αποικίες από κάθε τρυβλίο, εξετάζονται μικροσκοπικώς και υποβάλλονται στη δοκιμή της πηκτάσης.

Ο υπολογισμός του αριθμού αριθμό MPN/g ή ml τροφίμου γίνεται όπως και στο 2.2.2.

2. Συνδυασμός N⁰ 2 (Giolitti, 1966), (Ψάννης, 1976):

A) Εμπλουτιστική Φάση : Προπαρασκευή και ενοφθαλμισμός του δείγματος όπως και στην ταχεία μέθοδο. Ως εμπλουτιστικός ζωμός χρησιμοποιείται το υπόστρωμα Giolitti και Cantoni, καταναμημένο σε σωλήνες σε όγκους των 19ml. Οι σωλήνες θερμαίνονται στον

ατμό για να απομακρυνθεί ο αέρας που έχει εγκλωβιστεί στο υπόστρωμα, ψύχονται και προσθέεται σε κάθε σωλήνα ασήπτως 0,1ml υδατικού διαλύματος Potassium tellurite 1% το οποίο αποστειρώθηκε με φίλτρο Seitz. Ο ενοφθαλμισμός γίνεται όπως και στην ταχεία μέθοδο. Μετά τον ενοφθαλμισμό επιστιβαδύεται στρώμα στείρου παραφινέλαιου ύψους 1,2 -2cm.

Επώαση: στους 37⁰C για 24ώρες

Θετικοί θεωρούνται οι σωλήνες που παρουσιάζουν μαύρο χρώμα ή μαύρο ίζημα.

B) Προκαταρκτική Δοκιμή: Από τους θετικούς σωλήνες γίνεται επιφανειακός ενοφθαλμισμός σε υπόστρωμα Tellurite Polymyxine Egg Yolk Agar.

Επώαση: στους 37⁰C για 48 ώρες

Εκτίμηση αποτελέσματος: Στο παραπάνω υπόστρωμα οι αποικίες σταφυλόκοκκων έχουν διάμετρο 1-1,5mm, χρώμα μαύρο ή βαθύ γκρίζο και παρουσιάζουν μία ή περισσότερες από τις μορφές αντιδράσεως με τη λεκιθίνη :

α) Καθίζηση της λεκιθίνης γύρω και κάτω από την αποικία

β) Διαυγής άλω γύρω από την αποικία και ίζημα κάτω απ' αυτή

γ) Καθίζηση της λεκιθίνης κάτω από την αποικία χωρίς να παρουσιάζεται ούτε άλως ούτε καθίζηση γύρω απ' αυτή (Thatcher F.S., 1968).

Γ)Επιβεβαιωτική Δοκιμή: Επιλέγονται μία ή περισσότερες χαρακτηριστικές αποικίες οι οποίες εξετάζονται μικροσκοπικώς και κατόπιν υποβάλλονται στη δοκιμή της πηκτάσης με τη μέθοδο των σωλήνων.

Ο αριθμός MPN/g ή ml τροφίμου υπολογίζεται όπως στο 2.2.2

3. Συνδυασμός N⁰ 3 (Μάντης Α. Κ., 1999):

A) Εμπλουτιστική Φάση : Προετοιμασία και ενοφθαλμισμός του δείγματος όπως και στην ταχεία μέθοδο. Ως εμπλουτιστικός ζωμός χρησιμοποιείται το υπόστρωμα Salt Meat Broth.

Επώαση: στους 37⁰C για 24-48 ώρες.

B) Προκαταρκτική Δοκιμή : Από τους σωλήνες οι οποίοι παρουσιάζουν ανάπτυξη γίνεται επιφανειακός ενοφθαλμισμός στο υπόστρωμα Tellurite Polymyxine Egg Yolk Agar ή Mannitol Salt Agar ή Baird –Parker Medium.

Επώαση: στους 37⁰C για 24-48 ώρες

Ανάγνωση αποτελέσματος: Στο υπόστρωμα Mannitol Salt Agar οι θεωρούμενοι ότι παράγουν πηκτάση σταφυλόκοκκοι περιβάλλονται από μια κίτρινη ζώνη. Στο υπόστρωμα Baird –Parker και TPEY ο *S.aureus* σχηματίζει μαύρες γυαλιστερές αποικίες με λευκά

στενά χείλη οι οποίες περιβάλλονται από διαυγή ζώνη. Σε ορισμένες περιπτώσεις όμως περιβάλλονται από αδιαφανή ζώνη.

Γ) Επιβεβαιωτική Δοκιμή : Επιλέγονται μία ή περισσότερες χαρακτηριστικές αποικίες οι οποίες εξετάζονται μικροσκοπικώς και κατόπιν υποβάλλονται στη δοκιμή της πηκτάσης με τη μέθοδο των σωλήνων.

Ο αριθμός MPN/g ή ml τροφίμου υπολογίζεται όπως στο 2.2.2

2.2.5 Μέθοδος επιφανειακής εξαπλώσεως

Από τις κατάλληλες δεκαδικές αραιώσεις του τροφίμου γίνεται απευθείας επιφανειακή σπορά, με τη βοήθεια κεκαμμένης γυάλινης ράβδου 0,2ml σε διπλή σειρά τρυβλίων που περιέχουν ένα από τα υποστρώματα: Tellurite Polymyxine Egg Yolk Agar (Μάντης Α. Κ., 1999), Tellurite Glycine Agar (APHA, 1976), ή Mannitol Salt Agar APHA, 1976), Baird – Parker Medium (FDA, 1976)

Επώαση : στους 37⁰C για 24-48 ώρες

Μετά την επώαση όλες οι χαρακτηριστικές αποικίες (εφόσον είναι λιγότερες από 10) ή αριθμός ίσος με την τετραγωνική ρίζα του συνόλου τους (εφόσον είναι περισσότερες από 10), εξετάζονται μικροσκοπικώς και κατόπιν υποβάλλονται στη δοκιμή της πηκτάσης, πρώτα με τη μέθοδο επί αντικειμενοφόρου πλάκας και κατόπιν, οι αρνητικές, με τη μέθοδο των σωλήνων (Thatcher F.S., 1968).

Υπολογισμός αποτελέσματος: Ο αριθμός των αποικιών της προκαταρκτικής δοκιμής που θεωρήθηκαν ως *S.aureus*, πολλαπλασιάζεται επί το ποσοστό θετικότητας που προέκυψε από τη δοκιμή της πηκτάσης και το γινόμενο πολλαπλασιάζεται επί 5 και επί το βαθμό αραιώσεως. Το τελικό γινόμενο εκφράζει τον αριθμό των σταφυλόκοκκων που παράγουν πηκτάση ανά g ή ml τροφίμου. Εφόσον έχουν ενοφθαλμιστεί περισσότερα από ένα τρυβλία petri από κάθε αραιώση, εξάγεται ο μέσος όρος.

2.3 Ανίχνευση Εντεροτοξινών σε τρόφιμα

Η ποσότητα μιας εντεροτοξίνης που παράγεται σ' ένα τρόφιμο κατά την ανάπτυξη ενός εντεροτοξινογόνου στελέχους *S.aureus*, εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως είναι το στέλεχος, το είδος του τροφίμου, οι συνθήκες συντηρήσεως κλπ. Στις περισσότερες όμως περιπτώσεις η ποσότητα της εντεροτοξίνης είναι της τάξεως των 0,01 -0,05μg/g. Επειδή όμως η ευαισθησία των διαφόρων μεθόδων ανοσοδιαχύσεως, στην καλύτερη περίπτωση, δεν υπερβαίνει το 0,1μg/ml, είναι απαραίτητα να γίνεται παραλαβή της εντεροτοξίνης από αρκετή ποσότητα τροφίμου (50-100g) και παράλληλα συμπύκνωσή της, ώστε στο τελικό υλικό που εξετάζεται η συγκέντρωσή της να είναι 50 έως 100 φορές μεγαλύτερη από

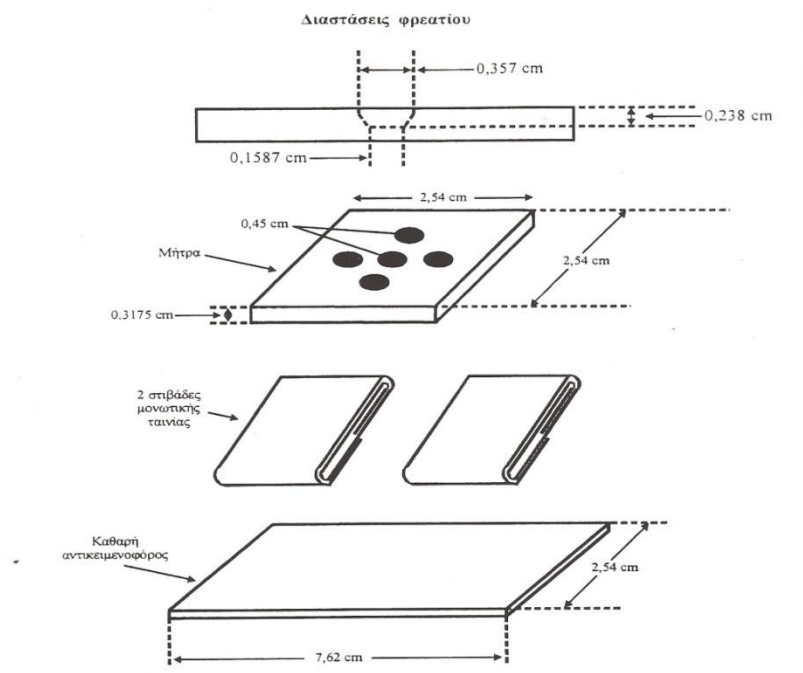
εκείνη του τροφίμου. Έτσι θα είναι δυνατή η ανίχνευση με μια από τις μεθόδους ανοσοδιαχύσεως.

Οι μέθοδοι για την ανίχνευση εντεροτοξινών στα τρόφιμα είναι αρκετά πολύπλοκες και απαιτούν χρόνο 7-10 ημερών, διότι οι αντίστοιχες τεχνικές αποσκοπούν:

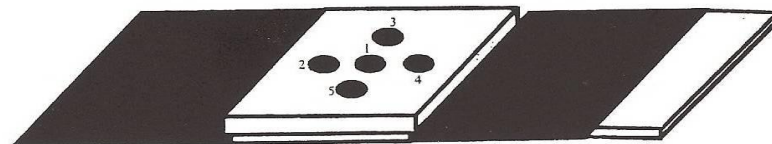
A) Στην παραλαβή της εντεροτοξίνης από ποσότητα περίπου 100g τροφίμου και στην απομάκρυνση όλων των μη διαλυτών συστατικών

B) Στη συμπύκνωση του υλικού και

Γ) Στην απομάκρυνση από το υλικό των διαλυτών πρωτεϊνών (συνήθως με χρωματογραφία στήλης



Εικόνα 10. Σχεδιάγραμμα των υλικών τα οποία χρειάζονται για την ανίχνευση εντεροτοξινών με ανοσοδιάχυση σε αντικειμενοφόρες πλάκες (micro-slide test)



Εικόνα 11. Διάταξη αντιδραστηρίων στην ανοσοδιάχυση επί αντικειμενοφόρου

A. Διδύναμο σύστημα

1. μείγμα 2 αντι-ορών (π.χ. αντι-A και αντι-B)
2. υλικό για εξέταση
3. εντεροτοξίνη μάρτυρας (εντ.Α)
4. υλικό για εξέταση
5. εντεροτοξίνη μάρτυρας (εντ.Β)

A. Μονοδύναμο σύστημα

1. αντι-ορός (π.χ. αντι-A)
2. υλικό για εξέταση
- 3,5. εντεροτοξίνη μάρτυρας ομόλογου ορού (εντ.Α)
4. υλικό για εξέταση

2.3.1 Μέθοδος Casman και Bennett, 1965 (Γενική μέθοδος) (Casman SP, 1965)

1. Ομοιογενοποιούνται 20g τροφίμου με 100ml 0,2M NaCl για 3min σε ηλεκτρικό ομοιογενοποιητή (mixer), ρυθμίζεται το pH σε 7,4-7,5 με 1N NaOH και φυγοκεντρείται για 10min σε 32.000xg περίπου σε ψυχωμένη φυγόκεντρο. Εάν η συγκέντρωση εντεροτοξίνης στο τρόφιμο είναι μικρή χρησιμοποιούνται 100g τροφίμου και 500ml 0,2M NaCl.

2. Συγκεντρώνεται το επιπλέον υγρό και το ίζημα ομογενοποιείται και πάλι με 50ml 0,2N NaCl και φυγοκεντρείται όπως προηγουμένως.

3. Ενώνεται η υδάτινη φάση των δύο φυγοκεντρήσεων, τοποθετείται σε σάκο κυτταρίνης (διαμέτρου πόρων 48 Å) και τοποθετείται σε διάλυμα Polyethylene –glycol M.W. 20.000 (Carbowax 20M) σε θερμοκρασία 4-7 °C μέχρι να ελαττωθεί ο όγκος στο ¼ του αρχικού (περίπου 20-25ml). Ο σάκος εκπλένεται εξωτερικά με αποσταγμένο νερό, συλλέγεται το συμπύκνωμα και εκπλένονται τα ιζήματα του σάκου με 0,2M NaCl (2-3 εκπλύσεις με 2ml 0,2M NaCl) και ενώνονται με το υπόλοιπο συμπύκνωμα. Ρυθμίζεται το pH σε 7,5 με 1N NaOH και το υλικό φυγοκεντρείται όπως στην παράγραφο 1.

4. Συγκεντρώνεται το επιπλέον υγρό, αραιώνεται με 20 όγκους 0,01M φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα pH=6,0 και ρυθμίζεται το pH στο 6,0 με 0,01M H₃PO₄. Το υλικό σ' αυτή τη φάση είναι έτοιμο να περάσει από στήλη CM-cellulose.

5. Ποσότητα 1g CM-cellulose (Whatman powder, CM70, 0,7meq/g capacity) εναιωρείται σε 100ml 0,01M ρυθμιστικό φωσφορικό διάλυμα (pH=6,0). Ρυθμίζεται το pH σε 6,0 με 1N NaOH και τοποθετείται σε στήλη εσωτερικής διαμέτρου 2cm και ύψους 40cm στον πυθμένα της οποίας υπάρχει στρώμα από υαλοβάμβακα. Τα σωματίδια αφήνονται να σχηματίσουν στήλη (ύψους 2cm περίπου) στο επάνω μέρος της οποίας τοποθετείται δεύτερο στρώμα από υαλοβάμβακα ώστε να μη διαταράσσεται η στήλη κατά τις εκπλύσεις. Η στήλη εκπλένεται με 100-200ml 0,01M ρυθμιστικό φωσφορικό διάλυμα pH=6,0. Το έκπλυμα πρέπει να έχει pH=6,0. Εάν όχι, γίνεται και άλλη έκπλυση με το ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα.

6. Το υλικό –δείγμα τοποθετείται στη στήλη και αφήνεται να περάσει σ' ένα ρυθμό ροής 30-40 σταγόνες/min. Ακολουθεί έκλουση της στήλης με 100ml 0,01M φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα pH=6,0 με τον ίδιο όπως παραπάνω ρυθμό ροής σταγόνων.

7. Η τοξίνη παραλαμβάνεται με 150ml ρυθμιστικού διαλύματος (0,2M NaCl και φωσφορικό ρυθμιστικό pH=7,2) με ρυθμό ροής 30-40 σταγόνες/min.

8. Το έκλουσμα από τη στήλη CM-cellulose τοποθετείται σε σάκο οσμωτικής διαλύσεως από κυτταρίνη και συμπυκνώνεται μέχρι όγκου 5-10ml σε διάλυμα 30%PVP. Στο σημείο αυτό το υλικό του σάκου περιορίζεται στο ένα άκρο, εκπλένεται το υπόλοιπο τμήμα του με 2-3ml φυσιολογικού ορού, το έκλυμα ενώνεται με το υπόλοιπο, περιορίζεται στο ένα άκρο του σάκου και συνεχίζει η συμπύκνωση μέχρι ξηρότητας. Στη συνέχεια ο σάκος εκπλένεται εξωτερικά με φυσιολογικό ορό (0,85% NaCl) και το περιεχόμενό του παραλαμβάνεται με 1ml 0,02M pH=7,2 Sodium Phosphate Saline Buffer.

Το τελικό συμπύκνωμα εξετάζεται για την ύπαρξη εντεροτοξίνης με την μικρομέθοδο ανοσοδιαχύσεως σε αντικειμενοφόρο.

2.3.2 Μέθοδος Read για το γάλα (Read RB JR, 1965)

1. Παίρνεται ποσότητα 100ml γάλακτος και ρυθμίζεται το pH του σε 4,5 με 6N HCl. Οι πρωτεΐνες που διαχωρίστηκαν απομακρύνονται με φυγοκέντρηση σε 23.000-25.000 x g περίπου σε θερμοκρασία 4⁰C για 20min.

2. Το επιπλέον υγρό (ορός) διηθείται σε χωνί Buchner και διηθητικό χαρτί Whatman No 42 με τη βοήθεια του κενού.

3. Το διήθημα αναμιγνύεται με CHCl₃ (ένα μέρος CHCl₃ με τέσσερα μέρη διηθήματος), ανακινείται ισχυρά και φυγοκεντρείται σε 45.000x g περίπου και θερμοκρασία 4⁰C για 20min. Η υδατίνη φάση εκχυλίζεται ακόμη μία φορά με CHCl₃ και φυγοκεντρείται.

4. Το επιπλέον διαυγές υγρό τοποθετείται σε σάκο κυτταρίνης, διαμέτρου 2cm περίπου με μέγεθος πόρων 48Å και συμπυκνώνεται κατά 95% με τη βοήθεια διαλύματος PVP (Polyvinylpyrrolidone) 30% σε θερμοκρασία 5⁰C.

5. Το συμπύκνωμα (1-2ml περίπου) παίρνεται από το σάκο κυτταρίνης, ρυθμίζεται το pH του σε 4,5 με HCl και φυγοκεντρείται όπως στην παρ. 3. Παίρνεται το επιπλέον υγρό, ρυθμίζεται το pH του σε 7,2 με 0,1N NaOH και θερμαίνεται στους 50⁰C για 10min.

6. Μετά τη θέρμανση, φυγοκεντρείται το διήθημα, εκχυλίζεται με CHCl₃, φυγοκεντρείται και το επιπλέον υγρό εξετάζεται για την ύπαρξη εντεροτοξίνης με μία από τις μεθόδους που αναπτύχθηκαν προηγουμένως.

Με τη μέθοδο αυτή είναι δυνατόν να ανιχνευτεί ποσότητα εντεροτοξίνης της τάξεως των 0,02-0,03μg/ml γάλακτος.

2.3.3 Μέθοδος Zehren και Zehrsn (1968) για τους τυρούς (τροποποίηση από Μάντη, 1973) (Zehren VL, 1968) (Μάντης Α. , 1973)

1. Παίρνονται 100g τυρού και ομοιογενοποιούνται με 400ml 0,2M φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα pH=7,4 σε ηλεκτρικό ομοιογενοποιητή για 3min. Ρυθμίζεται το pH του ομοιογενοποιημένου υλικού σε 4,5 με 6N HCl και φυγοκεντρείται σε ψυχωμένη φυγόκεντρο στις 10.000περίπου rpm (33.000 x g). Συγκεντρώνεται η υδάτινη φάση και το ίζημα ομοιογενοποιείται με 100ml ρυθμιστικού διαλύματος. Ρυθμίζεται το pH σε 4,5, φυγοκεντρείται και η υδάτινη φάση ενώνεται με αυτή από την πρώτη φυγοκέντρωση. Το φυγοκέντημα διηθείται με χαρτί Whatman N₀ 42, τοποθετείται σε σάκο κυτταρίνης με διάμετρο πόρων 48Å (dialysis tubing) και συμπυκνώνεται σε διάλυμα PVP μέχρι να ελαττωθεί ο όγκος του σε 50ml περίπου.
2. Το συμπύκνωμα φυγοκεντρείται σε 30.000 -32.000 x g σε ψυχωμένη φυγόκεντρο. Συγκεντρώνεται το επιπλέον υγρό και εκχυλίζεται 2 φορές με CHCl₃ (αναλογία όγκων 4:1) και κάθε φορά φυγοκεντρείται σε 35.000 x g περίπου.
3. Η διαυγής υδάτινη φάση που παίρνεται, τοποθετείται σε θήκη κυτταρίνης και εξισορροπείται οσμωτικά με 20πλάσιο όγκο αποσταγμένου νερού σε θερμοκρασία 4⁰C για 24 ώρες για να απομακρυνθούν τα άλατα. Στη συνέχεια το υλικό συμπυκνώνεται σε όγκο 50ml περίπου, αραιώνεται σε όγκο 100ml με 0,01M φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα pH=6,0 , ρυθμίζεται το pH του σε 6,0 με 0,01M διάλυμα H₃PO₄ και είναι έτοιμο για τη δίοδο του από τη στήλη της χρωματογραφίας.
4. Ζυγίζονται 2g Carboxymethylcellulose (Whatman CM 22 0,6meq/g capacity) και εναιωρούνται σε 100ml 0,01M φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος pH=6,0. Ρυθμίζεται το pH σε 6,0 με 0,1N NaOH και το εναιώρημα τοποθετείται σε γυάλινη στήλη διαμέτρου 2cm και ύψους 40cm. Η στήλη εξισορροπείται σε pH 6,0 με 2-3 εκπλύσεις με 100ml φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος (0,01M, pH=6,0) η κάθε μία.
5. Μετά την προετοιμασία της στήλης διαβιβάζεται το υλικό, που προετοιμάστηκε όπως αναφέρεται στην παρ.3, με ρυθμό ροής 30-40 σταγόνες/min. Ακολουθεί έκλουση της στήλης με 100ml ρυθμιστικού διαλύματος 0,01M pH=6,0 και αμέσως μετά η παραλαβή της τοξίνης με 150ml ρυθμιστικού διαλύματος (0,2M NaCl σε 0,2M Sodium Phosphate Buffer pH=7,4) και με ρυθμό ροής 30-40 σταγόνες/min.
6. Το έκλουσμα τοποθετείται σε σάκο κυτταρίνης και συμπυκνώνεται μέχρι ξηρότητας σε διάλυμα PVP. Οι σάκοι εκπλένονται εξωτερικά με αποσταγμένο νερό και το περιεχόμενό

τους παίρνεται με 2 εκπλύσεις η κάθε μία από τις οποίες γίνεται με 0,5ml 0,02M Sodium Phosphate Buffered Saline pH=7,2 (A-14). Το τελικό συμπύκνωμα εάν δεν είναι διαυγές φυγοκεντρείται σε 45.000 x g περίπου και εξετάζεται για την ύπαρξη εντεροτοξίνης.

