



Πολυτεχνείο Κρήτης

Σχολή Μηχανικών Περιβάλλοντος

**Έλεγχος μικροβιολογικής ποιότητας τροφίμων με
καλλιεργητικές και μοριακές τεχνικές**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

του

Καραταΐρη Χρυσοβαλάντη

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: Δανάη Βενιέρη

Επίκουρη Καθηγήτρια

Χανιά, 2015

Ευχαριστίες

Θα ήθελα καταρχάς να ευχαριστήσω όλους όσους συνέβαλαν με οποιονδήποτε τρόπο στην επιτυχή εκπόνηση αυτής της διπλωματικής εργασίας. Θα πρέπει να ευχαριστήσω θερμά την καθηγήτρια κα. Δανάη Βενιέρη για την επίβλεψη αυτής της διπλωματικής εργασίας και για την ευκαιρία που είχα να την πραγματοποιήσω στο εργαστήριο της μικροβιολογίας και να έχω μία πρακτική εμπειρία πάνω στο θέμα. Ήταν συνεργάσιμη και πάντα διαθέσιμη να μου λύσει οποιαδήποτε απορία είχα πάνω στο θέμα της διπλωματικής εργασίας, αλλά και να βοηθήσει όπου χρειαζόταν.

Στην συνέχεια θέλω να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την κα. Ιωσηφίνα Γουνάκη για την εξαιρετική συνεργασία που είχαμε στον χώρο του εργαστηρίου. Οι γνώσεις της και η εμπειρία της ήταν άκρως πολύτιμες και απαραίτητες για την επιτυχία της διπλωματικής μου εργασίας, αλλά και για την κατανόηση της χρησιμότητας του κάθε υλικού και μηχανήματος που χρησιμοποιήσαμε κατά το πειραματικό μέρος.

Επιπλέον θέλω να ευχαριστήσω τον κ. Κουμαντάκη, μέλος της ομάδας HACCP της Creta Farm ο οποίος με βοήθησε στο να κατανοήσω τον τρόπο λειτουργίας και εφαρμογής του HACCP σε μία επιχείρηση τροφίμων.

Σε αυτό το σημείο θέλω να αναφερθώ σε ανθρώπους εκτός του ακαδημαϊκού περιβάλλοντος, που παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην ζωή και χωρίς του οποίους δεν θα βρισκόμουν εδώ που βρίσκομαι τώρα. Αρχικά θέλω να ευχαριστήσω τους τρεις πιο κοντινούς και πολύτιμους φίλους μου τον Γιώργο Μουστάκη, τον Γιώργο Κωστόπουλο και τον Γιάννη Κωνσταντίνου οι οποίοι βρισκόντουσαν πάντα δίπλα μου και ελπίζω να είναι εκεί και στο μέλλον. Το μεγαλύτερο ευχαριστώ όμως το οφείλω στην μητέρα μου η οποία πίστεψε στις δυνατότητες μου και παρά τις όλες δυσκολίες μου πρόσφερε τα πάντα χωρίς καμία στέρηση.

Την παρούσα διπλωματική εργασία θα ήθελα να την αφιερώσω στην αδερφή μου Γεωργία και την μητέρα μου Μιράντα.

Περίληψη

Στην παρούσα διπλωματική εργασία εξετάζεται η μικροβιολογική ποιότητα τροφίμων με τα οποία ο καταναλωτής έχει συχνή επαφή. Ο έλεγχος πραγματοποιείται με την χρήση καλλιεργητικών και μοριακών μεθόδων με την τήρηση συγκεκριμένων πρωτοκόλλων. Ύστερα από την λήψη των αποτελεσμάτων των καλλιεργειών και αφού πραγματοποιήθηκε βιοχημική ταυτοποίηση API, συγκρίθηκαν τα αποτελέσματα με τα υπάρχοντα νομοθετικά όρια για τον χαρακτηρισμό του τροφίμου ως κατάλληλου ή ακατάλληλου για κατανάλωση. Στη συνέχεια με την χρήση της μοριακής μεθόδου real-time PCR πραγματοποιήθηκε ανίχνευση του κοπρανώδους βακτηρίου *Enterococcus faecalis* καθώς και της *E. coli* σε κάποια από τα δείγματα μας. Όλες αυτές οι παράμετροι για την καταλληλότητα ή μη ενός τροφίμου πριν βγει στην αγορά εξασφαλίζονται από το σύστημα διασφάλισης ποιότητας (HACCP) της εκάστοτε εταιρείας. Στο τέλος της διπλωματικής εργασίας εξετάζεται το σύστημα HACCP μίας εταιρείας παραγωγής προϊόντων τυρογάλακτος (μυζήθρα κ.ά.) ως προς τα κρίσιμα σημεία που έχουν οριστεί για την μείωση των μικροβιακών κινδύνων και γίνεται μία προσπάθεια εύρεσης λύσεων για την περαιτέρω μείωση ή εξάλειψη του μικροβιακού κινδύνου και των τρόπων μόλυνσης των προϊόντων.