Η μέθοδος αποδίδει εξίσου ικανοποιητικά εάν αντί για CM-cellulose χρησιμοποιηθεί Amberlite CG-50 (100-200 mesh) αφού βέβαια προηγουμένως προετοιμαστεί κατάλληλα. (Η προετοιμασία του Amberlite γίνεται με τη μέθοδο του Reiser (Reiser R, 1974).

2.3.4 Μέθοδος Reiser για τυρούς και άλλα τρόφιμα (Reiser R, 1974)

Η μέθοδος αποτελεί παραλλαγή των προηγούμενων και μειώνει τον χρόνο που απαιτείται για τη λήψη αποτελέσματος σε 3 ημέρες.

1. Προετοιμασία ρητίνης CG-50 Amberlite:

A) Ζυγίζονται 100g CG-50 και εναιωρούνται σε 1,5l αποσταγμένο νερό

B) Ρυθμίζεται το pH του εναιωρήματος σε 12 με 5N NaOH ενώ αναδεύεται συνέχεια για 1 ώρα

Γ) Έκπλυση της ρητίνης με αποσταγμένο νερό αρκετές φορές και ρύθμιση του pH της τελικά σε 2,0 με 6N HCl ενώ αναδεύεται συνεχώς για 1 ώρα.

Δ) Έκπλυση με αποσταγμένο νερό αρκετές φορές και ρύθμιση του pH σε 5,6 με 0,005M φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα pH=5,6. Εάν το pH είναι μικρότερο από 5,4 ρυθμίζεται σε 5,6 με 5N NaOH. Συνήθως το pH ρυθμίζεται σε 5,8 -5,9 , γιατί όταν η ρητίνη παραμένει στο ψυγείο για αρκετό διάστημα μειώνεται το pH της.

2. Εξαγωγή της εντεροτοξίνης από το τρόφιμο:

A) Ομοιογενοποιούνται 100g τροφίμου με 140ml αποσταγμένου νερού

B) Ρυθμίζεται το pH του σε 4,5-5,0 με 1N HCl

Γ) Φυγοκέντρωση σε 27.000 x g σε θερμοκρασία 4°C για 20min

Δ) Συλλογή του επιπλέοντος υγρού, ρύθμιση του pH του σε 7,5 με 5N NaOH και εκχύλιση με CHCl₃ (αναλογία CHCl₃ 10%) για 3-5min με συνεχή ανάδευση με τη βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα.

Ε) Φυγοκέντρωση (όπως στην παρ.γ), λήψη υδάτινης φάσεως, ρύθμιση pH σε 4,5 με 6N HCl και φυγοκέντρωση (όπως στην παρ.γ)

Στ) Συλλογή του επιπλέοντος υγρού, ρύθμιση του pH του σε 7,5 με 5N NaOH, φυγοκέντρωση (όπως στην παρ.γ) και συγκέντρωση του επιπλέοντος υγρού.

3. Καθαροποίηση εντεροτοξίνης:

A) Αναμιγνύονται 20ml Amberlite CG-50 (που προετοιμάστηκε όπως στο 2.3.4) και αφού παραμείνει σε ηρεμία για να καθιζήσει, με 100ml εκχυλίσματος τροφίμου που προετοιμάστηκε όπως στο 2.3.4

B) Ανάδευση με μαγνητικό αναδευτήρα για 1 ώρα στους 4⁰C

Γ) Διήθηση σε χωνί Buchner με κοινό διηθητικό χαρτί και εφαρμογή κενού. Έκπλυση της ρητίνης με 200ml 0,015M φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα pH=5,9 που περιέχει 0,09% NaCl

Δ) Εναιώρηση της ρητίνης σε 30ml 0,15M Na₂HPO₄ +0,9% NaCl και ρύθμιση του pH σε 6,8

Ε) Ανάδευση για 45min σε θερμοκρασία 4⁰C και διήθηση σε χωνί Buchner με κοινό διηθητικό χαρτί και εφαρμογή κενού

Στ) Έκλυση της ρητίνης με μικρή ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος

Ζ) Συλλογή του διηθήματος των φάσεων ε και στ και προσθήκη 1g άγαρ υψηλής καθαρότητας. Συνεχής ανάδευση για 1 ώρα σε θερμοκρασία 5⁰C

Η) Απομάκρυνση του άγαρ με διήθηση σε χωνί Buchner και συλλογή διηθήματος.

4. Συμπύκνωση εντεροτοξίνης :

Το διήθημα τοποθετείται σε σάκο κυτταρίνης (διάμετρος 2cm, πόρος 48Å) και συμπυκνώνεται σε διάλυμα 50% Carbowax 20-M, σε θερμοκρασία 4⁰C μέχρι ξηρότητας. Παραλαμβάνεται ο σάκος, τοποθετείται για 10min σε νερό θερμοκρασίας 40⁰C περίπου και στη συνέχεια παραλαμβάνεται το ξερό περιεχόμενο με τρεις εκπλύσεις αποσταγμένου νερού, συνολικού όγκου έως 5ml. Το έκπλυμα εκχυλίζεται με CHCl₃ και φυγοκεντρείται σε 35.000 x g περίπου. Παραλαμβάνεται η υδάτινη φάση, λυοφιλοποιείται και το λυοφιλοποιημένο υλικό διαλύεται με 0,2ml υδατικού διαλύματος 1% θρυψίνης (Type II Crude, Sigma Chemical Co.) και παραμένει επί 30 min σε θερμοκρασία δωματίου προτού να εξεταστεί με τη μικρομέθοδο ανοσοδιαχύσεως επί αντικειμενοφόρου. Το παρασκεύασμα ανοσοδιαχύσεως επωάζεται στους 37⁰C για 24 ώρες.

2.4 Απομόνωση και ταυτοποίηση Σαλμονέλων

2.4.1 Γενικά

Μέχρι σήμερα δεν έχει βρεθεί μέθοδος που να είναι αρκετά ευαίσθητη ώστε να μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την απομόνωση όλων των ορότυπων των σαλμονέλων από τα διάφορα είδη τροφίμων. Ανεξάρτητα όμως από τη γενική αυτή διαπίστωση και τις επιμέρους διαφορές στις τεχνικές και τα υποστρώματα, η μεθοδολογία που εφαρμόζεται σήμερα για την αναζήτηση των σαλμονέλων στα διάφορα τρόφιμα, περιλαμβάνει δύο στάδια (Thatcher F.S., 1968):

1. Στο πρώτο στάδιο γίνεται η απομόνωση των βακτηριδίων με τη χρησιμοποίηση:

- A) Υγρών μη εκλεκτικών εμπλουτιστικών υποστρωμάτων
- B) Υγρών εκλεκτικών εμπλουτιστικών υποστρωμάτων
- Γ) Στερεών εκλεκτικών υποστρωμάτων

Τα εμπλουτιστικά μη εκλεκτικά υποστρώματα τα οποία χρησιμοποιούνται σκοπίμως δεν περιέχουν ανασταλτικούς παράγοντες για την ανάπτυξη οποιουδήποτε βακτηρίου. Τα υποστρώματα αυτά βοηθούν τα βακτήρια να ανανήψουν από μία κατάσταση τραυματισμού ή φυσιολογικής αδράνειας με την οποία υφίστανται σε τρόφιμα τα οποία υπέστησαν θερμική κατεργασία, αποξήρανση, αφυδάτωση, κατάψυξη, επίδραση εξιονιζουσών ακτινοβολιών, περιέχουν συντηρητικά, έχουν χαμηλό pH ή μεγάλη οσμωτική πίεση.

Έτσι τα μη εκλεκτικά εμπλουτιστικά υποστρώματα βοηθούν τα βακτήρια να ξεπεράσουν την κατάσταση του τραυματισμού ή της φυσιολογικής τους αδράνειας προτού υποστούν την επίδραση των τοξικών παραγόντων που είναι ενσωματωμένοι στα εκλεκτικά εμπλουτιστικά υποστρώματα και οι οποίοι θα μπορούσαν να αποβούν καταστρεπτικοί για μικροβιακά κύτταρα μειωμένης αντιστάσεως.

Είναι ζωτικής σημασίας να ρυθμιστεί το pH των υποστρωμάτων αυτών εκ νέου στο άριστο για την ανάπτυξη των σαλμονέλων, μετά την προσθήκη του τροφίμου-ενοφθαλμίσματος.

Τα εκλεκτικά εμπλουτιστικά υποστρώματα χρησιμοποιούνται για να ευνοήσουν τον πολλαπλασιασμό των σαλμονέλων σε βάρος άλλων βακτηριδίων όπως των κολοβακτηριοειδών, των πρωτέων και των ψευδομονάδων τα οποία συνήθως υπερκαλύπτουν τις σαλμονέλες, ιδίως όταν βρίσκονται σε μεγαλύτερο αρχικό πληθυσμό μέσα στα τρόφιμα.

Τέλος τα στερεά εκλεκτικά υποστρώματα περιέχουν εκλεκτικούς παράγοντες οι οποίοι δρουν με τον τρόπο που περιγράφεται στην προηγούμενη παράγραφο, καθώς και δείχτες που μας επιτρέπουν να διαχωρίσουμε τις αποικίες που κατά τεκμήριο προέρχονται από τις σαλμονέλες.

2. Στο δεύτερο στάδιο γίνεται η ταυτοποίηση των βακτηριδίων που απομονώθηκαν με τη χρησιμοποίηση:

A) Βιοχημικών δοκιμών

Bi) Πολυδύναμων αντι-O και αντι-H ορών

Bii) Μονοδύναμων αντι-O, αντι-H και αντι-Vi ορών

Γ) Βακτηριοφάγων σε ορισμένες περιπτώσεις

Απαιτούμενα Υλικά

1. Nutrient Broth (B-71)
2. Buffered Peptone Water (B-15)
3. Lactose Broth (B-41)
4. Trypticase Soy Yeast Extract Broth (B-106)
5. Selenite Cystine Broth (B-92)
6. Moeller –Kauffman Tetrathionate Broth (B-99)
7. Brilliant Green Agar ή BG Agar (B-9)
8. Brilliant Green Sulfadiazine Agar ή BGS Agar (B-10)
9. Salmonella Shigella Agar ή SS Agar (B-88)
10. Bismuth Sulfite Agar (B-5)
11. Mc Conkey Agar (B-49)
12. Nutrient Agar (κεκλιμένο) (B-70)
13. Triple Sugar Iron Agar ή TSI Agar (B-104)
14. Lysine Iron Agar ή LI Agar (B-48)
15. Brain Heart Infusion Broth ή BHI Broth (B-7)
16. SSR Medium (B-94) ή Christensen's Urea Agar (B-19)
17. Trypticase Soy Agar ή TSA (B-107α)
18. ONPG Broth (B-73)
19. Phenylalanine Agar (B-79)
20. Motility Test Medium (B-59)
21. Decarboxylase Medium (B-24)
22. KCN Broth (B-38)

23. Peptone Water (B-77) ή Tryptone Water (B-109)
24. Buffered Glucose Broth (B-13)
25. Simmons Citrate Agar (B-93)
26. Malonate Broth (B-51)
27. Nutrient Gelatin (B-68)
28. Πολυδύναμοι αντι-Ο και αντι-Η οροί σαλμονέλων
29. H Broth (B-35α)
30. Φορμολούχος φυσιολογικός ορός (A-19)
31. Οι απαραίτητοι για τις δοκιμές ζυμώσεως σακχάρων υδατάνθρακες, τα αμινοξέα ορνιθίνη, αργινίνη και λυσίνη καθώς και αντιδραστήρια εκτιμήσεως των βιοχημικών δοκιμών.

2.4.2 Απομόνωση σαλμονέλων (FDA, 1976)

Φάση μη εκλεκτικού εμπλουτισμού (προεμπλουτιστική)

A. Μέθοδος για κρέατα, ζωικές ουσίες, προϊόντα από αδένες και ιχθυάλευρα.

1. Προϊόντα που υπέστησαν θερμική κατεργασία ή αφυδάτωση:

α) Ζυγίζονται ασήπτως 25g δείγματος σε ειδική φιάλη ομοιογενοποίησης.

β) Προσθέτονται 225ml Buffered Peptone Water ή Trypticase Soy Yeast Extract Broth ή Nutrient Broth και ακολουθεί ομοιογενοποίηση για 2min στις 8.000rpm σε ηλεκτρικό ομοιογενοποιητή.

γ) Μεταφορά σε ευρύστομη αποστειρωμένη φιάλη.

δ) Έλεγχος του pH με τη βοήθεια ειδικής ταινίας και εφόσον είναι χαμηλότερο από 6,6 ρυθμίζεται σε $6,8 \pm 0,1$ με τη βοήθεια στείρου διαλύματος N NaOH.

ε) Προσθήκη 2,2ml Tergitol Anionic 7 (που παρέμεινε για 15min σε διελαύνοντα ατμό) ή στείρου Triton X-100, για τη γαλακτωματοποίηση των λιπών.

στ) Επώαση στους 35°C για 24 ± 2 ώρες.

ζ) Η μέθοδος συνεχίζεται όπως περιγράφεται στο 2.4.2.2 και 2.4.2.3.

2. Νωπά ή πολύ μολυσμένα προϊόντα

α) Ζυγίζονται 25g δείγματος σε δύο ειδικές αποστειρωμένες φιάλες ομοιογενοποίησης.

β) Προσθέτονται 225ml Selenite Cystine Broth στη μία και 225ml Moeller- Kauffman Tetrathionate Broth στην άλλη. Ακολουθεί ομοιογενοποίηση για 2min στις 8.000rpm σε ηλεκτρικό ομοιογενοποιητή.

γ) Μεταφορά σε ευρύστομη στείρα φιάλη των 500ml.

δ) Επώαση στους 35⁰C για 24± 2 ώρες.

ε) Η μέθοδος συνεχίζεται όπως περιγράφεται στο 2.4.2

B) Μέθοδος για παστεριωμένα αυγά, παστεριωμένα κατεψυγμένα αυγά, έτοιμα μίγματα (για κέικ, μπισκότα, ψωμί, κουλούρια) και παιδικές τροφές.

1. Ζυγίζονται ασήπτως 25g δείγματος σε μια ευρύστομη αποστειρωμένη φιάλη με βιδωτό πώμα.

2. Προσθέτονται 225ml Buffered Peptone Water ή Trypticase Soy Yeast Extract Broth ή Nutrient Broth ή Lactose Broth. Εάν το προϊόν είναι σε μορφή σκόνης τότε προσθέτουμε τμηματικά το ζωμό και η ομοιογενοποίηση γίνεται με τη βοήθεια στείρας ράβδου ή σπάτουλας

3. Η φιάλη παραμένει σε θερμοκρασία δωματίου για 60min

4. Αναταράσσεται η φιάλη, ελέγχεται το pH με τη βοήθεια ταινίας και εάν χρειάζεται ρυθμίζεται στο 6,8±0,1 με τη βοήθεια αποστειρωμένου διαλύματος N NaOH ή N HCl

5. Χαλαρώνεται το πώμα της φιάλης και επώάζεται στους 35⁰C για 24±2 ώρες

6. Η μέθοδος συνεχίζεται όπως 2.4.2

Γ) Μέθοδος για μη παστεριωμένα ή κατεψυγμένα προϊόντα αυγών

Όπως και στη μέθοδο 2.4.2 (B). Ελέγχεται και ρυθμίζεται το pH εφόσον είναι απαραίτητο στο 6,8±0,2

Δ) Μέθοδος για τρόφιμα που περιέχουν αυγά (χυλοπίτες, πάστες κλπ)

Όπως και στη μέθοδο 2.4.2. (A). Παραλείπεται η διαδικασία της παραγράφου ε.

Ε) Μέθοδος για πλήρες γάλα σε σκόνη και αποβουτυρωμένο γάλα σε σκόνη

1. Ζυγίζονται ασήπτως 25g δείγματος σε μια αποστειρωμένη φιάλη

2. Προσθέτονται 250ml αποστειρωμένου αποσταγμένου νερού και ομογενοποιείται πολύ καλά το περιεχόμενο της φιάλης

3. Ελέγχεται με ειδική ταινία το pH και εφόσον είναι χαμηλότερο από 6,6 ρυθμίζεται στο 6,8±0,2 με αποστειρωμένο διάλυμα N NaOH

4. Προσθέτονται 0,5ml υδατικού διαλύματος Brilliant green 1% και ομογενοποιείται καλά το περιεχόμενο της φιάλης

5. Επώαση στους 35⁰C για 24±2 ώρες

6. Η μέθοδος συνεχίζεται όπως περιγράφεται στο 2.4.2

Φάση απομονώσεως

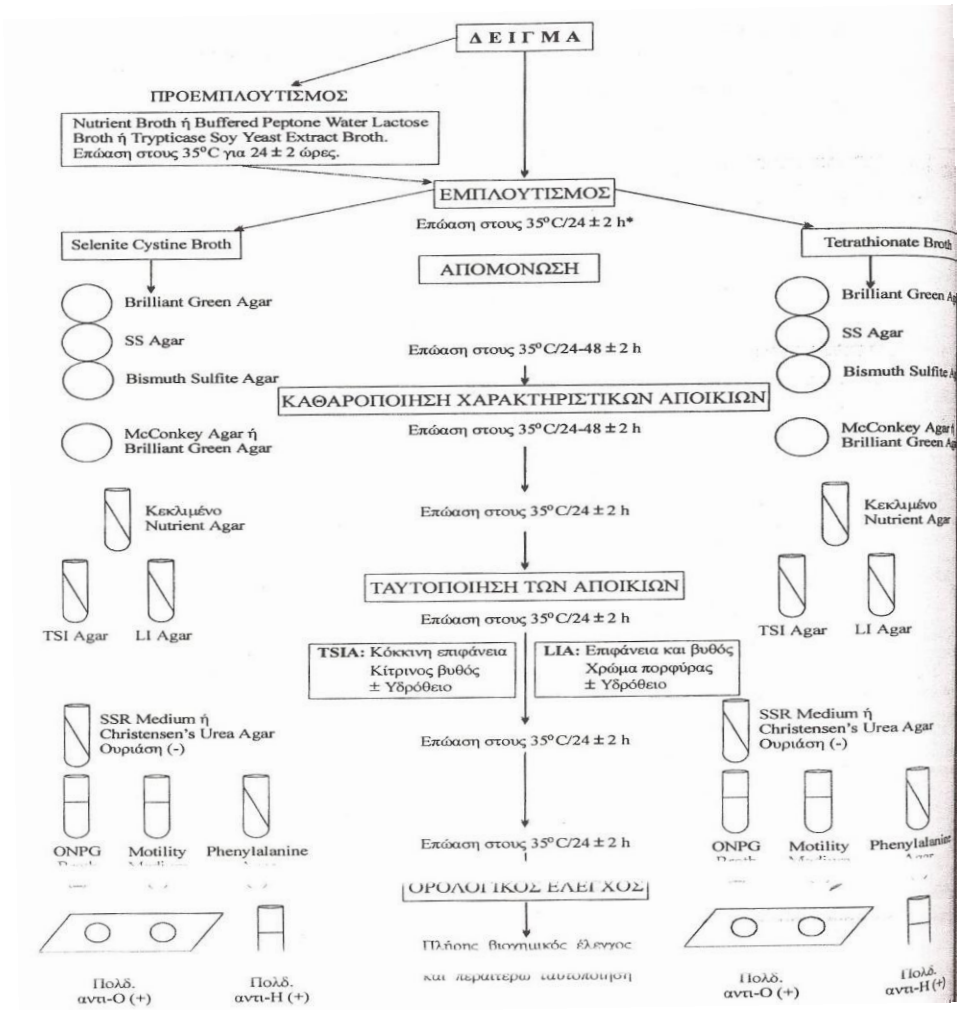
Τόσο από τις καλλιέργειες σε Selenite Cystine Broth όσο και από τις καλλιέργειες σε Tetrathionate Broth της φάσεως 2.4.2.A, γίνεται επιφανειακή σπορά, με τη βοήθεια κρίκου και με τρόπο ώστε να αναπτυχθούν απομονωμένες αποικίες, στα στερεά εκλεκτικά υποστρώματα Brilliant Green Agar (ή Brilliant Green Sulfadiazine Agar), *Salmonella Shigella* Agar και Bismuth Sulfite Agar.

Επώαση στους 35⁰C για 24± 2 ώρες

Στο υπόστρωμα Brilliant Green Agar οι αποικίες των σαλμονέλων είναι άχρωμες ή ροζ, ημιδιαφανείς ή αδιαφανείς ενώ το υπόστρωμα που τις περιβάλλει είναι ροζ προς το κόκκινο. Ορισμένες σαλμονέλες σχηματίζουν διαφανείς πράσινες αποικίες όταν περιβάλλονται από αποικίες βακτηριδίων που ζυμώνουν τη λακτόζη ή τη σακχαρόζη, δεδομένου ότι τα βακτηρίδια που ζυμώνουν τους προηγούμενους υδατάνθρακες σχηματίζουν αποικίες και ζώνες που έχουν κιτρινοπράσινο ή πράσινο χρώμα. Ποσοστό μικρότερο από 1% των σαλμονέλων είναι άτυπες με την έννοια ότι ζυμώνουν τη λακτόζη και σχηματίζουν κιτρινοπράσινες ή πράσινες αποικίες.

Στο υπόστρωμα SS Agar οι αποικίες των σαλμονέλων είναι άχρωμες ή έχουν ανοικτό ροζ χρώμα, είναι αδιαφανείς, ημιδιαφανείς, ή διαφανείς, ενώ πολλά στελέχη σχηματίζουν αποικίες με μαύρο κέντρο (παραγωγή H₂S).

Στο υπόστρωμα Bismuth Sulfite Agar οι αποικίες των σαλμονέλων έχουν καφέ ή μαύρο χρώμα και σε ορισμένες περιπτώσεις έχουν μεταλλική απόχρωση. Το υπόστρωμα γύρω από την αποικία αρχικά έχει καφέ χρώμα που μετατρέπεται σε μαύρο με την πρόοδο της επώσεως. Ορισμένα στελέχη σχηματίζουν πράσινες αποικίες ενώ το υπόστρωμα που τις περιβάλλει έχει κάπως πιο σκοτεινή απόχρωση από το υπόλοιπο.



Εικόνα 12. Σχεδιάγραμμα απομονώσεως σαλμονέλων

2.4.3 Ταυτοποίηση σαλμονέλων

Α. Προκαταρκτικός βιοχημικός έλεγχος

1. Τα στελέχη της φάσης απομόνωσης ενοφθαλμίζονται σε TSI Agar και σε LI Agar. Ο ενοφθαλμισμός γίνεται με την ίδια ακίδα που μεταφέρει μέρος από την αποικία τόσο στην επιφάνεια όσο και στο βυθό του TSI και LI Agar.

Επώαση: Στους 35°C για 24± 2ώρες και για τα δύο υποστρώματα. Εφόσον χρησιμοποιούμε σωλήνες με βιδωτά πώματα, τα πώματα παραμένουν χαλαρά για να εξασφαλιστεί αερόβιο περιβάλλον και να αποφευχθεί η υπέρμετρη παραγωγή H₂S.

Όταν αναπτύσσονται σαλμονέλες στο TSI Agar ο βυθός έχει κίτρινο χρώμα (όξινο pH) και η κεκλιμένη επιφάνεια κόκκινο (αλκαλικό pH). Επίσης μπορεί να εμφανιστεί και

μαύρο χρώμα εάν σχηματίζεται H_2S . (Τόσο οι σωλήνες που εμφανίζουν μαύρο χρώμα όσο και εκείνοι που δεν εμφανίζουν, κατακρατούνται για τις παραπέρα δοκιμές).

Όταν αναπτύσσονται σαλμονέλες στο LIA όλο το υπόστρωμα έχει χρώμα πορφύρας (αλκαλικό pH). Όταν σχηματίζεται H_2S ο βυθός του υποστρώματος έχει μαύρο χρώμα.

Οι αποικίες στο TSI Agar που δεν παρουσιάζουν τις χαρακτηριστικές αντιδράσεις των σαλμονέλων (συμπεριλαμβανόμενες και αυτές που σχηματίζουν κίτρινη λοξή επιφάνεια) δεν αποκλείονται από τις παραπέρα δοκιμές εφόσον δίνουν τις τυπικές αντιδράσεις των σαλμονέλων στο LI Agar. (Το LI Agar χρησιμοποιείται για την ανίχνευση των σαλμονέλων οι οποίες ζυμώνουν τη λακτόζη).

2. Τα στελέχη τα οποία θεωρήθηκαν σαν πιθανές σαλμονέλες με βάση τις χαρακτηριστικές αντιδράσεις τους στο TSI Agar και LI Agar, ενοφθαλμίζονται σε Christensen Urea Agar ή SSR Medium (δοκιμή ουρίας) και παράλληλα υποβάλλονται στη δοκιμή οξειδάσης.

Οι σαλμονέλες δεν παράγουν ουρίαση και δίνουν αρνητική τη δοκιμή οξειδάσης.

3. Τα στελέχη που επιλέχθηκαν με βάση τις παραπάνω δοκιμές ενοφθαλμίζονται σε ζυμό BHI και μετά από 18ωρη επώαση στους $35^{\circ}C$ υποβάλλονται στις δοκιμές:

- α) Παραγωγής β-γαλακτοσιδάσης (ONPG)
- β) Απαμινώσεως φαινυλαλανίνης
- γ) Κινητικότητας

Εάν τα αποτελέσματα των παραπάνω δοκιμών υποδηλώνουν πιθανή σαλμονέλα, τα στελέχη υποβάλλονται σε προκαταρκτικό ορολογικό έλεγχο με πολυδύναμους αντι-O και αντι-H ορούς.

B. Προκαταρκτικός ορολογικός έλεγχος

1. Οροσυγκόλληση με πολυδύναμο αντι-O ορό σε πλάκα (Thatcher F.S., 1968)

A) Στην επιφάνεια μιας αντικειμενοφόρου πλάκας ή στον πυθμένα ενός τρυβλίου σχηματίζονται με υαλογραφικό μολύβι τήξεως δύο κύκλοι διαμέτρου 1,5cm περίπου.

B) Με τη βοήθεια κρίκου 3mm μεταφέρεται μικρή ποσότητα (1/2 κρίκου) 24ωρης καλλιέργειας σε Nutrient Agar ή Trypticase Soy Agar και τοποθετείται στο ανώτερο σημείο κάθε κύκλου.

Γ) Τοποθετείται μία σταγόνα στείρου φυσιολογικού ορού στο κατώτερο σημείο του κάθε κύκλου

Δ) Με τη βοήθεια του κρίκου ή ακίδας αναμιγνύεται καλά η καλλιέργεια με τη σταγόνα του φυσιολογικού ορού, έτσι ώστε να σχηματιστεί ομοιογενές εναιώρημα.

Ε) Προσθήκη μιας σταγόνας αντι-Ο ορού στον ένα μόνο κύκλο και ανάμιξη με κρίκο ή ακίδα.

Στ) Ανακίνηση του μίγματος με κινήσεις της πλάκας μπρος –πίσω για 1min και παρατήρηση για ύπαρξη συγκολλησεως πάνω από μαύρο βυθό με τη βοήθεια πλάγιου φωτισμού.

Ζ) Η αντίδραση (συγκόλληση) αξιολογείται:

- **Ως θετική** όταν παρατηρείται συγκόλληση (έστω και ασθενής) μόνο στον κύκλο που προστέθηκε ο αντι-Ο ορός.
- **Ως αρνητική** όταν και στους δύο κύκλους δεν παρατηρείται συγκόλληση
- **Ως μη ειδική** όταν παρατηρείται συγκόλληση και στους δύο κύκλους.

2.Οροσυγκόλληση με πολυδύναμο αντι-Η ορό σε σωλήνες

Α) Προετοιμάζεται 24ωρη καλλιέργεια του στελέχους σε υπόστρωμα H-Broth ή Trypticase Soy Yeast Extract Broth.

Β) Αραιώνεται ο πολυδύναμος αντι-Η ορός (σύμφωνα με τις οδηγίες του παρασκευαστή) και ελέγχεται η δραστικότητά του επάνω σε καλλιέργεια μάρτυρα.

Γ) Αναμιγνύονται 5ml καλλιέργειας του στελέχους σε H-Broth με 2,5ml φορμολούχου φυσιολογικού ορού και αφήνεται να δράσει τουλάχιστον για μία ώρα.

Δ) Τοποθετούνται σε σωλήνες 10 x 75mm ή 13 x 100mm 0,5ml αραιωμένου αντι-Η ορού.

Ε) Προσθέτονται 0,5ml φορμολούχου καλλιέργειας που προετοιμάστηκε όπως στην παρ.Γ .

Στ) Προετοιμάζεται σωλήνας – μάρτυρας με 0,5ml φορμολούχου φυσιολογικού ορού και 5ml καλλιέργειας.

Ζ) Επώαση των μιγμάτων για 1 ώρα στους 50⁰C και παρατήρηση κάθε 15min. Στο τέλος του χρόνου σημειώνεται το αποτέλεσμα τους.

- **Θετικό:** Συγκόλληση μόνο στο σωλήνα με τον αντι-Η ορό
- **Αρνητικό:** Δεν παρατηρείται συγκόλληση και στους δύο σωλήνες
- **Μη ειδική συγκόλληση:** Συγκόλληση και στο σωλήνα-μάρτυρα.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Σε περίπτωση μη συγκολλησεως με αντι-Η ορούς η δοκιμή επαναλαμβάνεται αλλά με καλλιέργεια που τονώθηκε η κινητικότητά της ύστερα από 2-3 διόδους σε Motility Test Medium σε τρυβλία petri. Ενοφθαλμίζεται το στέλεχος σε ένα

σημείο του τρυβλίου με γραμμική βάθος 2mm νύξη και μετά την επώαση, γίνεται ανάκτηση του στελέχους από το πλέον απόμακρο σημείο διεισδύσεώς του στο υπόστρωμα.

Γ. Πλήρης βιοχημικός έλεγχος

1. Τα στελέχη τα οποία με βάση τις δοκιμές του προκαταρκτικού βιοχημικού ελέγχου (2.4.3) και την οροσυγκόλληση με τους πολυδύναμους αντι-Ο και αντι-Η ορούς θεωρήθηκαν ως προκαταρκτικώς θετικά για σαλμονέλες, υποβάλλονται σε πλήρη βιοχημικό έλεγχο και εξετάζονται ως προς τις δοκιμές του πίνακα 8.

2. Οι βιοχημικές δοκιμές γίνονται με χρήση των υποστρωμάτων, των αντιδραστηρίων και τεχνικών που αναφέρονται στο κεφάλαιο 2.5.5.

3. Εάν μετά τον πλήρη βιοχημικό έλεγχο το στέλεχος έχει χαρακτηριστικά σαλμονέλας, αποστέλλεται σε ειδικό κέντρο ταυτοποίησης σαλμονέλων για την πλήρη ταυτοποίηση του ορότυπου.

Πίνακας 8. Βιοχημικά χαρακτηριστικά του γένους Salmonella (Buchanan, 1974)

| | Salmonella |
|-----------------------------------------------|-------------------|
| Παραγωγή καταλάσης | + |
| Δοκιμή οξειδάσης | - |
| Δοκιμή β-γαλακτοσιδάσης | D |
| Απαμίνωση φαινυλαλανίνης | - |
| Ανάπτυξη παρουσία KCN | + |
| Παραγωγή H ₂ S σε TSI Agar | + |
| Παραγωγή ινδόλης | - |
| Παραγωγή ουριάσης | - |
| Δοκιμή MR | + |
| Δοκιμή VP | - |
| Χρησιμοποίηση κιτρικών αλάτων | + |
| Αναγωγή νιτρικών αλάτων | + |
| Χρησιμοποίηση μηλονικού Na | D |
| Υδρόλυση της ζελατίνης | D |
| Δοκιμή κινητικότητας | + |
| Αποκαρβοξυλίωση : | |
| Λυσίνης | + |
| Αργινίνης | + |
| Ορνιθίνης | + |
| Ζύμωση γλυκόζης* (παραγωγή αερίου στους 37°C) | + |
| Ζύμωση με παραγωγή μόνο οξέος της: | |
| Αδονιτόλης | - |
| Αραβινόζης | + |
| Δουλισιτόλης | D |
| Εσκουλίνης | - |
| Ινοσιτόλης | d |
| Λακτόζης | D |
| Μαλτόζης | + |
| Μαννιτόλης | + |

| | |
|------------|---|
| Ξυλόζης | + |
| Σαλικίνης | - |
| Σορβιτόλης | + |
| Σακχαρόζης | - |
| Τρεαλόζης | + |

D=Τα διάφορα είδη του ίδιου γένους δίνουν διαφορετικές αντιδράσεις

d = Τα διάφορα στελέχη του ίδιου είδους ή οροτύπου δίνουν διαφορετικές αντιδράσεις

·Η *S.flexneri* παράγει σε ορισμένες περιπτώσεις αέριο από τη γλυκόζη και τη μαννιτόλη, ενώ οι υπόλοιπες παράγουν μόνο οξύ από τη ζύμωση της γλυκόζης

2.5 Κολοβακτηριοειδή – Εντερικής προελεύσεως-*ESCHERICHIA COLI*

2.5.1 Αρίθμηση κολοβακτηριοειδών και *E.COLI*

Η αρίθμηση των κολοβακτηριοειδών, καθώς επίσης και των εντερικής προελεύσεως κολοβακτηριοειδών και της *E. coli* I, μπορεί να γίνει με περισσότερες από μια μεθόδους και με τη χρήση διαφορετικών συνδυασμών θρεπτικών υποστρωμάτων. Επειδή όμως μόνο η θετικότητα στη δοκιμή κολοβακτηριοειδών είναι δυνατόν να υποδηλώνει θετικότητα σε εντερικής προελεύσεως κολοβακτηριοειδή και *E.coli*, η μεθοδολογία ανιχνεύσεως-αριθμήσεως εξελίσσεται σε συνεχόμενα στάδια.

Απαιτούμενα υλικά

1. Αραιωτικό υγρό (A-5, A-15,A-17)
2. Lactose Broth (B-41)
3. Lauryl Sylfate Tryptose Broth ή LST Broth (B-43)
4. McConkey Broth (B-50)
5. Brilliant Green Lactose Bile Broth 2% ή BGLB Broth (B-11)
6. E.C. Broth (B-27)
7. M-FC Broth (B-57)
8. M-FC Agar (B-57a)
9. M-Endo-Agar MF (B55)
10. Eosin Methylene Blue Agar ή EMB Agar (B-31)
11. Endo Agar (B28)
12. Violet Red Bile Agar (B-117)
13. Desoxycholate Lactose Agar (B-25)
14. McConkey Agar (B-49)
15. Peptone Water (B-77)

16. Συσκευή διηθήσεως κατάλληλη για μικροβιοκρατείς μεμβράνες διαμέτρου 47 mm (Millipore ή άλλου τύπου).
17. Μικροβιοκρατείς μεμβράνες διαμέτρου 47 mm και μεγέθους πόρων 0,45μm
18. Πλαστικά τρυβλία μιας χρήσεως διαμέτρου 50 mm, ειδικά για επώαση σε υδατόλουτρο (Millipore Corp.).
19. Απορροφητικοί δίσκοι (absorbent pads) διαμέτρου 45mm
20. Υποστρώματα και αντιδραστήρια απαραίτητα για δοκιμές ινδόλης, κιτρικών, MR και VP.

Σημείωση: Ανάλογα με την μέθοδο που ακολουθείται απαιτούνται ορισμένα μόνο από τα παραπάνω υλικά.

2.5.2 Μέθοδος Ενσωματώσεως

Προετοιμασία δείγματος και αραιώσεων

Γίνεται όπως περιγράφεται στο 2.1.1

- **Κολοβακτηριοειδή**

A. Προκαταρκτική δοκιμή

1. Ρευστοποιείται το θρεπτικό υπόστρωμα (Violet Red Bile Agar ή Desoxycholate Lactose Agar ή McConkey Agar) και θερμοστατείται στους 45°C σε υδατόλουτρο
2. Από τις αντίστοιχες αραιώσεις του δείγματος μεταφέρεται ποσότητα 1 ml σε στείρα τρυβλία και ενσωματώνεται με 15 ml περίπου υποστρώματος θερμοκρασίας 4°C περίπου.
3. Προκειμένου για ρευστό τρόφιμο είναι δυνατόν να γίνει ενοφθαλμισμός και από το αναραίωτο δείγμα.
4. Τα τρυβλία επωάζονται στους 35-37°C για 24 ώρες.
5. Μετά την επώαση αριθμούνται οι κόκκινες αποικίες. Επιλέγονται για αρίθμηση τα τρυβλία τα οποία έχουν 30-150 αποικίες (APHA, 1976) ενώ κατά τον WHO (WHO, 1977), αριθμούνται τα τρυβλία που έχουν 20-80 αποικίες. Ο αριθμός των αποικιών, αφού πολλαπλασιαστεί επί το συντελεστή αραιώσεως, εκφράζει τον αριθμό κολοβακτηριοειδών ανά ml ή gr τροφίμου.

B. Επιβεβαιωτική δοκιμή

Η δοκιμή γίνεται εφόσον οι αποικίες οι οποίες αναπτύσσονται δεν είναι τυπικές για κολοβακτηριοειδή, οπότε γίνονται οι εξής ενέργειες:

1. Από το τρυβλίο που αριθμήθηκε, επιλέγεται αριθμός αποικιών ίσως προς την τετραγωνική ρίζα του συνόλου τους και ενοφθαλμίζεται σε σωλήνες με ζωμό McConkey ή BGLB.
2. Οι σωλήνες επωάζονται στους 35-37°C για 24 ώρες και θεωρούνται θετικοί εφόσον παρουσιάσουν ανάπτυξη και παραγωγή αερίου.
3. Με βάση το ποσοστό των θετικών αποικιών υπολογίζεται ο αριθμός κολοβακτηριοειδών της επιβεβαιωτικής δοκιμής ανά ml ή gr τροφίμου.

- **Εντερικής προελεύσεως κολοβακτηριοειδή – *E.coli***

Ο προσδιορισμός του αριθμού των κολοβακτηριοειδών με αρίθμηση στερεά υποστρώματα δεν ευνοεί την αρίθμηση *E.coli* και εντερικών κολοβακτηριοειδών, διότι πολλαπλασιάζει το χρόνο εργασίας και τη δαπάνη υλικών. Είναι δυνατόν να γίνει ως εξής:

Από τους θετικούς σωλήνες της επιβεβαιωτικής δοκιμής ενοφθαλμίζονται σωλήνες με ζωμό E.C και Peptone Water και επωάζονται στους 44,5±2°C για 48 ώρες. Στη συνέχεια ακολουθείται η διαδικασία.

2.5.3 Μέθοδος Μικροβιοκρατών Μεμβρανών (Membrane Filtration Method)

Είναι μέθοδος η οποία εφαρμόζεται κυρίως για την αρίθμηση κολοβακτηριοειδών στο νερό. Είναι δυνατόν, κάτω από ορισμένες προϋποθέσεις να χρησιμοποιηθεί και για ορισμένα ρευστά τρόφιμα, αλλά τα προβλήματα που αντιμετωπίζονται κατά την διήθηση κάνουν δύσκολη την εφαρμογή της.

Προετοιμασία του δείγματος – αραιώσεις

Εάν το δείγμα δεν έχει μεγάλο αριθμό κολοβακτηριοειδών, δεν γίνονται αραιώσεις. Σε αντίθετη περίπτωση γίνονται τουλάχιστον 2 αραιώσεις (1:10 και 1:100) με αραιωτικό υγρό φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα (A-5).

Τεχνική (WHO, 1977):

1. Προετοιμάζονται τα τρυβλία petri που περιέχουν υπόστρωμα M-FV-Agar και M-Endo Agar MF και ξεραίνονται επιφανειακά στους 37°C για 30 min.
2. Ελέγχεται το σύστημα διηθήσεως και τοποθετούνται με στείρα λαβίδα οι μεμβράνες στις συσκευές διηθήσεως.

3. Διηθούνται εις διπλούν 100 ml και 10 ml από το αναραιώτο δείγμα καθώς και 10 ml από τις αραιώσεις 1:10 και 1:100 (εφόσον χρησιμοποιούνται).

4. Η μια σειρά φίλτρων τοποθετείται με προσοχή στην επιφάνεια τρυβλίων τα οποία περιέχουν M-FC-Agar ή M-Endo Agar MF και επωάζονται στους 35-37°C για 24±2 ώρες. Αριθμούνται οι κόκκινες αποικίες στο M-Endo Agar Mf και οι κυανές στο M-FC-Agar. Το αποτέλεσμα εκφράσει τον αριθμό κολοβακτηριοειδών με βάση τη σχέση :

$$\text{Κολοβακτηριοειδή/ml} = \text{αριθμός αποικιών/ ml δείγματος} \times 100$$

5. Η δεύτερη σειρά φίλτρων τοποθετείται σε τρυβλία τα οποία περιέχουν υπόστρωμα M-FV-Agar και επωάζονται στους 44,5±0,2°C σε κλίβανο επώσεως για 24 ± ώρες. Αριθμούνται οι κυανές αποικίες και το αποτέλεσμα εκφράζει τον πληθυσμό *E.coli* στην αντίστοιχη ποσότητα δείγματος που διηθήθηκε.

6. Η επώση των φίλτρων προκειμένου για τα κολοβακτηριοειδή είναι δυνατόν να γίνει και σε M-FC-Broth. Στην περίπτωση αυτή χρησιμοποιούνται ειδικά υδατοστεγή πλαστικά τρυβλία διαμέτρου 50 mm εφοδιασμένα με απορροφητικό δίσκο (absorbent pad). Ο δίσκος διαποτίζεται με 2 ml ζωμού M-FC και αμέσως πάνω σ' αυτόν τοποθετείται το φίλτρο. Η επώση γίνεται σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 35-37°C στο οποίο τα τρυβλία, αφού κλειστούν ερμητικά αφήνονται και επιπλέουν. Αριθμούνται οι κυανές αποικίες.

Η μέθοδος παρουσιάζει ορισμένα μειονεκτήματα εξαιτίας των οποίων δίνει μικρότερους πληθυσμούς κολοβακτηριοειδών.

2.5.4 Αρίθμηση εντεροβακτηριοειδών

Συνολική αρίθμηση όλων των μελών της οικογενείας των εντεροβακτηριοειδών απαιτείται στις περιπτώσεις εκείνες που κρίνεται σκόπιμο να διαπιστωθεί τυχών εντερικής προελεύσεως μόλυνση, ιδιαίτερα όταν το τρόφιμο έχει υποστεί κάποιο χειρισμό (εξυγίανση) ο οποίος μπορεί να έχει θανατώσει την *E.coli*, αλλά δεν είναι βέβαιο ότι έχει θανατώσει όλους τους αντιπρόσωπους της οικογένειας των εντεροβακτηριοειδών. Πρέπει να τονισθεί ότι η εκτίμηση της ομάδας Εντεροβακτηριοειδών σαν σύνολο δεν έχει μεγάλη παραδοχή και μόνο μια μέθοδος έχει μελετηθεί (Mossel, 1963), (Van Schotjhorst, 1966) (Thatcher F.S., 1968), (Αμπάλας, 1973).

Απαιτούμενα υλικά

1. Αραιωτικό υγρό (A-5, A15)
2. Enterobacteriaceae Enrichment Broth ή EEB (B-30), καταμεμημένο σε φιάλες ανά 100ml και σε σωλήνες ανά 12 ml.
3. Violet Red Bile Glucose Agar (B-118).

Προετοιμασία του δείγματος

Το δείγμα προετοιμάζεται όπως στο 2.1.1 παρασκευάζεται μόνο μια αραιώση, η 1/10.

Προκαταρκτική δοκιμή

1. Από το αναραιωτο δείγμα ενοφθαλμίζονται 5 φιάλες με 10 ml ή gr η καθεμία. Κάθε φιάλη περιέχει 100 ml ζωμού EEB. Επίσης ενοφθαλμίζονται 5 σωλήνες οι οποίοι περιέχουν 12 ml ζωμού EEB με 1 ml ή gr ο καθένας.
2. Από την αραιώση 1:10 ενοφθαλμίζονται επίσης 5 σωλήνες με 1 ml ο καθένας.
3. Οι σωλήνες επωάζονται στους 35-37°C για 20-24 ώρες.
4. Από τις φιάλες και τους σωλήνες που δείχνουν ανάπτυξη, ενοφθαλμίζονται με κρίκο επιφανειακά τρυβλία με Violet Red Bile Agar με τέτοιο τρόπο ώστε να αναπτυχθούν απομονωμένες αποικίες.
5. Τα τρυβλία επωάζονται ανεστραμμένα στους 35-37°C για 20-24 ώρες.
6. Η ανάπτυξη κόκκινων αποικιών, οι οποίες περιβάλλονται από τη ζώνη ιζηματοαντιδράσεως, υποδηλώνει θετικότητα του αντίστοιχου σωλήνα για εντεροβακτηριοειδή.
7. Το αποτέλεσμα υπολογίζεται από τους πίνακες McCrady.

Επιβεβαιωτική δοκιμή

Η προκαταρκτική δοκιμή θεωρείται επαρκής για την εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με την ύπαρξη εντεροβακτηριοειδών γενικά σ' ένα τρόφιμο. Εάν λόγω της φύσεως του δείγματος υπάρχει αμφιβολία, τότε:

1. Από τα τρυβλία της προκαταρκτικής δοκιμής παίρνονται 1-2 τυπικές για εντεροβακτηριοειδή, αποικίες και αφού καθαροποιηθούν, υποβάλλονται στις βιοχημικές δοκιμές α) παραγωγής οξειδάσης, β) ζυμώσεως γλυκόζης και γ) αναγωγής των νιτρικών αλάτων.

2. Τα εντεροβακτηριοειδή δίνουν αρνητική τη δοκιμή οξειδάσης και θετικές τις δοκιμές ζυμώσεως της γλυκόζης και αναγωγής των νιτρικών αλάτων.

2.5.5 Βιοχημικές δοκιμές ταυτοποίησης εντεροβακτηρίων

Η μελέτη της βιοχημικής συμπεριφοράς των βακτηρίων (η δράση τους επάνω σε οργανικά υποστρώματα) παρουσιάζει ιδιομορφίες ανάλογα με το είδος του βακτηρίου. Παρά το γεγονός όμως αυτό, πολλά βιοχημικά χαρακτηριστικά των βακτηρίων είναι δυνατόν να μελετηθούν με μεθόδους κοινές ως προς το είδος του υποστρώματος και την τεχνική. Η τεχνική των δοκιμών που περιγράφονται στηρίζεται στα όσα αναφέρονται σε βασικά μικροβιολογικά εγχειρίδια (Edwards, 1972), (APHA., 1963), (Thatcher F.S., 1968), (Cowan, 1974), (Cruickshank, 1975).

2.5.5.1 ΔΟΚΙΜΗ ΚΙΝΗΤΙΚΟΤΗΤΑΣ (MOTILITY TEST)

Δοκιμαστικοί σωλήνες, οι οποίοι περιέχουν Motility Test Medium (B-59), ενοφθαλμίζονται, με νύξη, σε βάθος 0,5cm περίπου από την επιφάνειά τους. Οι καλλιέργειες επωάζονται είτε στην άριστη θερμοκρασία αναπτύξεως του βακτηρίου που εξετάζεται, είτε σε χαμηλότερη (π.χ. 37⁰C ή 22⁰C).

Τα κινητά βακτήρια μεταναστεύουν σ' όλο το υπόστρωμα και το καθιστούν θολερό, ενώ τα ακίνητα αναπτύσσονται μόνο επάνω στη γραμμή ενοφθαλμισμού. Ορισμένα στελέχη ακίνητων βακτηρίων είναι δυνατόν να παρουσιάσουν ανάπτυξη με μορφή προεκβολών από ένα ή δύο σημεία της γραμμής ενοφθαλμισμού.

Ο έλεγχος των καλλιιεργειών και η εκτίμηση του αποτελέσματος πρέπει να γίνεται αμέσως μετά την 8^η ώρα γιατί τα εντόνως κινητά βακτήρια διεισδύουν σ' όλο το υπόστρωμα πριν από την 24^η ώρα.

2.5.5.2 ΔΟΚΙΜΗ ΙΝΔΟΛΗΣ (INDOLE TEST)

Με τη δοκιμή αυτή διερευνάται η ικανότητα ορισμένων βακτηρίων να αποδομούν το αμινοξύ τρυπτοφάνη προς ινδόλη. Η ινδόλη η οποία παράγεται ανιχνεύεται με τη βοήθεια της paradimethyl-aminobenzaldehyde με την οποία σχηματίζει έγχρωμη ένωση.

Τεχνική

Ενοφθαλμίζονται σωλήνες με Peptone Water (B-77) ή καλύτερα με Tryptone Water (B-109), διότι η πεπτόνη η οποία χρησιμοποιείται πρέπει να είναι πλούσια σε θρυπτοφάνη και επωάζονται στους 37 ⁰C για 48 ώρες. Σε ορισμένες περιπτώσεις για να υπάρξει η απαιτούμενη συγκέντρωση ινδόλης στο υπόστρωμα, ο χρόνος επώσεως επιμηκύνεται

κατά 48 ακόμη ώρες. Προσθέτονται 0,2ml αντιδραστηρίου Kovacs (A-8) σε 5ml καλλιέργειας και το περιεχόμενο του σωλήνα αναδεύεται ελαφρά. Θετική θεωρείται η δοκιμή όταν η στιβάδα της αμυλικής αλκοόλης πάρει κόκκινο χρώμα.

2.5.5.3 ΔΟΚΙΜΗ ΕΡΥΘΡΟΥ ΤΟΥ ΜΕΘΥΛΙΟΥ (METHYL RED TEST ή MR TEST)

Το ερυθρό του μεθυλίου στη δοκιμή αυτή χρησιμοποιείται απλώς σαν δείκτης pH. Ορισμένα βακτήρια όπως η *Escherichia coli* παράγουν αρκετή ποσότητα οξέος από τη διάσπαση της γλυκόζης που περιέχεται στο υπόστρωμα, στο οποίο εκτελείται η δοκιμή, ώστε να προκαλείται αυτοανάσχεση. Άλλα βακτήρια όπως τα γένη *Klebsiella* και *Aerobacter* δεν παράγουν αρκετό οξύ για να αναστείλει την ανάπτυξή τους, οπότε εξακολουθούν να αναπτύσσονται και αποδομούν τις πεπτόνες οι οποίες περιέχονται στο υπόστρωμα. Συνέπεια του γεγονότος αυτού είναι η μεταβολή του pH του υποστρώματος προς το αλκαλικότερο. Με την προσθήκη σταγόνων ερυθρού του μεθυλίου διαπιστώνεται το pH της καλλιέργειας. Το ερυθρό του μεθυλίου είναι δείκτης που σε pH 4,2 παίρνει κόκκινο και σε pH 6,3 κίτρινο χρώμα.

Τεχνική

Ενοφθαλμίζονται σωλήνες οι οποίοι περιέχουν Buffered Glucose Broth (B-13) και επωάζονται στους 37⁰C για 2 ημέρες ή στους 30⁰C για 5 ημέρες. Προσθέτονται 5 σταγόνες αντιδραστήριου MR (A-11) ανά 5ml καλλιέργειας, αναδεύεται το περιεχόμενο των σωλήνων και γίνεται αμέσως η ανάγνωση.

2.5.5.4 ΔΟΚΙΜΗ VOGES–PROSKAUER ή VP (Ανίχνευση ακετυλομεθυλοκαρβινόλης ή ακετοΐνης)

Πολλά βακτήρια σχηματίζουν από τη γλυκόζη (ή ορθότερα από το πυροσταφυλικό οξύ, στο οποίο καταλήγει η ζύμωση των υδατανθράκων), ακετυλομεθυλοκαρβινόλη (ακετοΐνη). Η ακετοΐνη ή το παράγωγό της 2,3- βουτυλενογλυκόλη κατά τη στιγμή της αντιδράσεως, παρουσία αλκάλειου οξειδώνεται προς διακετύλιο, το οποίο σε αλκαλικές συνθήκες αντιδρά με αργινίνη ή κρεατίνη και δίνει έγχρωμη ένωση (Cruickshank και συν., 1975). Η δοκιμή γίνεται σε συνδυασμό με τη δοκιμή MR (2.5.5.3)

Τεχνική

1. Μέθοδος Barritt (1936): Από τις καλλιέργειες της δοκιμής 2.5.5.3 μεταφέρεται 1 ml καλλιέργειας σε καθαρό σωλήνα 13x100mm. Προσθέτονται 0,2ml 40% διαλύματος KOH, γίνεται ανάμιξη και προσθέτονται 0,6 ml αντιδραστηρίου a-naphthol (A-4). Γίνεται

ανάμιξη και ο σωλήνας τοποθετείται σε κεκλιμένη θέση ώστε να ευνοηθεί η οξειδωση. Παρατηρείται κάθε 15min επί 1 ώρα. Θετική είναι η δοκιμή όταν το υγρό του σωλήνα πάρει έντονο κόκκινο (ρουμπινί) χρώμα. Χρώμα χαλκόχρουν ή καφέ ερμηνεύεται σαν αρνητική δοκιμή.

2. Μέθοδος O' Meara (1931): Σε 1ml καλλιέργειας που προετοιμάστηκε όπως στο 2.5.5.3 προσθέτονται 2 σταγόνες αντιδραστήριου κρεατίνης (A-6) και 1ml 40% υδατικού διαλύματος KOH. Γίνεται καλή ανάμιξη και εξέταση μετά από 1 και 4 ώρες. Η αντίδραση είναι θετική όταν αναπτυχθεί ανοιχτό κόκκινο χρώμα (eosin-pink).

2.5.5.5 ΔΟΚΙΜΗ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΣΕΩΣ ΤΩΝ ΚΙΤΡΙΚΩΝ ΑΛΑΤΩΝ (CITRATE UTILIZATION TEST)

Με τη δοκιμή αυτή διερευνάται η ικανότητα των βακτηρίων να αξιοποιούν τα κιτρικά άλατα σαν μόνη πηγή άνθρακα και τα άλατα του αμμωνίου σαν μόνη πηγή αζώτου.

Η δοκιμή είναι δυνατόν να γίνει με δύο μεθόδους:

Μέθοδος 1^η : Ενοφθαλμίζονται σωλήνες με Koser's Citrate Medium (B-40a) με εναιώρημα του βακτηρίου που εξετάζεται, σε φυσιολογικό ορό και επωάζονται στους 30^oC για 7 ημέρες όταν πρόκειται για εντεροβακτηριοειδή, ή στην άριστη θερμοκρασία αναπτύξεως για τα υπόλοιπα βακτήρια.

Θετική θεωρείται η δοκιμή όταν μετά την επώαση παρατηρείται θολερότητα στο υπόστρωμα. Αρνητική όταν δεν παρατηρείται θολερότητα. Από τους θετικούς σωλήνες γίνεται ενοφθαλμισμός.

Μέθοδος 2^η : Ενοφθαλμίζεται η κεκλιμένη επιφάνεια Simmon's Citrate Agar (B-93) με εναιώρημα βακτηρίων σε φυσιολογικό ορό. Οι σωλήνες επωάζονται στην άριστη θερμοκρασία αναπτύξεως του βακτηρίου και εξετάζονται καθημερινά για 7 ημέρες. Θετική θεωρείται η δοκιμή όταν παρατηρείται ανάπτυξη και αλλαγή του χρώματος του υποστρώματος από πράσινο σε σκούρο κυανό. Αρνητική όταν δεν παρατηρείται αλλαγή χρώματος. Ορισμένοι συγγραφείς συνιστούν επιβεβαίωση των θετικών σωλήνων με δεύτερη δίοδο στο ίδιο υπόστρωμα.

2.6 *Listeria monocytogenes*

Δύο μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί από το International Standard Organization (ISO), για την *L.monocytogenes*, μία για την **ανίχνευση** (ISO 11290-1 first edition 15-12-1996 Amendment 1 15-10-2004) και μία για την **απαρίθμηση** (ISO11290-2 first edition 01-07-1998 Amendment 1 15-10-2004) του μικροοργανισμού.

Το ISO 11290-1 περιλαμβάνει:

- Ένα βήμα προώμου εμπλουτισμού σε ζωμό FRASER, 25gr δείγματος στη μισή συγκέντρωση αντιβιοτικών που έχει ο δευτερογενής ζωμός εμπλουτισμού για 24+/- 2 ώρες στους 30 °C
- Ένα βήμα κύριου εμπλουτισμού με FRASER Broth (με πλήρη συγκέντρωση αντιβιοτικών), επωασμένο για 24/48 ώρες +/-2 ώρες στους 37 °C, ακολουθούμενο από εκλεκτική σπορά των σωλήνων με μαύρο χρώμα (υδρόλυση εσκουλίνης) σε στερεά υποστρώματα όπως ALOA, PASCAM ή άλλα χρωματικά μέσα που διαφοροποιούν την *L. monocytogenes* από άλλες Λιστέριες με βάση φαινοτυπικά χαρακτηριστικά (μωβ χρώμα).

Στις αποικίες της *L. monocytogenes* πρέπει να γίνει αναγνώριση του είδους και του γένους, με test επιβεβαίωσης (microscopy, Gram straining, hemolysis test, carbohydrate utilization and CAMP test) ή ταχεία βιοχημικά test όπως API LISTERIA της bioMerieux.

2.7 Δειγματοληψία

Στα πλαίσια της παρούσας έρευνας πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία για εργαστηριακό μικροβιολογικό έλεγχο δειγμάτων περιβάλλοντος από τους χώρους επεξεργασίας τροφίμων των μονάδων μαζικής εστίασης (χρησιμοποιούμενο νερό, πάγος, επιφάνειες και εξοπλισμοί που έρχονται σε επαφή με τα τρόφιμα). Στη συνέχεια έγινε εκτίμηση του πληθυσμού ή της παρουσίας συγκεκριμένων μικροοργανισμών δεικτών υγιεινής και ασφάλειας, που αποδεικνύουν την μικροβιακή υγιεινή του περιβάλλοντος επεξεργασίας τροφίμων στις μονάδες μαζικής εστίασης (*Coliforms*, *E. coli*, *S. aureus*), και την τήρηση ορθών πρακτικών υγιεινής κατά την παραγωγή.

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες για εργαστηριακό μικροβιολογικό έλεγχο δειγμάτων τροφίμων σε όλες τις φάσεις παραγωγής τους, από την παραλαβή έως την αποθήκευση, την μεταποίηση και το service έτοιμων μενού, σε μονάδες μαζικής εστίασης με αναζήτηση, καταμέτρηση και εκτίμηση της παρουσίας ή όχι τροφογενών παθογόνων (*Salmonella Spp.*, *Listeria Monocytogenes*) και δεικτών υγιεινής (*Staphylococcus Aureus*, *E.Coli*, *Coliforms*).

Κατόπιν, έγινε εκτίμηση των αποτελεσμάτων των εργαστηριακών ελέγχων με παράλληλη επιτήρηση και καταγραφή των αδυναμιών και των εν γένει πρακτικών, που οδήγησαν στην παραβίαση των προδιαγραφών μικροβιολογικής υγιεινής τροφίμων, που οι Ευρωπαϊκοί Κανονισμοί Ασφάλειας Τροφίμων EK 2073/2005 και EK 1441/2007

προβλέπουν για τρόφιμα και μενού που εισέρχονται ως πρώτες ύλες και μεταποιούνται στις μονάδες μαζικής εστίασης.

Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν με μέριμνα της Μονάδας Μικροβιολογικής Υγιεινής Τροφίμων , Ύδατος και Περιβάλλοντος του εργαστηρίου Βακτηριολογίας Ζωονόσων και Γεωγραφικής Ιατρικής στα πλαίσια των Ερευνητικών Προγραμμάτων του ΕΛΚΕ Πανεπιστημίου Κρήτης ΚΑ 949 και ΚΑ 2828 σε Επιχειρήσεις Μαζικής Εστίασης που συνεργάζονται με τα ανωτέρω Ερευνητικά Προγράμματα.

Επιπλέον σημαντικός αριθμός δειγμάτων ιδιαίτερα σε επιχειρήσεις που δεν εφαρμόζουν Συστήματα Μαζικής Εστίασης πραγματοποιήθηκε από τις Αρχές Δημόσιας Υγείας Νήσου Κρήτης, στα πλαίσια συνεργασίας τους με τα ανωτέρω Ερευνητικά Προγράμματα. Το σύνολο των εκτιμωμένων αποτελεσμάτων αφορούν επεξεργασία στοιχείων και το χρονικό διάστημα από το Φεβρουάριο 2008 έως και το Φεβρουάριο 2010.

2.8 Προδιαγραφές μικροβιολογικής ασφάλειας σερβιριζομένων τροφίμων

Οι προδιαγραφές μικροβιολογικής ασφάλειας ορίζονται σύμφωνα με την παρακάτω νομοθεσία:

- Ευρωπαϊκός κανονισμός ΕΚ1441/2007.
- Κατευθυντήριες γραμμές: FAO/WHO.

| | Salmonella spp | Listeria monocytogenes | E.coli | S.aureus | OMX |
|------------------------------------------|-----------------------|-------------------------------|-------------------------|-----------------|---------------|
| Νωπά/ Κατεψυγμένα κρέατα | Απουσία σε 25gr | ≤ 100cfu/gr | ≤ 500 cfu/gr | | |
| Τυροκομικά | Απουσία σε 25gr | Απουσία σε 25gr | n=5, c=2, m=100, M=1000 | | |
| Θερμικά επεξεργασμένα κρέατα | απουσία σε 25gr | απουσία σε 25gr | ≤ 10 cfu/gr | ≤ 50 cfu/gr | |
| Κατεψυγμένα σφολιατοειδή | απουσία σε 25gr | ≤ 100 cfu/gr | ≤ 1000 cfu/gr | ≤ 500 cfu/gr | |
| Μπαχαρικά | Απουσία σε 25gr | απουσία 25gr | ≤ 500 cfu/gr | | |
| Νωπά λαχανικά | Απουσία σε 25gr | απουσία σε 25gr | ≤ 100 cfu/gr | | |
| Σκόνες ζαχαροπλαστικής/κατεψυγμένα γλυκά | Απουσία σε 25 gr | απουσία σε 25 gr | ≤ 10 cfu/gr | ≤ 50 cfu/gr | <10000 cfu/gr |

Όπου n= αριθμός δειγμάτων, c=ο αριθμός δειγμάτων που επιτρέπεται να βρίσκεται μεταξύ m,M

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

.Στον πίνακα 9 παρουσιάζεται η μικροβιολογική εικόνα πρώτων υλών ωμών τροφίμων που εισέρχονται σε μονάδες μαζικής εστίασης. Η δειγματοληψία για την συγκεκριμένη εργαστηριακή ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε 17 επιχειρήσεις που εφαρμόζουν συστήματα προληπτικής υγιεινής HACCP. Παρατηρούμε ότι για τα 1778 δείγματα που ελήφθησαν συνολικά, το ποσοστό των δειγμάτων που βρίσκονται εντός ορίων στις μικροβιολογικές παραμέτρους που μελετήθηκαν ήταν: 82,6%, 90,6%, 89,1% και 98,4% για την *E.coli*, *S.aureus*, *L.monocytogenes* και *Salmonella spp*, αντίστοιχα. Επιπλέον, σημειώνεται υψηλό ποσοστό τήρησης των κατευθυντήριων γραμμών υγιεινής και των ευρωπαϊκών κανονισμών στα κρέατα, λόγω εφαρμογής του συστήματος HACCP στα εργοστάσια σφαγής, επεξεργασίας και τυποποίησης του κρέατος.

Αντίθετα, υπάρχει αδυναμία επίτευξης υψηλού ποσοστού ασφάλειας για τα τυριά τυρογάλακτος (μυζήθρα, μανούρι κ.τ.λ.) λόγω επιμολύνσεων από τους εξοπλισμούς και το περιβάλλον παραγωγής μετά την θερμική επεξεργασία και στη φάση ψύξης και τυποποίησης των τυριών (ποσοστά εκτός συνιστώμενων ορίων: 52,4%, 41,9%, 52,4% για *E.coli*, *S.aureus*, *L.monocyt.*, αντίστοιχα). Επακόλουθο είναι να επιμολυνθούν και τα σφολιατοειδή (π.χ. τυρόπιτες, μυζηθρόπιτες κ.α.), τα οποία έχουν σαν βάση μείγμα τυριών τυρογάλακτος και τυριών ωρίμανσης. Πολύ ικανοποιητική εικόνα υγιεινής εμφανίζεται στα κατεψυγμένα γλυκά και τις σκόνες ζαχαροπλαστικής, λόγω των αυστηρών κανόνων που εφαρμόζονται κατά την παραγωγή τους.

Πίνακας 9. Μικροβιολογική εικόνα Α' υλών ωμών τροφίμων που εισέρχονται σε μονάδες μαζικής εστίασης που εφαρμόζουν συστήματα προληπτικής υγιεινής (17 επιχειρήσεις)

| Είδος α' ύλης | Μικροβιολογική εικόνα ανά μικροβιολογική παράμετρο | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------------------------------|----------------------------------------------------|-------------|-------------|------------|-------------|-----------------------|-------------|------------|------------|------------------------|-------------|------------|-------------|----------------|-------------|-----------|------------|
| | Σύνολο δειγμάτων | E.coli | | | | Staphylococcus aureus | | | | Listeria monocytogenes | | | | Salmonella spp | | | |
| | | Εντός (%) | Εκτός (%) | Εντός (%) | Εκτός (%) | Εντός (%) | Εκτός (%) | Εντός (%) | Εκτός (%) | Εντός (%) | Εκτός (%) | Εντός (%) | Εκτός (%) | | | | |
| Νωπά πουλερικά | 88 | 80 | 90,9 | 8 | 9,1 | 80 | 90,9 | 8 | 9,1 | 88 | 100,0 | 0 | 0,0 | 82 | 93,2 | 6 | 6,8 |
| Κατεψυγμένα πουλερικά | 263 | 252 | 95,8 | 9 | 3,4 | 263 | 100,0 | 0 | 0,0 | 263 | 100,0 | 0 | 0,0 | 256 | 97,3 | 7 | 2,7 |
| Θερμικά επεξεργασμένα πουλερικά | 95 | 90 | 94,7 | 5 | 5,3 | 92 | 96,8 | 3 | 3,2 | 89 | 93,7 | 6 | 6,3 | 95 | 100,0 | 0 | 0,0 |
| Νωπά κρέατα | 138 | 132 | 95,7 | 6 | 4,3 | 135 | 97,8 | 3 | 2,2 | 138 | 100,0 | 0 | 0,0 | 137 | 99,3 | 1 | 0,7 |
| Κατεψυγμένα κρέατα | 244 | 228 | 93,4 | 16 | 6,6 | 244 | 100,0 | 0 | 0,0 | 244 | 100,0 | 0 | 0,0 | 237 | 97,1 | 7 | 2,9 |
| Θερμικά επεξεργασμένα κρέατα | 82 | 82 | 100,0 | 0 | 0,0 | 80 | 97,6 | 2 | 2,4 | 79 | 96,3 | 3 | 3,7 | 82 | 100,0 | 0 | 0,0 |
| Νωπά τυριά ωρίμανσης | 68 | 55 | 80,9 | 13 | 19,1 | 68 | 100,0 | 0 | 0,0 | 68 | 100,0 | 0 | 0,0 | 68 | 100,0 | 0 | 0,0 |
| Τυριά τυρογάλακτος | 105 | 50 | 47,6 | 55 | 52,4 | 61 | 58,1 | 44 | 41,9 | 50 | 47,6 | 55 | 52,4 | 105 | 100,0 | 0 | 0,0 |
| Κατεψυγμένα σφολιατοειδή | 234 | 108 | 46,2 | 126 | 53,8 | 132 | 56,4 | 102 | 43,6 | 142 | 60,7 | 92 | 39,3 | 234 | 100,0 | 0 | 0,0 |
| Νωπά λαχανικά | 116 | 72 | 62,1 | 44 | 37,9 | 116 | 100,0 | 0 | 0,0 | 79 | 68,1 | 37 | 31,9 | 108 | 93,1 | 8 | 6,9 |
| Μπαχαρικά | 91 | 69 | 75,8 | 22 | 24,2 | 85 | 93,4 | 6 | 6,6 | 91 | 100,0 | 0 | 0,0 | 91 | 100,0 | 0 | 0,0 |
| Σκόνη ζαχαροπλαστικής | 86 | 86 | 100,0 | 0 | 0,0 | 86 | 100,0 | 0 | 0,0 | 86 | 100,0 | 0 | 0,0 | 86 | 100,0 | 0 | 0,0 |
| Κατεψυγμένα γλυκά | 168 | 162 | 96,4 | 6 | 3,6 | 168 | 100,0 | 0 | 0,0 | 168 | 100,0 | 0 | 0,0 | 168 | 100,0 | 0 | 0,0 |
| ΣΥΝΟΛΟ | 1778 | 1468 | 82,6 | 310 | 17,4 | 1610 | 90,6 | 168 | 9,4 | 1585 | 89,1 | 193 | 10,9 | 1749 | 98,4 | 29 | 1,6 |

Στον πίνακα 10 αναφέρεται η μικροβιολογική εικόνα πρώτων υλών σε 11 επιχειρήσεις μαζικής εστίασης που δεν εφαρμόζουν συστήματα προληπτικής υγιεινής HACCP. Παρατηρούμε ότι τα ποσοστά ανά μικροβιολογική παράμετρο που υπερβαίνουν το ανώτερο επιτρεπτό όριο (cut-off point) είναι: 26%, 14,4%, 18,3%, 3,1% για την *E.coli*, *S.aureus*, *L.monocytogenes* και *Salmonella spp*, αντίστοιχα. Ακόμη, μπορούμε να επισημάνουμε για τη μικροβιολογική εικόνα των κατεψυγμένων σφολιατοειδών και των νωπών λαχανικών ότι είναι τα είδη με τη μεγαλύτερη μόλυνση σε σχέση με τις υπόλοιπες πρώτες ύλες. Τα ποσοστά εκτός ορίων για το σύνολο των μικροβιακών παραμέτρων αγγίζουν το 25% και 19% αντίστοιχα. Παρόμοια εικόνα, με ποσοστά εκτός συνιστώμενων ορίων για συγκεκριμένες μικροβιολογικές παραμέτρους, παρουσιάζουν και τα προϊόντα τυριών και μπαχαρικών. Η αδυναμία των επιχειρήσεων που δεν εφαρμόζουν HACCP να επιλέξουν προμηθευτές που με τη σειρά τους εφαρμόζουν συστήματα προληπτικής υγιεινής στην παραγωγική τους διαδικασία (εγκεκριμένοι και αξιολογημένοι προμηθευτές) έχει σαν αποτέλεσμα την προμήθεια Α και Β υλών και έτοιμων τροφίμων με χαμηλότερου επιπέδου εικόνα μικροβιολογικής ασφάλειας.

Στις υπόλοιπες πρώτες ύλες (κρέατα, γλυκά, σκόνες ζαχαροπλαστικής), η πλειονότητα των παραγωγών που προμηθεύουν τις επιχειρήσεις που δεν εφαρμόζουν HACCP, προμηθεύουν και τις επιχειρήσεις που εφαρμόζουν το σύστημα HACCP, και η μικροβιολογική εικόνα ασφάλειας είναι περίπου του ίδιου επιπέδου.

Πίνακας 10. Μικροβιολογική εικόνα Α' υλών σε μονάδες μαζικής εστίασης που δεν εφαρμόζουν συστήματα προληπτικής υγιεινής (11 επιχειρήσεις)

| Είδος Α' ύλης | Μικροβιολογική εικόνα ανά μικροβιολογική παράμετρο | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------------------------------|----------------------------------------------------|------------|-------------|------------|-------------|-----------------------|-------------|------------|-------------|------------------------|-------------|------------|-------------|----------------|-------------|-----------|------------|------------------------|
| | Σύνολο δειγμάτων | E.coli | | | | Staphylococcus aureus | | | | Listeria monocytogenes | | | | Salmonella spp | | | | Συνολικό % εκτός ορίων |
| | | Εντός (%) | Εκτός (%) | Εντός (%) | Εκτός (%) | Εντός (%) | Εκτός (%) | Εντός (%) | Εκτός (%) | Εντός (%) | Εκτός (%) | Εντός (%) | Εκτός (%) | Εκτός (%) | | | | |
| Νωπά πουλερικά | 44 | 34 | 77,3 | 10 | 22,7 | 34 | 77,3 | 10 | 22,7 | 44 | 100,0 | 0 | 0,0 | 34 | 77,3 | 10 | 22,7 | 6,07 |
| Κατεψυγμένα πουλερικά | 111 | 79 | 71,2 | 32 | 28,8 | 111 | 100,0 | 0 | 0,0 | 111 | 100,0 | 0 | 0,0 | 102 | 91,9 | 9 | 8,1 | 8,30 |
| Θερμικά επεξεργασμένα πουλερικά | 31 | 31 | 100,0 | 0 | 0,0 | 31 | 100,0 | 0 | 0,0 | 21 | 67,7 | 10 | 32,3 | 31 | 100,0 | 0 | 0,0 | 2,02 |
| Νωπά κρέατα | 55 | 45 | 81,8 | 10 | 18,2 | 45 | 81,8 | 10 | 18,2 | 50 | 90,9 | 5 | 9,1 | 55 | 100,0 | 0 | 0,0 | 5,06 |
| Κατεψυγμένα κρέατα | 132 | 119 | 90,2 | 13 | 9,8 | 132 | 100,0 | 0 | 0,0 | 132 | 100,0 | 0 | 0,0 | 130 | 98,5 | 2 | 1,5 | 3,04 |
| Θερμικά επεξεργασμένα κρέατα | 38 | 36 | 94,7 | 2 | 5,3 | 38 | 100,0 | 0 | 0,0 | 27 | 71,1 | 11 | 28,9 | 38 | 100,0 | 0 | 0,0 | 2,63 |
| Νωπά τυριά ωρίμανσης | 50 | 25 | 50,0 | 25 | 50,0 | 45 | 90,0 | 5 | 10,0 | 47 | 94,0 | 3 | 6,0 | 50 | 100,0 | 0 | 0,0 | 6,68 |
| Τυριά τυρογάλακτος | 44 | 22 | 50,0 | 22 | 50,0 | 17 | 38,6 | 27 | 61,4 | 14 | 31,8 | 30 | 68,2 | 44 | 100,0 | 0 | 0,0 | 15,99 |
| Κατεψυγμένα σφολιατοειδή | 76 | 30 | 39,5 | 46 | 60,5 | 36 | 47,4 | 40 | 52,6 | 39 | 51,3 | 37 | 48,7 | 76 | 100,0 | 0 | 0,0 | 24,90 |
| Νωπά λαχανικά | 92 | 66 | 71,7 | 26 | 28,3 | 80 | 87,0 | 12 | 13,0 | 42 | 45,7 | 50 | 54,3 | 88 | 95,7 | 4 | 4,3 | 18,62 |
| Μπαχαρικά | 28 | 16 | 57,1 | 12 | 42,9 | 17 | 60,7 | 11 | 39,3 | 28 | 100,0 | 0 | 0,0 | 28 | 100,0 | 0 | 0,0 | 4,66 |
| Σκόνη ζαχαροπλαστικής | 44 | 44 | 100,0 | 0 | 0,0 | 44 | 100,0 | 0 | 0,0 | 44 | 100,0 | 0 | 0,0 | 44 | 100,0 | 0 | 0,0 | 0,00 |
| Κατεψυγμένα γλυκά | 55 | 45 | 81,8 | 10 | 18,2 | 55 | 100,0 | 0 | 0,0 | 55 | 100,0 | 0 | 0,0 | 55 | 100,0 | 0 | 0,0 | 2,02 |
| ΣΥΝΟΛΟ | 800 | 592 | 74,0 | 208 | 26,0 | 685 | 85,6 | 115 | 14,4 | 654 | 81,8 | 146 | 18,3 | 775 | 96,9 | 25 | 3,1 | 100,00 |

Η μικροβιολογική εικόνα μενού ξενοδοχείων που εφαρμόζουν σύστημα προληπτικής υγιεινής (17 επιχειρήσεις) παρουσιάζεται στον πίνακα 11. Από τα δεδομένα προκύπτει ότι όλες οι πρώτες ύλες που χρησιμοποιούνται στα μενού, βρίσκονται εντός των επιτρεπτών ορίων, σε ποσοστά από 92,3% έως 100%. Παρόλαυτα, φαίνεται ότι τα ‘ορεκτικές-σύνθετες σαλάτες’ και οι ‘φρέσκες σαλάτες’ αποτελούν επικίνδυνα προϊόντα λόγω του μικροβιακού φορτίου τους, ακόμα και σε επιχειρήσεις που εφαρμόζουν σύστημα HACCP. Αυτό συμβαίνει επειδή στις σαλάτες αυτές χρησιμοποιούνται φυλλώδη λαχανικά (άνηθος, μαϊντανός), που για την εξυγίανση τους απαιτείται επίμονος και προσεκτικός καθαρισμός (ορθή χρήση απολυμαντικού διαλύματος), με αποτέλεσμα λαχανικά με υψηλό πληθυσμό *E.coli* και με παρουσία *L.monocytogenes*, να επιμολύνουν τα προϊόντα κρύας κουζίνας.

Πίνακας 11. Μικροβιολογική εικόνα μενού σε ξενοδοχεία που εφαρμόζουν σύστημα προληπτικής υγιεινής (17 επιχειρήσεις)

| Είδος Α' ύλης | Μικροβιολογική εικόνα ανά μικροβιολογική παράμετρο | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------------------------|----------------------------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------------------|-----------|-----------|-----------|------------------------|-----------|-----------|-----------|----------------|-----------|---|-----|
| | Σύνολο δειγμάτων | E.coli | | | | Staphylococcus aureus | | | | Listeria monocytogenes | | | | Salmonella spp | | | |
| | | Εντός (%) | Εκτός (%) | Εκτός (%) | Εκτός (%) | Εντός (%) | Εκτός (%) | Εκτός (%) | Εκτός (%) | Εντός (%) | Εκτός (%) | Εκτός (%) | Εκτός (%) | Εντός (%) | Εκτός (%) | | |
| Ζεστά μενού | 484 | 484 | 100,0 | 0 | 0,0 | 484 | 100,0 | 0 | 0 | 484 | 100,0 | 0 | 0,0 | 484 | 100,0 | 0 | 0,0 |
| Ορεκτικές - σύνθετες σαλάτες | 513 | 488 | 95,1 | 25 | 4,9 | 485 | 94,5 | 28 | 5,5 | 430 | 83,8 | 73 | 14,2 | 513 | 100,0 | 0 | 0,0 |
| Φρέσκες σαλάτες | 312 | 280 | 89,7 | 32 | 10,3 | 301 | 96,5 | 11 | 3,5 | 272 | 87,2 | 40 | 12,8 | 312 | 100,0 | 0 | 0,0 |
| Προϊόντα αυγού | 107 | 107 | 100,0 | 0 | 0,0 | 107 | 100,0 | 0 | 0,0 | 107 | 100,0 | 0 | 0,0 | 107 | 100,0 | 0 | 0,0 |
| Γλυκά με βάση τις κρέμες | 144 | 133 | 92,4 | 11 | 7,6 | 135 | 93,8 | 8 | 5,6 | 144 | 100,0 | 0 | 0,0 | 144 | 100,0 | 0 | 0,0 |
| Κρεατοσκευάσματα | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Τυροκομικά σε προινά μενού | 213 | 207 | 97,2 | 6 | 2,8 | 202 | 94,8 | 11 | 5,2 | 192 | 90,1 | 21 | 9,9 | 213 | 100,0 | 0 | 0,0 |
| ΣΥΝΟΛΟ | 1773 | 1699 | 95,8 | 74 | 4,2 | 1714 | 96,7 | 58 | 3,3 | 1636 | 92,3 | 137 | 7,7 | 1773 | 100,0 | 0 | 0,0 |

Στον πίνακα 12 παρουσιάζεται η μικροβιολογική εικόνα μενού σε 11 ξενοδοχεία που δεν εφαρμόζουν συστήματα προληπτικής υγιεινής. Όπως παρατηρήθηκε και στον πίνακα 11, οι ‘ορεκτικές-σύνθετες σαλάτες’ και οι ‘φρέσκες σαλάτες’ αποτελούν όντως σοβαρό κίνδυνο μόλυνσης, με ποσοστά δειγμάτων εκτός ορίων ίσες με 33% και 41% αντίστοιχα, στο σύνολο των μικροβιολογικών παραμέτρων. Οι λόγοι που συμβαίνει αυτό είναι: η παραγωγή φρέσκων και σύνθετων σαλατών σε μη-φυσικά διαχωρισμένους χώρους από τους χώρους που επεξεργάζονται πρώτες ύλες με υψηλό βακτηριακό φορτίο (κρεοπωλεία, λαχανοπωλεία κ.τ.λ.), η αποθήκευση ευαλίωτων σύνθετων και φρέσκων σαλατών, καθώς και θερμικά επεξεργασμένων προϊόντων με ωμές και ανεπεξέργαστες πρώτες ύλες, τέλος η απουσία διαδικασιών απολύμανσης λαχανικών και φρούτων.

Πίνακας 12. Μικροβιολογική εικόνα μενού σε ξενοδοχεία που δεν εφαρμόζουν συστήματα προληπτικής υγιεινής (11 επιχειρήσεις)

| Είδος Α' ύλης | Μικροβιολογική εικόνα ανά μικροβιολογική παράμετρο | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------------------------|----------------------------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------------------|-----------|-----------|-----------|------------------------|-----------|-----------|-----------|----------------|-------|----|-----|------------------------|
| | Σύνολο δειγμάτων | E.coli | | | | Staphylococcus aureus | | | | Listeria monocytogenes | | | | Salmonella spp | | | | Συνολικό % εκτός ορίων |
| | | Εντός (%) | Εκτός (%) | Εντός (%) | Εκτός (%) | Εντός (%) | Εκτός (%) | Εντός (%) | Εκτός (%) | Εντός (%) | Εκτός (%) | Εντός (%) | Εκτός (%) | | | | | |
| Ζεστά μενού | 255 | 235 | 92,2 | 20 | 7,8 | 215 | 84,3 | 40 | 15,7 | 240 | 94,1 | 15 | 5,9 | 255 | 100,0 | 0 | 0,0 | 6,56 |
| Ορεκτικές - σύνθετες σαλάτες | 316 | 216 | 68,4 | 100 | 31,6 | 211 | 66,8 | 105 | 33,2 | 159 | 50,3 | 157 | 49,7 | 300 | 94,9 | 16 | 5,1 | 33,04 |
| Φρέσκες σαλάτες | 288 | 108 | 37,5 | 180 | 62,5 | 179 | 62,2 | 109 | 37,8 | 113 | 39,2 | 175 | 60,8 | 280 | 97,2 | 8 | 2,8 | 41,26 |
| Προϊόντα αυγού | 91 | 91 | 100,0 | 0 | 0,0 | 91 | 100,0 | 0 | 0,0 | 91 | 100,0 | 0 | 0,0 | 84 | 92,3 | 7 | 7,7 | 0,61 |
| Γλυκά με βάση τις κρέμες | 122 | 72 | 59,0 | 50 | 41,0 | 70 | 57,4 | 52 | 42,6 | 122 | 100,0 | 0 | 0,0 | 122 | 100,0 | 0 | 0,0 | 8,92 |
| Κρεατοσκευάσματα | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Τυροκομικά σε πρωινό μενού | 186 | 166 | 89,2 | 20 | 10,8 | 142 | 76,3 | 44 | 23,7 | 139 | 74,7 | 46 | 24,7 | 186 | 100,0 | 0 | 0,0 | 9,62 |
| ΣΥΝΟΛΟ | 1258 | 888 | 70,6 | 370 | 29,4 | 908 | 72,2 | 350 | 27,8 | 865 | 68,8 | 393 | 31,2 | 1227 | 97,5 | 31 | 2,5 | 100,00 |

Αντίστοιχα, στον πίνακα 13 παρουσιάζεται η μικροβιολογική εικόνα για τα μενού 3 επιχειρήσεων fast food που εφαρμόζουν σύστημα HACCP. Φαίνεται ότι σχεδόν όλο το μενού βρίσκεται εντός ορίων ανεξαρτήτου μικροβιολογικής παραμέτρου. Τα αποτελέσματα αφορούν για επιχειρήσεις πολυεθνικές με πανελλήνια και παγκόσμια εμβέλεια, με αποτέλεσμα η εφαρμογή συστημάτων προληπτικής υγιεινής να έχει έγκαιρα οργανωθεί και αναπτυχθεί ενώ η εκπαίδευση του προσωπικού είναι συστηματική με εφαρμογή διαδικασιών ελέγχου και αξιολόγησης εκπαιδευτικών και εκπαιδευομένων.

Πίνακας 13. Μικροβιολογική εικόνα μενού σε μονάδες fast food που εφαρμόζουν συστήματα προληπτικής υγιεινής HACCP (3 επιχειρήσεις)

| Είδος Α' ύλης | Μικροβιολογική εικόνα ανά μικροβιολογική παράμετρο | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------------------------------------|----------------------------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------------------|-----------|-----------|-----------|------------------------|-----------|-----------|-----------|----------------|--------|---|------|
| | Σύνολο δειγμάτων | E.coli | | | | Staphylococcus aureus | | | | Listeria monocytogenes | | | | Salmonella spp | | | |
| | | Εντός (%) | Εκτός (%) | Εντός (%) | Εκτός (%) | Εντός (%) | Εκτός (%) | Εντός (%) | Εκτός (%) | Εντός (%) | Εκτός (%) | Εντός (%) | Εκτός (%) | | | | |
| Ζεστές παρασκευές | 133 | 133 | 100,0 | 0 | 0,0 | 133 | 100,0 | 0 | 0,0 | 133 | 100,0 | 0 | 0,0 | 133 | 100,0 | 0 | 0,0 |
| Sandwiches | 284 | 280 | 98,6 | 4 | 1,4 | 277 | 97,5 | 7 | 2,5 | 268 | 94,4 | 16 | 5,6 | 284 | 100,0 | 0 | 0,0 |
| Φρέσκες σαλάτες | 102 | 102 | 100,0 | 0 | 0,0 | 102 | 100,0 | 0 | 0,0 | 95 | 93,1 | 7 | 6,9 | 102 | 100,0 | 0 | 0,0 |
| Ορεκτικές σαλάτες | 136 | 136 | 100,0 | 0 | 0,0 | 136 | 100,0 | 0 | 0,0 | 136 | 100,0 | 0 | 0,0 | 136 | 100,0 | 0 | 0,0 |
| Τυροκομικά | 105 | 100 | 95,2 | 5 | 4,8 | 105 | 100,0 | 0 | 0,0 | 104 | 99,0 | 1 | 1,0 | 105 | 100,0 | 0 | 0,0 |
| Κρεατοσκευάσματα | 114 | 114 | 100,0 | 0 | 0,0 | 112 | 98,2 | 2 | 1,8 | 109 | 95,6 | 5 | 4,4 | 114 | 100,0 | 0 | 0,0 |
| Προϊόντα ζαχαροπλαστικής | 77 | 77 | 100,0 | 0 | 0,0 | 77 | 100,0 | 0 | 0,0 | ∅ | ∅ | ∅ | ∅ | 77 | 100,0 | 0 | 0,0 |
| Θερμικά επεξεργασμένα σφολιατοειδή | 136 | 136 | 100,0 | 0 | 0,0 | 136 | 100,0 | 0 | 0,0 | 136 | 100,0 | 0 | 0,0 | 136 | 100,0 | 0 | 0,0 |
| Σφολιατοειδή πριν θερμική επεξεργασία | 140 | 105 | 75,0 | 25 | 17,9 | 135 | 96,4 | 5 | 3,6 | 128 | 91,4 | 12 | 8,6 | 140 | 100,0 | 0 | 0,0 |
| ΣΥΝΟΛΟ | 708 | 676 | 95,48 | 32 | 4,52 | 701 | 99,01 | 7 | 0,99 | 613 | 97,15 | 18 | 2,85 | 708 | 100,00 | 0 | 0,00 |

∅: δεν έγινε ανάλυση

Αντίθετα, από τον πίνακα 14 φαίνεται ότι η μικροβιολογική εικόνα του μενού μονάδων fast food που δεν εφαρμόζουν σύστημα προληπτικής υγιεινής HACCP, είναι πολύ διαφορετική από τις αντίστοιχες που εφαρμόζουν. Δηλαδή, ανά μικροβιολογική παράμετρο παρατηρείται αυξημένο ποσοστό δειγμάτων εκτός ορίων (8,98%, 10,23%, 15,42% για την *E.coli*, *S.aureus* και *L.monocytogenes*, αντίστοιχα). Επιπλέον, τα τρόφιμα που φαίνεται να έχουν το μεγαλύτερο μικροβιακό φορτίο, με αυξημένα ποσοστά εκτός ορίων, είναι τα sandwiches, οι φρέσκες σαλάτες και τα σφολιατοειδή πριν τη θερμική επεξεργασία (56%, 46%, 63% αντίστοιχα). Κύρια αιτία της υψηλής παρουσίας *S.aureus* είναι η έλλειψη κανόνων προσωπικής-ατομικής υγιεινής, ενώ η απουσία διαδικασιών απολύμανσης λαχανικών οδηγεί στην παρουσία *E.coli* και *L.monocytogenes*. Επιπρόσθετα, η έλλειψη οργανωμένων, ολοκληρωμένων και αυτοελεγχόμενων προγραμμάτων καθαρισμού-εξυγίανσης στις εγκαταστάσεις, τους εξοπλισμούς, τα εργαλεία, τα σκεύη και τις επιφάνειες εργασίας, έχει σαν αποτέλεσμα αυξημένο κίνδυνο διασταυρωμένης επιμόλυνσης (*E.coli*, *L.monocytogenes*).

Πίνακας 14. Μικροβιολογική εικόνα μενού σε μονάδες fast food που δεν εφαρμόζουν συστήματα προληπτικής υγιεινής HACCP (5 επιχειρήσεις)

| Είδος Α' ύλης | Μικροβιολογική εικόνα ανά μικροβιολογική παράμετρο | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------------------------------------|----------------------------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------------------|-----------|-----------|-----------|------------------------|-----------|-----------|-----------|----------------|-------|---|------|------------------------|
| | Σύνολο δειγμάτων | E.coli | | | | Staphylococcus aureus | | | | Listeria monocytogenes | | | | Salmonella spp | | | | Συνολικό % εκτός ορίων |
| | | Εντός (%) | Εκτός (%) | Εντός (%) | Εκτός (%) | Εντός (%) | Εκτός (%) | Εντός (%) | Εκτός (%) | Εντός (%) | Εκτός (%) | Εντός (%) | Εκτός (%) | | | | | |
| Ζεστές παρασκευές | 92 | 92 | 100,0 | 0 | 0,0 | 88 | 95,7 | 4 | 4,3 | 92 | 100,0 | 0 | 0,0 | 92 | 100,0 | 0 | 0,0 | 2,21 |
| Sandwiches | 96 | 66 | 68,8 | 30 | 31,3 | 61 | 63,5 | 35 | 36,5 | 59 | 61,5 | 37 | 38,5 | 96 | 100,0 | 0 | 0,0 | 56,35 |
| Φρέσκες σαλάτες | 84 | 57 | 67,9 | 27 | 32,1 | 67 | 79,8 | 17 | 20,2 | 44 | 52,4 | 40 | 47,6 | 84 | 100,0 | 0 | 0,0 | 46,41 |
| Ορεκτικές σαλάτες | 90 | 90 | 100,0 | 0 | 0,0 | 90 | 100,0 | 0 | 0,0 | 81 | 90,0 | 9 | 10,0 | 90 | 100,0 | 0 | 0,0 | 4,97 |
| Τυροκομικά | 97 | 90 | 92,8 | 7 | 7,2 | 81 | 83,5 | 16 | 16,5 | 91 | 93,8 | 6 | 6,2 | 97 | 100,0 | 0 | 0,0 | 16,02 |
| Κρεατοσκευάσματα | 95 | 95 | 100,0 | 0 | 0,0 | 80 | 84,2 | 15 | 15,8 | 81 | 85,3 | 14 | 14,7 | 95 | 100,0 | 0 | 0,0 | 16,02 |
| Προϊόντα ζαχαροπλαστικής | 77 | 77 | 100,0 | 0 | 0,0 | 77 | 100,0 | 0 | 0,0 | ∅ | ∅ | ∅ | ∅ | 77 | 100,0 | 0 | 0,0 | 0,00 |
| Θερμικά επεξεργασμένα σφολιατοιειδή | 105 | 105 | 100,0 | 0 | 0,0 | 105 | 100,0 | 0 | 0,0 | 105 | 100,0 | 0 | 0,0 | 105 | 100,0 | 0 | 0,0 | 0,00 |
| Σφολιατοιειδή πριν θερμική επεξεργασία | 93 | 50 | 53,8 | 43 | 46,2 | 67 | 72,0 | 26 | 28,0 | 48 | 51,6 | 45 | 48,4 | 93 | 100,0 | 0 | 0,0 | 62,98 |
| ΣΥΝΟΛΟ | 557 | 507 | 91,02 | 50 | 8,98 | 500 | 89,77 | 57 | 10,23 | 406 | 84,58 | 74 | 15,42 | 557 | 100,0 | 0 | 0,00 | 100 |

∅: δεν έγινε ανάλυση

Η εφαρμογή συστήματος προληπτικής υγιεινής σε 3 επιχειρήσεις catering δείχνει να έχει εξαιρετικά αποτελέσματα, αφού σε όλα τα δείγματα των τροφίμων που αναλύθηκαν τα ποσοστά εντός ορίων είναι από 95,3% έως 100% για όλες τις μικροβιολογικές παραμέτρους. Η έγκαιρη ανάπτυξη εφαρμογής συστήματος HACCP και η πίεση εφαρμογής από τις αεροπορικές εταιρίες που τροφοδοτούν οδήγησε στην εικόνα υψηλού επιπέδου υγιεινής. Η παρουσία *L.monocytogenes* εξηγείται από το γεγονός ότι είναι ένας δύσκολος ψυχρότροφος και εύκολα προσαρμοσμένος μικροοργανισμός σε ψυχρά και υγρά περιβάλλοντα που επικρατούν στους χώρους αποθήκευσης και service φρέσκων λαχανικών και φρέσκων σύνθετων σαλατών. Δεδομένου ότι η είσοδος της στις επιχειρήσεις είναι δύσκολο να περιορισθεί δραστικά λόγω της παρουσίας της στις ωμές πρώτες ύλες (λαχανικά, ωμά κρέατα).

Πίνακας 15. Μικροβιολογική εικόνα μενού σε μονάδες catering που εφαρμόζουν συστήματα προληπτικής υγιεινής (3 επιχειρήσεις)

| Είδος Α' ύλης | Μικροβιολογική εικόνα ανά μικροβιολογική παράμετρο | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------------------------------|----------------------------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------------------|-----------|-----------|-----------|------------------------|-----------|-----------|-----------|----------------|-------|---|-----|
| | Σύνολο δειγμάτων | E.coli | | | | Staphylococcus aureus | | | | Listeria monocytogenes | | | | Salmonella spp | | | |
| | | Εντός (%) | Εκτός (%) | Εντός (%) | Εκτός (%) | Εντός (%) | Εκτός (%) | Εντός (%) | Εκτός (%) | Εντός (%) | Εκτός (%) | Εντός (%) | Εκτός (%) | | | | |
| Ζεστές παρασκευές | 144 | 144 | 100,0 | 0 | 0,0 | 144 | 100,0 | 0 | 0,0 | 144 | 100,0 | 0 | 0,0 | 144 | 100,0 | 0 | 0,0 |
| Κρύες παρασκευές | 108 | 105 | 97,2 | 3 | 2,8 | 102 | 94,4 | 6 | 5,6 | 98 | 90,7 | 10 | 9,3 | 108 | 100,0 | 0 | 0,0 |
| Φρέσκες σαλάτες | 86 | 86 | 100,0 | 0 | 0,0 | 86 | 100,0 | 0 | 0,0 | 80 | 93,0 | 6 | 7,0 | 86 | 100,0 | 0 | 0,0 |
| Γλυκά με βάση την κρέμα | 97 | 97 | 100,0 | 0 | 0,0 | 97 | 100,0 | 0 | 0,0 | ∅ | ∅ | ∅ | ∅ | 97 | 100,0 | 0 | 0,0 |
| ΣΥΝΟΛΟ | 435 | 432 | 99,3 | 3 | 0,7 | 429 | 98,6 | 6 | 1,4 | 322 | 95,3 | 16 | 4,7 | 435 | 100,0 | 0 | 0,0 |

∅: δεν έγινε ανάλυση

Ο πίνακας 16 αφορά σε μονάδες catering που δεν εφαρμόζουν συστήματα προληπτικής υγιεινής (3 επιχειρήσεις) και φαίνεται ότι τα ποσοστά εντός ορίων μειώνονται και κυμαίνονται μεταξύ 76,2% και 86,8% για την *E.coli*, *S.aureus* και *L.monocytogenes*. Περίπου το 97% των συνολικών δειγμάτων εκτός ορίων προέρχεται από τις ‘κρύες παρασκευές’ και τις ‘φρέσκιες σαλάτες’. Οι αιτίες για την υποβάθμιση της μικροβιολογικής εικόνας είναι: η μη εφαρμογή ολοκληρωμένου και οργανωμένου συστήματος προληπτικής υγιεινής, με αποτέλεσμα αυξημένο κίνδυνο επιμόλυνσης των τελικών μενού από το περιβάλλον εργασίας (σκεύη, εργαλεία, επιφάνειες εργασίας), η απουσία διαδικασιών απολύμανσης λαχανικών και φρούτων, οι ανεπαρκείς εκπαίδευση προσωπικού στους κανόνες υγιεινής και οι ανεπαρκείς συντήρηση εξοπλισμών και εγκαταστάσεων. Ακόμη η ευθύνη των πελατών των επιχειρήσεων αυτών έγκειται στις χαμηλές απαιτήσεις και την άγνοια των οδηγιών της ΕΚ 178/2002 που επιβάλλει την υποχρεωτική εφαρμογή συστήματος HACCP στις επιχειρήσεις παραγωγής τροφίμων

Πίνακας 16. Μικροβιολογική εικόνα μενού σε μονάδες catering που δεν εφαρμόζουν συστήματα προληπτικής υγιεινής (3 επιχειρήσεις)

| Είδος Α' ύλης | Μικροβιολογική εικόνα ανά μικροβιολογική παράμετρο | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------------------------|----------------------------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------------------|-----------|-----------|-----------|------------------------|-----------|-----------|-----------|----------------|-------|---|-----|------------------------|
| | Σύνολο δειγμάτων | E.coli | | | | Staphylococcus aureus | | | | Listeria monocytogenes | | | | Salmonella spp | | | | Συνολικό % εκτός ορίων |
| | | Εντός (%) | Εκτός (%) | Εντός (%) | Εκτός (%) | Εντός (%) | Εκτός (%) | Εντός (%) | Εκτός (%) | Εντός (%) | Εκτός (%) | Εντός (%) | Εκτός (%) | | | | | |
| Ζεστές παρασκευές | 88 | 88 | 100,0 | 0 | 0,0 | 88 | 100,0 | 0 | 0,0 | 88 | 100,0 | 0 | 0,0 | 88 | 100,0 | 0 | 0,0 | 0,00 |
| Κρύες παρασκευές | 93 | 73 | 78,5 | 20 | 21,5 | 70 | 75,3 | 23 | 24,7 | 63 | 67,7 | 30 | 32,3 | 93 | 100,0 | 0 | 0,0 | 44,51 |
| Φρέσκες σαλάτες | 101 | 71 | 70,3 | 30 | 29,7 | 82 | 81,2 | 19 | 18,8 | 64 | 63,4 | 37 | 36,6 | 101 | 100,0 | 0 | 0,0 | 52,44 |
| Γλυκά με βάση την κρέμα | 75 | 75 | 100,0 | 0 | 0,0 | 70 | 93,3 | 5 | 6,7 | ∅ | ∅ | ∅ | ∅ | 75 | 100,0 | 0 | 0,0 | 3,05 |
| ΣΥΝΟΛΟ | 357 | 307 | 86,0 | 50 | 14,0 | 310 | 86,8 | 47 | 13,2 | 215 | 76,2 | 67 | 23,8 | 357 | 100,0 | 0 | 0,0 | 100,00 |

∅: δεν έγινε ανάλυση

Ο πίνακας 17 παρουσιάζει την μικροβιολογική εικόνα περιβάλλοντος σε μονάδες μαζικής εστίασης που εφαρμόζουν συστήματα προληπτικής υγιεινής (24 επιχειρήσεις). Όπως φαίνεται το σύστημα προληπτικής υγιεινής λειτουργεί αποτελεσματικά και τα ποσοστά απουσίας μικροβιακών παραμέτρων κυμαίνονται από 91,1% έως 98,7%. Επίσης, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι ο πιο συχνά εμφανιζόμενος μικροοργανισμός είναι η *Listeria monocytogenes* με ποσοστό 8,9% και με συχνότερη εμφάνιση στις κοπτικές μηχανές των λαχανικών (18,4% παρουσία). Η επιμονή της παρουσίας *L. monocytogenes* εξηγείται στο ότι είναι δύσκολο να αποκλειστεί η είσοδος της στις εγκαταστάσεις λόγω του ότι απομονώνεται στις ωμές πρώτες ύλες (κρέατα, λαχανικά). Η δυσκολία στην αντιμετώπισή της οφείλεται στην διασταύρωση διεργασιών παραγωγής με τμήματα αποθήκευσης και αρχικής επεξεργασίας που έχουν αναπόφευκτα βαριά περιβαλλοντική μόλυνση με *L. monocytogenes*. Αφετέρου, και στην δυσκολία πλήρους εξαφάνισης της λόγω δημιουργίας οικολογικών φωλιών στα δάπεδα, στις δύσκολα καθοριζόμενες επιφάνειες καθώς και στους υγρούς, ψυχρούς χώρους (ψυγεία) και στα εργαλεία επεξεργασίας ωμών πρώτων υλών (κοπτικές μηχανές κρεάτων- λαχανικών).

Πίνακας 17. Μικροβιολογική εικόνα περιβάλλοντος σε μονάδες μαζικής εστίασης που εφαρμόζουν συστήματα προληπτικής υγιεινής (24 επιχειρήσεις)

| Σημείο δειγματοληψίας μετά από διαδικασία καθαρισμού | Μικροβιολογική εικόνα ανά παράμετρο υγιεινής | | | | | | | | | | | | | |
|------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|----------------|-----------------|----------------|-----------------|----------------|-----------------|----------------|-----------------|------------------------|-------|----|------|--------------------------------|
| | Σύνολο δειγμάτων | E.coli | | | | Coliforms | | | | Listeria monocytogenes | | | | Συνολικό % παρουσία ς |
| | | Απουσία (%) | Παρουσία (%) | Απουσία (%) | Παρουσία (%) | Απουσία (%) | Παρουσία (%) | Απουσία (%) | Παρουσία (%) | | | | | |
| Πάγκοι εργασίας | 87 | 83 | 95,4 | 4 | 4,6 | 83 | 95,4 | 4 | 4,6 | 77 | 88,5 | 10 | 11,5 | 26,1 |
| Slicer τυριών | 51 | 51 | 100,0 | 0 | 0,0 | 51 | 100,0 | 0 | 0,0 | 51 | 100,0 | 0 | 0,0 | 0,0 |
| Slicer κρεατοσκευασμάτων | 60 | 60 | 100,0 | 0 | 0,0 | 60 | 100,0 | 0 | 0,0 | 50 | 83,3 | 10 | 16,7 | 14,5 |
| Γαστρονομία | 54 | 54 | 100,0 | 0 | 0,0 | 54 | 100,0 | 0 | 0,0 | 54 | 100,0 | 0 | 0,0 | 0,0 |
| Μαχαίρια | 82 | 82 | 100,0 | 0 | 0,0 | 82 | 100,0 | 0 | 0,0 | 78 | 95,1 | 4 | 4,9 | 5,8 |
| Επιφάνειες ψυγείων | 48 | 48 | 100,0 | 0 | 0,0 | 44 | 91,7 | 4 | 8,3 | 40 | 83,3 | 8 | 16,7 | 17,4 |
| Επιφάνειες βαρέων σκευών | 53 | 53 | 100,0 | 0 | 0,0 | 53 | 100,0 | 0 | 0,0 | 53 | 100,0 | 0 | 0,0 | 0,0 |
| Κοπτικές μηχανές λαχανικών | 49 | 46 | 93,9 | 3 | 6,1 | 46 | 93,9 | 3 | 6,1 | 40 | 81,6 | 9 | 18,4 | 21,7 |
| Κοπτικές μηχανές κρεάτων | 53 | 53 | 100,0 | 0 | 0,0 | 50 | 94,3 | 3 | 5,7 | 46 | 86,8 | 7 | 13,2 | 14,5 |
| ΣΥΝΟΛΟ | 537 | 530 | 98,7 | 7 | 1,3 | 523 | 97,4 | 14 | 2,6 | 489 | 91,1 | 48 | 8,9 | 100,0 |

Τέλος, στον πίνακα 18 παρουσιάζεται η μικροβιολογική εικόνα περιβάλλοντος σε 18 επιχειρήσεις μαζικής εστίασης που δεν εφαρμόζουν συστήματα προληπτικής υγιεινής HACCP. Σε ότι αφορά την *E.coli*, το ποσοστό παρουσίας της σε όλα τα σημεία δειγματοληψίας, μετά από τη διαδικασία καθαρισμού, φτάνουν το 29,3%, με μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης στις κοπτικές μηχανές των λαχανικών (50% ποσοστό παρουσίας). Αντίστοιχα, τα *Coliforms* και η *Listeria monocytogenes* μετρήθηκαν σε ποσοστό περίπου 31%. Συνολικά, τα μεγαλύτερα ποσοστά παρουσίας μετρήθηκαν σε δείγματα που ελήφθησαν από τις κοπτικές μηχανές λαχανικών, μαχαίρια και κοπτικές μηχανές κρεάτων (17,4%, 15,5%, 15% ποσοστό παρουσίας αντίστοιχα).

Η έλλειψη οργανωμένου πλάνου διαδικασιών εξυγίανσης χώρων παραγωγής, επιφανειών και σκευών εργασίας οδηγεί σε: ανάπτυξη οικολογικών «φωλεών» για τα δύσκολα ελεγχόμενα τροφογενή παθογόνα όπως η *L.monocytogenes*, λόγω αυξημένης πιθανότητας δημιουργίας βιολογικών φορτίων στους μη αποτελεσματικά εξυγιασμένους χώρους παραγωγής. Τέλος, η έλλειψη διαχωρισμού χώρων παραγωγής με υψηλές πιθανότητες ρύπανσης (κρεοπωλεία, χώροι επεξεργασίας λαχανικών) από χώρους που επεξεργάζονται θερμικά επεξεργασμένα τρόφιμα ή ευάλωτα τρόφιμα όπως ορεκτικές σαλάτες και σύνθετες σαλάτες, οδηγεί σε διασπορά των μικροοργανισμών δεικτών υγιεινής (*E.coli*, *Coliforms*) και τροφογενών παθογόνων (*L.monocytogenes*) με αυξημένο κίνδυνο διασπαρμένων μολύνσεων των χειριζόμενων τροφίμων.

Πίνακας 18. Μικροβιολογική εικόνα περιβάλλοντος σε μονάδες μαζικής εστίασης που δεν εφαρμόζουν συστήματα προληπτικής υγιεινής (18 επιχειρήσεις)

| Σημείο δειγματοληψίας μετά από διαδικασία καθαρισμού | Μικροβιολογική εικόνα ανά παράμετρο υγιεινής | | | | | | | | | | | | | |
|------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|----------------|-----------------|----------------|-----------------|----------------|-----------------|------------------------|-----------------|-----|------|--------------------------------|------|-------|
| | Σύνολο δειγμάτων ν | E.coli | | Coliforms | | | | Listeria monocytogenes | | | | Συνολικό % παρουσία ς | | |
| | | Απουσία (%) | Παρουσία (%) | Απουσία (%) | Παρουσία (%) | Απουσία (%) | Παρουσία (%) | Απουσία (%) | Παρουσία (%) | | | | | |
| Πάγκοι εργασίας | 55 | 37 | 67,3 | 18 | 32,7 | 34 | 61,8 | 21 | 38,2 | 34 | 61,8 | 21 | 38,2 | 14,5 |
| Slicer τυριών | 47 | 38 | 80,9 | 9 | 19,1 | 37 | 78,7 | 10 | 21,3 | 40 | 85,1 | 7 | 14,9 | 6,3 |
| Slicer κρεατοσκευασμάτων | 49 | 30 | 61,2 | 19 | 38,8 | 29 | 59,2 | 20 | 40,8 | 31 | 63,3 | 18 | 36,7 | 13,8 |
| Γαστρονομία | 52 | 48 | 92,3 | 4 | 7,7 | 50 | 96,2 | 2 | 3,8 | 50 | 96,2 | 2 | 3,8 | 1,9 |
| Μαχαίρια | 66 | 46 | 69,7 | 20 | 30,3 | 48 | 72,7 | 18 | 27,3 | 40 | 60,6 | 26 | 39,4 | 15,5 |
| Επιφάνειες ψυγείων | 39 | 29 | 74,4 | 10 | 25,6 | 25 | 64,1 | 14 | 35,9 | 22 | 56,4 | 17 | 43,6 | 9,9 |
| Επιφάνειες βαρέων σκευών | 50 | 40 | 80,0 | 10 | 20,0 | 38 | 76,0 | 12 | 24,0 | 48 | 96,0 | 2 | 4,0 | 5,8 |
| Κοπτικές μηχανές λαχανικών | 42 | 21 | 50,0 | 21 | 50,0 | 17 | 40,5 | 25 | 59,5 | 16 | 38,1 | 26 | 61,9 | 17,4 |
| Κοπτικές μηχανές κρεάτων | 47 | 27 | 57,4 | 20 | 42,6 | 30 | 63,8 | 17 | 36,2 | 22 | 46,8 | 25 | 53,2 | 15,0 |
| ΣΥΝΟΛΟ | 447 | 316 | 70,7 | 131 | 29,3 | 308 | 68,9 | 139 | 31,1 | 303 | 67,8 | 144 | 32,2 | 100,0 |

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα μελέτη έγινε μικροβιολογικός και ποιοτικός έλεγχος σε 112 επιχειρήσεις μαζικής εστίασης (64 εφάρμοζαν HACCP και 48 όχι). Έγινε σύγκριση των επιχειρήσεων μαζικής εστίασης (8 επιχειρήσεις Fast Food, 28 Ξενοδοχεία, 6 εταιρίες Catering, 28 επιχειρήσεις μαζικής εστίασης σε σχέση με τις πρώτες ύλες, 42 μονάδες μαζικής εστίασης σε σχέση με το περιβάλλον εργασίας) σε ότι αφορά την εφαρμογή του Συστήματος Προληπτικής Υγιεινής HACCP.

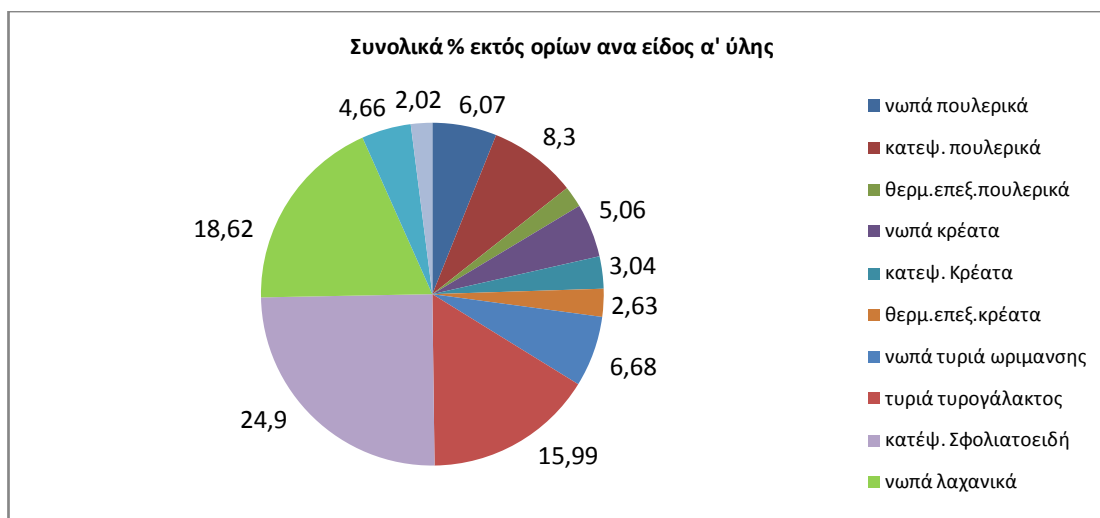
Η έρευνα είχε σαν στόχο τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας εφαρμογής των Ορθών Πρακτικών Παραγωγής σε επιχειρήσεις μαζικής εστίασης που εφαρμόζουν Συστήματα Προληπτικής Υγιεινής HACCP και τη σύγκριση της εικόνας των επιχειρήσεων αυτών με επιχειρήσεις που δεν εφαρμόζουν στις παραγωγικές τους διαδικασίες το σύστημα HACCP. Εκτιμήθηκαν οι παράγοντες και οι διαδικασίες που συμβάλλουν σε αυξημένες πιθανότητες εμφάνισης κινδύνου μικροβιολογικής ασφάλειας στα παραπάνω συστήματα μαζικής εστίασης.

Τα αποτελέσματα της έρευνας οδήγησαν σε προτάσεις εφαρμογής μέτρων και πρακτικών που θα συμβάλλουν στην βελτίωση της υγειονομικής ασφάλειας, στις διαδικασίες και τα παραγόμενα προϊόντα σε συστήματα μαζικής εστίασης.

Η δειγματοληψία σε πρώτες ύλες έδωσε έμφαση σε υλικά που θα υποστούν ελάχιστες περαιτέρω βακτηριοκτόνες διαδικασίες (minimal processing procedures) χωρίς επιπλέον θερμική επεξεργασία, όπως τα τυροκομικά (νωπά τυριά, τυριά τυρογάλακτος) και τα ωμά λαχανικά. Σκοπός είναι να ελεγχθεί αυστηρά η συμμόρφωση των παραγωγών με νομοθετικές απαιτήσεις μικροβιολογικής ασφάλειας.

Οι υπόλοιπες πρώτες ύλες όπως κρεατικά (νωπά, κατεψυγμένα, θερμικά επεξεργασμένα), κατεψυγμένα σφολιατοειδή, κατεψυγμένα γλυκά, σκόνες ζαχαροπλαστικής και μπαχαρικά, ελέγχονταν με σκοπό να εκτιμηθεί η ποιότητα των διαδικασιών παραγωγής σε επίπεδο προμηθευτών και παραγωγών, καθώς και η συμμόρφωσή τους σε αντίστοιχες νομοθετικές απαιτήσεις, παρότι υφίστανται περαιτέρω θερμική επεξεργασία. Όπως φαίνεται και από το γράφημα (Εικόνα 13), με ποσοστό **24,9%** εκτός ορίων έρχονται πρώτα τα κατεψυγμένα σφολιατοειδή. Ακολουθούν τα νωπά λαχανικά με **18,62%** και τα τυριά τυρογάλακτος με **15,99%**. Τα μεγάλα αυτά ποσοστά είναι αποτέλεσμα των μη ασφαλών προμηθευτών που δεν

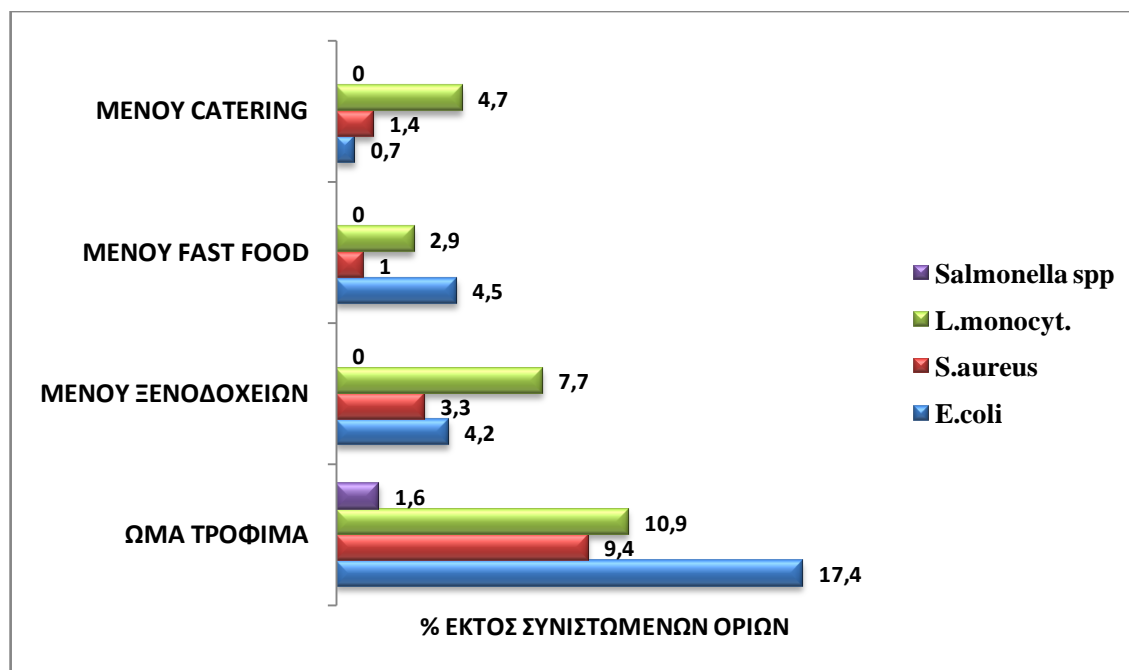
χρησιμοποιούν οργανωμένο και τεκμηριωμένο σύστημα προληπτικής υγιεινής για την βελτίωση των προϊόντων τους.



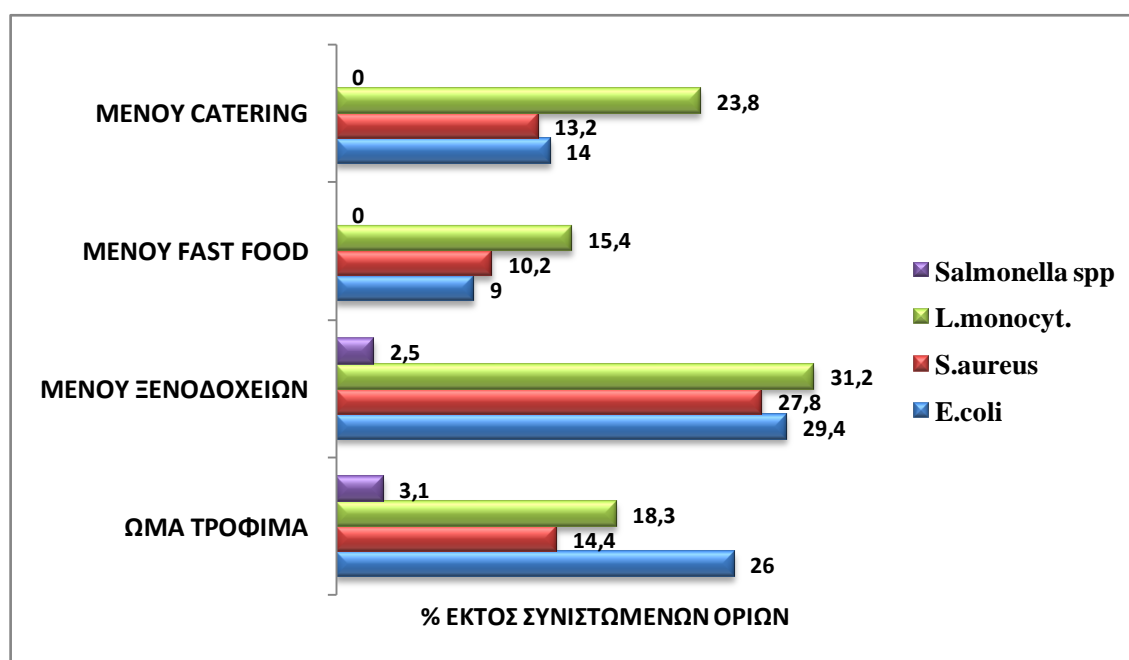
Εικόνα 13. % Κατανομή των δειγμάτων που βρέθηκαν εκτός συνιστώμενων ορίων ανά είδος πρώτης ύλης ωμών τροφίμων που εισέρχονται σε μονάδες μαζικής εστίασης που δεν χρησιμοποιούν HACCP (πίνακας 10)

Η προμήθεια πρώτων και δεύτερων υλών από μη ασφαλείς προμηθευτές, έχει σαν αποτέλεσμα τα αυξημένα ποσοστά δειγμάτων εκτός προδιαγραφών μικροβιολογικής ασφάλειας, κυρίως στα ωμά τρόφιμα που εισέρχονται σε μονάδες μαζικής εστίασης. Εδώ, η *E.coli* φτάνει το **26%**, η *L. monocytogenes* το **18,3%** και ο *S. aureus* το **14,4%** έναντι των **17,4%**, **10,9%**, **9,4%** για κάθε μικρόβιο αντίστοιχα σε μονάδες που προμηθεύονται από ασφαλείς προμηθευτές (Εικόνα 14, 15).

Από την εκτίμηση των αποτελεσμάτων, φαίνεται ότι η εφαρμογή συστήματος προληπτικής υγιεινής σε επιχειρήσεις μαζικής εστίασης έχει σαν συνέπεια την εντυπωσιακή βελτίωση της μικροβιολογικής ασφάλειας καθώς και της ποιότητας των εισερχομένων πρώτων και δεύτερων υλών. Απόρροια της χρήσης HACCP είναι η επιλογή προμηθευτών που εφαρμόζουν σύστημα ποιότητας και υγιεινής με ταυτόχρονη βελτίωση του υγειονομικού επιπέδου των εισερχομένων πρώτων και δεύτερων υλών τροφίμων, και τον περιορισμό διασποράς παθογόνων μικροοργανισμών στις διαδικασίες παραγωγής.



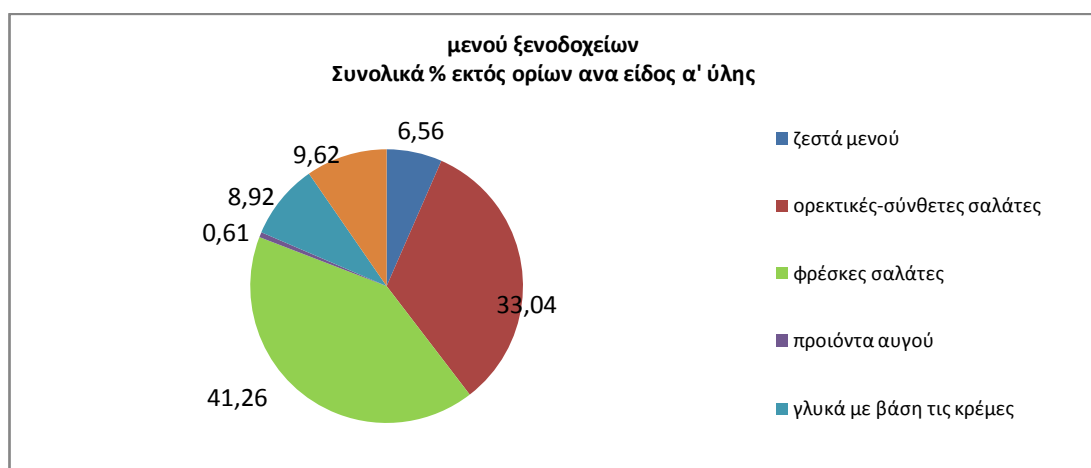
Εικόνα 14. Γραφική παρουσίαση συνολικών ποσοστών εκτός ορίων για τις μελετώμενες μικροβιολογικές παραμέτρους σε επιχειρήσεις που χρησιμοποιούν HACCP (πίνακας 9, 11, 13, 15)



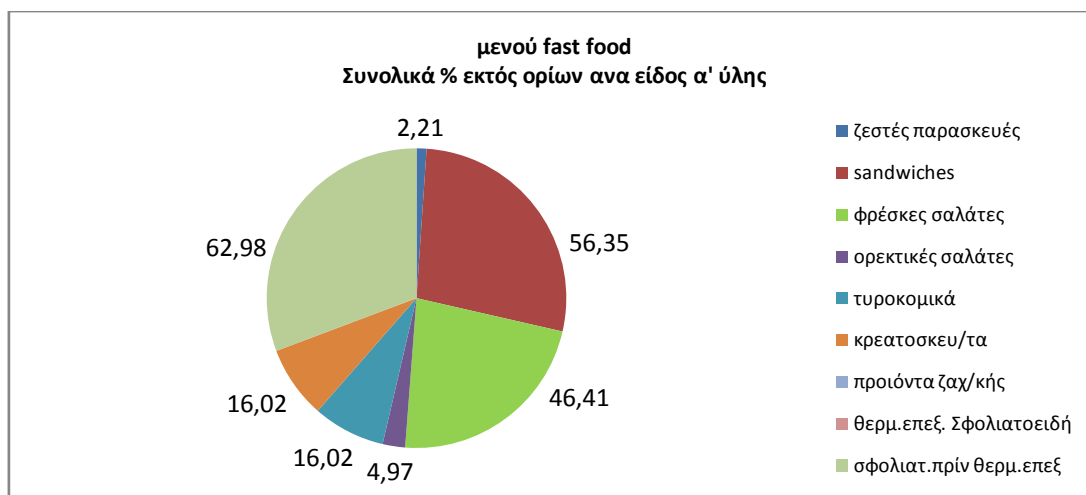
Εικόνα 15. Γραφική παρουσίαση συνολικών ποσοστών εκτός ορίων για τις μελετώμενες μικροβιολογικές παραμέτρους σε επιχειρήσεις που δεν χρησιμοποιούν HACCP (πίνακες 10, 12, 14, 16)

Τα μενού ξενοδοχείων που δεν εφαρμόζουν συστήματα προληπτικής υγιεινής έρχονται πρώτα σε μόλυνση με ποσοστά που αγγίζουν το **30%** για την *E.coli*, **31%** για *L.monocytogenes* και **28%** για τον *S. Aureus*. Τα υψηλά ποσοστά παρουσίας *E.coli* και *L.monocytogenes* οφείλονται στην μη εφαρμογή διαδικασιών απολύμανσης των

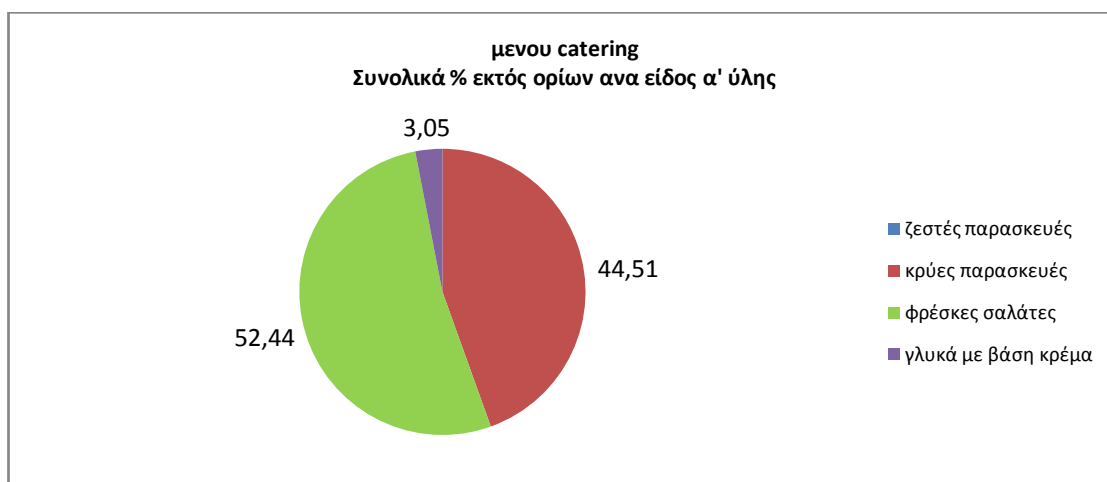
λαχανικών που χρησιμοποιούνται σαν συστατικά σε φρέσκες και σύνθετες σαλάτες. Επίσης, αυτό παρατηρείται στο μενού των επιχειρήσεων fast food και catering που δεν εφαρμόζουν συστήματα προληπτικής υγιεινής. Έτσι, τα υψηλότερα ποσοστά εκτός συνιστώμενων ορίων εμφανίζονται σε δείγματα από σαλάτες (**41%, 46% και 52%** σε μενού ξενοδοχείων, fast food και catering αντίστοιχα) (Εικόνες 16, 17, 18). Εξαιτίας του μοντέρνου τρόπου ζωής και της υψηλής θρεπτικής αξίας, η κατανάλωση των φρέσκων σαλατών και των έτοιμων-προς-κατανάλωση γευμάτων (ready-to-eat meals) λαχανικών αυξάνεται συνεχώς. Έτσι, τα τρόφιμα αυτά είναι αυξημένης επικινδυνότητας, λόγω του υψηλού μικροβιακού τους φορτίου. Συγκεκριμένα, μελέτες υποδεικνύουν τη *Listeria monocytogenes* ως τη συχνότερη μικροβιολογική παράμετρο, που μπορεί να προκαλέσει ανεπιθύμητες επιδράσεις στον καταναλωτή (Little CL, 2009). Αντίστοιχα, οι M.De Giusti και συν, 2008 έδειξαν ότι τα προϊόντα που παρήχθησαν με διαδικασίες GAP (Good Agricultural Practices), GMP (Good Manufacturing Practices) και HACCP έχουν καλύτερη μικροβιολογική εικόνα από εκείνα που παρήχθησαν με άλλους τρόπους σταθεροποίησης του μικροβιολογικού φορτίου (φυσικό η χημικό). (De Giusti M, 2008).



Εικόνα 16. % Κατανομή των δειγμάτων που βρέθηκαν εκτός συνιστώμενων ορίων ανά είδος α' ύλης σε μενού ξενοδοχείων που δεν χρησιμοποιούν HACCP (πίνακας 12)



Εικόνα 17. % Κατανομή των δειγμάτων που βρέθηκαν εκτός συνιστώμενων ορίων ανά είδος α' ύλης σε μενού fast food που δεν χρησιμοποιούν HACCP (πίνακας 14)



Εικόνα 18. % Κατανομή των δειγμάτων που βρέθηκαν εκτός συνιστώμενων ορίων ανά είδος α' ύλης σε μενού catering που δεν χρησιμοποιούν HACCP (πίνακας 16)

Εξαιτίας της μη χρήσης προγράμματος προληπτικής υγιεινής HACCP, υπάρχει χαμηλό ποσοστό εφαρμογής μέτρων ατομικής υγιεινής (π.χ. γάντια μιας χρήσης) αλλά και επιμολύνσεις τροφίμων από μη καλά εξυγιανθέντα σκεύη λόγω έλλειψης καλά οργανωμένων προγραμμάτων εξυγίανσης.

Η συμβολή του συστήματος προληπτικής υγιεινής HACCP, παρατηρείται στην βελτίωση του σχεδιασμού και της λειτουργικότητας των επιχειρήσεων. Η αποτελεσματική συντήρηση των εγκαταστάσεων και των εξοπλισμών της παραγωγής γευμάτων μειώνει τον κίνδυνο επιμόλυνσης των τροφίμων.

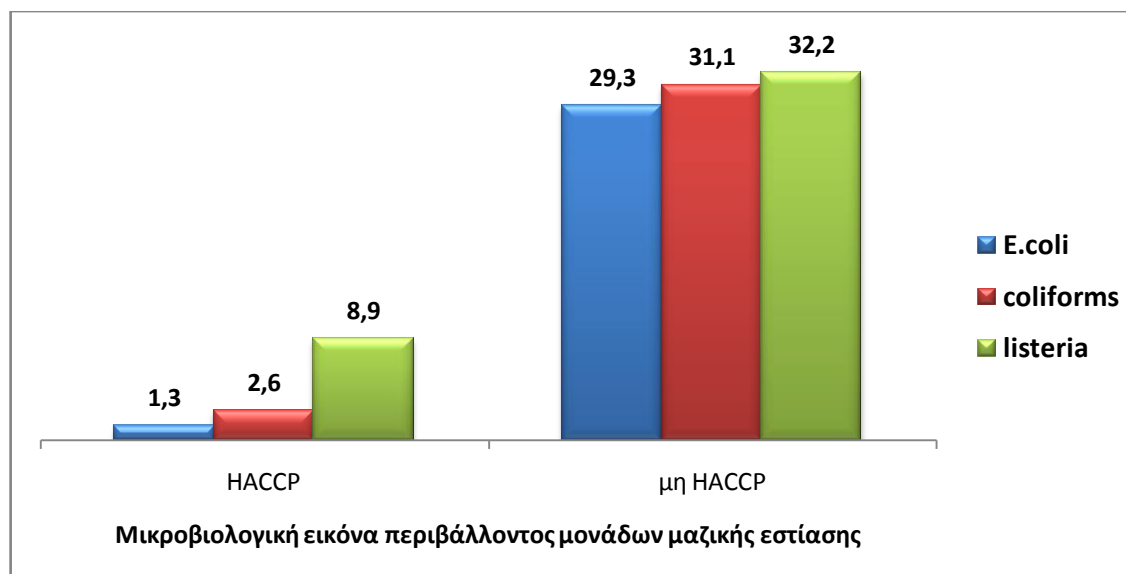
Παράλληλα, η διαρκής εκπαίδευση του προσωπικού συμβάλλει στη γνώση και την εφαρμογή ορθών υγειονομικών πρακτικών ατομικής υγιεινής και ορθή πρακτική υγιεινής παραγωγής. Έτσι ελαχιστοποιείται ο κίνδυνος μόλυνσης των τροφίμων από το

εργατικό προσωπικό, με χαρακτηριστικό παράδειγμα τα μειωμένα συνολικά ποσοστά εκτός ορίων και αντίστοιχα τα αυξημένα ποσοστά εντός ορίων.

Η εφαρμογή ολοκληρωμένου προγράμματος εξυγίανσης στις εγκαταστάσεις και τον εξοπλισμό, παρεμποδίζει την εγκατάσταση μικροβιακών ρύπων σε εξοπλισμούς και χώρους παραγωγής. Τέλος, με διαρκείς διαδικασίες εσωτερικών ελέγχων που «εποπτεύουν» την σταθερότητα της εφαρμογής των ορθών υγειονομικών πρακτικών παραγωγής τροφίμων περιορίζεται σημαντικά ο κίνδυνος μελλοντική μόλυνσης των τροφίμων.

Ο αυξημένος μικροβιολογικός κίνδυνος που προκύπτει από τη μη εφαρμογή συστημάτων προληπτικής υγιεινής αφορά σε συγκεκριμένες παραμέτρους. Συγκεκριμένα η ανεπάρκεια εκπαιδευτικών προγραμμάτων ή η απουσία εκπαίδευσης, για το προσωπικό που χειρίζεται τρόφιμα, πάνω σε κανόνες και ορθές πρακτικές υγιεινής. Ακόμη, ουσιαστικό ρόλο παίζει η άγνοια των διοικήσεων για την σημασία και την ευθύνη της εφαρμογής συστημάτων προληπτικής υγιεινής στις παραγωγικές διαδικασίες. Τέλος, η χρήση εξοπλισμών και εγκαταστάσεων ανεπαρκώς συντηρημένων, χαμηλού υγειονομικού επιπέδου και ανεπαρκώς σχεδιασμένων, έχει σαν αποτέλεσμα να αφθονούν οι ευκαιρίες διασποράς μολύνσεων στην παραγωγική διαδικασία.

Η μικροβιολογική εικόνα του περιβάλλοντος επιχειρήσεων που εφαρμόζουν συστήματα προληπτικής υγιεινής είναι σύμφωνη με τις προδιαγραφές μικροβιολογικής ασφάλειας. Η εφαρμογή ολοκληρωμένων και καλά τεκμηριωμένων προγραμμάτων εξυγίανσης οδηγεί σε υψηλό επίπεδο αποτελεσματικότητας εξυγιάνσεων. Ο διαχωρισμός ζωνών και εξοπλισμών υψηλής επικινδυνότητας έχει σαν αποτέλεσμα τον περιορισμό της πιθανότητας διασταυρωμένων μολύνσεων (cross contamination). Παρόλαυτα, η ανάλυση δειγμάτων από το περιβάλλον των μονάδων, που εφαρμόζουν σύστημα HACCP, μετά από τον καθαρισμό τους, έδειξε συνολικά ποσοστά παρουσίας *L.monocytogenes* ίσα με **8,9%**. Η υψηλή παρουσία *L.monocytogenes* οφείλεται στο ότι είναι δύσκολα ελεγχόμενος περιβαλλοντικός μικροβιακός ρύπος που μεταφέρεται κατά την κίνηση του προσωπικού από ζώνες χαμηλού κινδύνου σε ζώνες υψηλού κινδύνου. (Εικόνα 19).



Εικόνα 19. Κατανομή ποσοστού παρουσίας των μικροβιολογικών παραμέτρων σε περιβάλλον μονάδων μαζικής εστίασης που χρησιμοποιούν ή δεν χρησιμοποιούν συστήματα προληπτικής υγιεινής HACCP (πίνακες 17,18)

Αντίθετα, η αποτυχία αποτελεσματικής εξυγίανσης που παρατηρήθηκε στα περιβάλλοντα των μονάδων που δεν εφαρμόζουν συστήματα προληπτικής υγιεινής οφείλεται :

- Στην έλλειψη οργανωμένου, τεκμηριωμένου και συστηματικά αυτοελεγχόμενου συστήματος εξυγιάνσεων με καθορισμό καθηκόντων και διαδικασιών (ποιός- πώς- πότε) και με μεθοδολογίες αυτοελέγχου.
- Στην επιφανειακή και όχι εις βάθος εξυγίανση δύσκολων εξαρτημάτων που απαιτούν αποσυναρμολόγηση και ειδικές διαδικασίες καθαρισμού.
- Στην κοινή χρήση εργαλείων για επεξεργασία θερμικά επεξεργασμένων και ωμών τροφίμων, με αποτέλεσμα τις διασταυρωμένες μολύνσεις (cross contamination).
- Στην απουσία φυσικού διαχωρισμού ζωνών επεξεργασίας υψηλής επικινδυνότητας από τις ζώνες επεξεργασίας τροφίμων χαμηλής επικινδυνότητας. Το δεδομένο αυτό ενισχύεται και από άλλες έρευνες με παρόμοιο στόχο, που υποδεικνύουν ότι η εφαρμογή συστημάτων προληπτικής υγιεινής σε συνδυασμό με τον αυστηρό διαχωρισμό ζωνών, μπορούν να μειώσουν ακόμα περισσότερο τον κίνδυνο επιμόλυνσης (Martinez-Tome M, 2000), (Soriano GM, 2002).
- Τέλος, στην συστηματική χρήση φθαρμένων εργαλείων και εξοπλισμών που δύσκολα καθαρίζονται.

Επειδή οι επιχειρήσεις που αναπτύσσουν και εφαρμόζουν συστήματα προληπτικής υγιεινής HACCP εφαρμόζουν ολοκληρωμένα προγράμματα εξυγίανσης των διαδικασιών παραγωγής, έχουν μειωμένες πιθανότητες να επιτρέψουν δημιουργία εστιών ρύπανσης, εφόσον ακολουθούν κατά γράμμα τις προτεινόμενες διαδικασίες.

Κατά την υλοποίηση του συστήματος προληπτικής υγιεινής, σε μονάδες μαζικής εστίασης, εμφανίζονται μεγάλες δυσκολίες, λόγω της πολλαπλότητας και της πολυπλοκότητας των θεμάτων ασφάλειας και υγιεινής των τροφίμων, αλλά και συμφερόντων που εμπλέκονται, θίγονται και συγκρούονται.

Γι αυτό το λόγο απαιτείται η εγκατάσταση αλλαγών σε διαδικασίες, νοοτροπίες και μεθόδους λειτουργίας, συνολικά και μεθοδευμένα. Το κόστος των επιχειρήσεων για την εφαρμογή συστημάτων προληπτικής υγιεινής, σε επίπεδο οικονομικό, λειτουργικό και ανθρώπινου δυναμικού, φαντάζει μηδαμινό σε σχέση με τα οφέλη για τη δημόσια υγεία. Εξάλλου η εμπειρία έχει δείξει ότι το αρχικό κόστος ανακτάται γρήγορα από τη βελτίωση στην παραγωγικότητα, την ποιότητα και τα λιγότερα παράπονα από τους πελάτες. Οι επιχειρήσεις οφείλουν να εφαρμόζουν τέτοια συστήματα, να τα αξιολογούν, να τα επαναπροσδιορίζουν και να τα επικαιροποιούν, αναπτύσσοντας ουσιώδεις και ευέλικτες διαδικασίες εσωτερικής και εξωτερικής επικοινωνίας με τους φορείς της δημόσιας υγείας.

Βιβλιογραφία

- AOAC, A. ο. (1970). *Official methods of Analysis* (11th εκδ.). Washington DC.
- APHA, A. P. (1976). *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. Washington DC: M.L. Speck.
- APHA., A. P. (1963). *Diagnostic Procedures and Reagents*. (H. a. Coleman, Επιμ.) New York: APHA.
- Baird-Parker, A. (1966). Methods for classifying staphylococci and micrococci. Στο S. F. Gibbs BM, *Identification methods for microbiologists technical series 1* (σσ. 59-64). London: Academic Press.
- Bowmer, E. (1965). Salmonella in food. A review. *J. Milk Fodd Technol.* (28), σσ. 74-86.
- Buchanan, R. G. (1974). *Bergey's manual of determinative bacteriology* (8th εκδ.). Buchanan RE, Gibbons NE.
- Casman SP, B. R. (1965). Detection of staphylococcal enterotoxin in food. *Applied microbiology* (13), σσ. 181-189.
- Chou, C. M. (1969). A comparison of direct plating and enrichment methods for detection and enumeration of coagulase positive staphylococci in frozen foods. *J. Milk Food Technology* (32), σσ. 398-403.
- Clark, O. (1967). Comparison of pour and surface plate methods for the determination of bacterial counts . *Canadian Journal of Microbiology* (12), σσ. 1409-1412.
- Cowan, S. (1974). *Cowan and Steel's Manual for the identification of medical bacteria* (2nd εκδ.). (S. Cowan, Επιμ.) Cambridge University Press.
- Cruickshank, R. D. (1975). *Medical microbiology. Vol. II. The Practice of Medical Microbiology* (12th εκδ.). Churchill-Livingstone. Edinburgh, London, New york.
- D'Aoust, J. M. (2007). Salmonella species. Στο J. M. D'Aoust, *Food microbiology: Fundamentals and frontiers* (σσ. 187-263). ASM Press.
- D'Aoust, J. (2000). Salmonella. Στο B. B.-P. In LUND, *The microbiological safety and quality of food* (σσ. 1233-1299). Aspen Publishers.
- De Giusti M, A. C. (2008). The evaluation of the microbial safety of fresh ready-to-eat vegetables produced by different technologies in Italy. *Journal of applied microbiology* .
- Edwards, P. E. (1972). *Bacteriological Analytical Manual for Foods*. Washington DC: AOAC.
- Ehiri, J. M. (1995). Implementation of HACCP in food business: the way ahead. *Food control* , 6 (6), σσ. 341-345.
- FAO/WHO, J. (1997). *Recommended international code of practice general principles of food hygiene*. Codex Alimentarius Commission.
- FDA, F. a. (1976). *Bacteriological analytical manual for foods*. Washcington: Publications AOAC .

- Gilchrist JE, C. J. (1973, February). Spiral plate method for bacterial determination. *Applied microbiology* , 2 (25), σσ. 244-252.
- Giolitti, G. C. (1966). A medium for the isolation of staphylococci from food stuffs. *Journal of Applied Bacteriology* (29), σσ. 395-398.
- Guzewich, J. (1986). Statewide implementation of a HACCP food service regulatory program. *Journal of environmental health* , 3 (49), σσ. 148-152.
- Harrigan, C. M. (1976). *Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology*. London : Academic Press.
- Hartman, P. H. (1961). Influence of subtle differences in plating procedure on bacterial counts of prepared frozen foods. *Applied Microbiology* , 25, σσ. 244-252.
- Herrera, A. (2004). The hazard analysis and critical control point system in food safety. *Methods in Molecular Biology* (268), σσ. 235-280.
- Huhtanen, P. B. (1972). Effects of time holding dilutions on counts of bacteria from raw milk. *J. Milk food Technology* (35), σσ. 126-130.
- Jayne-Williams, D. (1963). Report of a discussion on the effect of the diluent on the recovery of bacteria. *Applied Bacteriology* , 26, σσ. 398-404.
- Jones. (1992). *Food safety*. USA: EAGAN Press.
- Kirby, R. (1994). HACCP in Practice. *Food control* , 4 (5), σσ. 230-236.
- Little CL, S. S. (2009, Septembre). Prevalence and level of listeria monocytogenes and other listeria species in selected retail ready-to-eat foods in the UK. *Journal of food protection* , 9 (72), σσ. 1869-1877.
- Marier, R. W. (1973). An outbreak of enteropathogenic Escherichia coli food borne disease traced to imported French cheese. *The Lancet* (II), σσ. 1376-1378.
- Martinez-Tome M, V. A. (2000). Improving the control of food production in catering establishments with particular reference to the safety of salads. *Food control* (11), σσ. 437-445.
- McLauchlin, J. M. (2004). Listeria monocytogenes and listeriosis: a review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods. *International Journal of food microbiology* (92), σσ. 15-33.
- Minor, T. M. (1976). *Staphylococci and their significance in foods*. New York: Elsevier Science Publications Amsterdam.
- Montvill, T. M. (2001). *Food microbiology. Fundamentals and frontiers 2nd edition*. Washington DC: ASM Press.
- Mossel, D. V. (1963). The examination of foods for Enterobacteriaceae using a test of the type generally adopted for the detection of Salmonella. *Journal of Applied Bacteriology* (26), σσ. 444-452.
- Motarjemi F, K. G. (1996). Importance of HACCP for public health and development. The role of the World Health Organization. *Food control* , 2 (7), σσ. 77-85.
- Moy G, K. F. (1994). Application of HACCP to food manufacturing: Some considerations on harmonization through training. *Food control* , 3 (5), σσ. 131-139.

- Oliveira, M. B. (2001, October). Application of Hazard Analysis Critical Control Points System to enteral tube feeding in hospital. *Journal of human nutrition and dietetics* , 5 (14), σσ. 397-403.
- Pierson D, C. M. (1992). *HACCP principles and applications*. New York: Chapman & Hall.
- Punch, J. O. (1964). Comparison between standard methods procedure and a surface plate method for estimating psychrophilic bacteria in milk. *J. Milk Technology* (27), σσ. 43-47.
- Read RB JR, P. W. (1965). In vitro assay of staphylococcal enterotoxin A and B from milk. *Journal of dairy science* (48), σ. 411.
- Reiser R, C. D. (1974). Detection of staphylococcal enterotoxin in food. *Applied microbiology* (27), σ. 83.
- Richards J, P. E. (1993, August). Hospital food Hygiene: The application of Hazard Analysis Critical Control Points to conventional hospital catering. *The journal of hospital infection* , 4 (24), σσ. 273-282.
- Schothorst, M. V. (2004). *A simple guide to understanding and applying the hazard analysis critical control point concept* (3rd εκδ.). Belgium: International life sciences institute.
- Sharpe, A. J. (1972). Stomaching; a new concept in bacteriological sample preparation. *Applied Microbiology* (24), σσ. 175-178.
- Sharpe, A. K. (1971). A rapid, inexpensive bacterial count technique using agar droplets. *Journal of Applied Bacteriology* (34), σσ. 435-440.
- Soriano GM, R. H. (2002). Effect of introduction of HACCP on the microbiological quality of some restaurant meals. *Food control* (13), σσ. 253-261.
- Stevenson, E. B. (1995). *HACCP establishing hazard analysis critical control point programmes, a workshop manual* (2nd εκδ.). Washington: The Food Processors Institute.
- Straka, R. S. (1957). Rapid destruction of bacteria in commonly used diluents and its elimination. *Applied Microbiology* , 21 (5).
- Thatcher, F. C. (1978). *Microorganisms in Foods : Their significance and Methods of enumeration* . Toronto, Canada: University Toronto Press.
- Thrope, R. (1989). HACCP in catering: help or hype. *Lecture in catering for the 90's. Symposium held on 5th and 6th October 1989*. United Kingdom.
- Untermann, F. (1996, December). Risk assessment and risk management according to the HACCP concept for safe foods. *Zentralblatt fur Hygiene und Umweltmedizin* , 2-4 (199), σσ. 119-130.
- Van Schotjhorst, M. M. (1966). The estimation of the hygienic quality of feed components using Enterobacteriaceae enrichment test. *Journal of veterinary medicine* (13), σσ. 273-285.
- Vanderzant, C. M. (1965). Effect of temperature of plating medium on the viable count of psychrophilic bacteria. *J. Milk Food Technology* (28), σσ. 383-388.

- WHO, W. H. (1977). *Guidelines for health related monitoring of coastal water quality. Report of a group of experts jointly convened by WHO and UNEP, Rovinj Yugoslavia 23-25 Feb 1977*. Copenhagen: WHO Regional office for Europe.
- Wilson E, F. M. (1959). Rapid test for detecting staphylococcus aureus in food. *Applied microbiology* (9), σσ. 22-26.
- Worsfold, D. (2001, December). A guide to HACCP and function catering. *Journal of the Royal Society of Health* , 4 (212), σσ. 224-229.
- Zehren VL, Z. V. (1968). Examination of large quantities of cheese for staphylococcal enterotoxin A. *Journal of dairy science* (51), σ. 635.
- Αμπάλας, Β. (1973). Έρευνα επί της μικροβιολογικής ποιότητας των μη στείρων Ελληνικών φαρμακευτικών προϊόντων και καλλυντικών. Θεσσαλονίκη.
- Αρβανιτογιάννης Ι, Σ. Δ. (2001). *Ασφάλεια τροφίμων :Εφαρμογή της ανάλυσης επικινδυνότητας και κρίσιμων σημείων ελέγχου (HACCP) στις βιομηχανίες τροφίμων και ποτών*. Θεσσαλονίκη: University studio press.
- Καραϊωάννογλου, Π. (1975). Συμβολή εις την μελέτην της υγιεινολογικής καταστάσεως των εν Ελλάδι παρασκευαζομένων αλλαντικών αέρος. 50-51. Θεσσαλονίκη.
- Μάντης, Α. Κ. (1999). *Εργαστηριακή Μικροβιολογία Τροφίμων* . Θεσσαλονίκη: Πανεπιστημιακό τυπογραφείο Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο.
- Μάντης, Α. (1980). *Μέθοδοι μικροβιολογικής εξετάσεως του γάλακτος και των προϊόντων του*. Θεσσαλονίκη.
- Μάντης, Α. (1973). *Συνθήκαι παραγωγής σταφυλοκοκκικών εντεροτοξινών εις τον τυρόν 'φέτα'*. Ειδική επι υφηγεσία πραγματεία. Θεσσαλονίκη.
- Τζιά, Κ. Π. (2005). *Ανάλυση επικινδυνότητας στα κρίσιμα σημεία ελέγχου (HACCP) σε χώρους μαζικής εστίασης*. Αθήνα: Παππασωτηρίου.
- Τζιά, Κ. Τ. (1996). *Ανάλυση επικινδυνότητας στα κρίσιμα σημεία ελέγχου (HACCP) στη βιομηχανία τροφίμων*. Αθήνα: Παπασωτηρίου.
- Ψάννης, Ε. (1976). Έρευνα επί της υγιεινολογικής καταστάσεως ενίων εκ κρέατος ετοιμών προς έψησιν κατεψυγμένων τροφών. 43-44. Θεσσαλονίκη.