Περιεχόμενα

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	2
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	3
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ	6
1.1 ΤΡΟΦΙΜΟΓΕΝΗ ΝΟΣΗΜΑΤΑ.....	6
1.2 ΝΕΕΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΕΣ ΣΤΗΝ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ	8
1.2.1 ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΕΜΠΟΔΙΩΝ (HURDLES)	9
1.2.2 HACCP	10
1.2.3 ΠΡΟΡΡΗΤΙΚΗ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ (PREDICTIVE MICROBIOLOGY).....	11
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΤΡΟΦΙΜΑ	12
2.1 ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ	12
2.2 ΠΗΓΕΣ ΜΟΛΥΝΣΕΩΝ ΤΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ	13
2.3 ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΠΟΥ ΑΝΙΧΝΕΥΟΝΤΑΙ ΣΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ	13
2.4 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΣΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ.....	14
2.5 ΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ	16
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ.....	17
3.1 ΒΑΚΤΗΡΙΑ	18
3.1.1 ΣΑΛΜΟΝΕΛΛΑ (<i>SALMONELLA SP.</i>)	20
3.1.1.1 ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ	21
3.1.1.2 ΠΡΟΣΤΑΣΙΑ.....	23
3.1.2 <i>ESCHERICHIA COLI</i>	24
3.1.2.1 ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ	25
3.1.2.2 ΠΡΟΣΤΑΣΙΑ.....	26
3.1.3 <i>ENTEROCOCCUS SP.</i>	27
3.1.3.1 ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ	28
3.1.3.2 ΠΡΟΣΤΑΣΙΑ.....	28
3.1.4 <i>LISTERIA SP.</i>	28
3.1.4.1 ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ	29
3.1.4.2 ΠΡΟΣΤΑΣΙΑ.....	30
3.1.5 <i>STAPHYLOCOCCUS SP.</i>	31
3.1.5.1 ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ	32

3.1.5.2 ΠΡΟΣΤΑΣΙΑ.....	33
3.1.6 <i>PSEUDOMONAS SP.</i>	33
3.1.6.1 ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ	34
3.1.6.2 ΠΡΟΣΤΑΣΙΑ.....	34
3.1.7 <i>SHEWANELLA SP.</i>	35
3.1.7.1 ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ	35
3.1.7.2 ΠΡΟΣΤΑΣΙΑ.....	36
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΚΟΠΟΣ	37
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	38
5.1 ΥΛΙΚΑ	38
5.2 ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ	40
5.3 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ.....	42
5.4 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ	46
5.5 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ.....	49
5.6 ΈΛΕΓΧΟΣ ΠΟΣΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑΣ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ	50
5.7 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ ΤΗΣ PCR.....	51
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	53
6.1 ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΚΟΤΟΠΟΥΛΟΥ	53
6.2 ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΑΥΓΩΝ.....	59
6.3 ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΣΥΣΚΕΥΑΣΜΕΝΗΣ ΣΑΛΑΤΑΣ.....	70
6.4 ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΥΡΟΓΑΛΑΚΤΟΣ.....	75
6.5 ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΨΑΡΙΩΝ	81
6.6 REAL-TIME PCR	87
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: ISO-HACCP.....	91
7.1 ISO.....	91
7.2 HACCP	91
7.2.1 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ ΛΗΦΘΕΝΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΤΥΡΟΓΑΛΑΚΤΟΣ ΜΕ ΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ HACCP - ΕΦΑΡΜΟΓΗ HACCPΣΕ ΜΙΑ ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΗ ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ...100	
7.2.1.2 ΤΥΡΟΚΟΜΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ	101
7.2.1.3 HACCP ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΥΡΟΓΑΛΑΚΤΟΣ	102
7.2.2 ΠΡΟΤΕΙΝΟΜΕΝΑ ΜΕΤΡΑ ΣΥΜΦΩΝΑ ΜΕ ΤΑ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΤΗΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	113
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	114
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	ΣΦΑΛΜΑ! ΔΕΝ ΕΧΕΙ ΟΡΙΣΤΕΙ ΣΕΛΙΔΟΔΕΙΚΤΗΣ.

Κεφάλαιο 1: Μικροβιολογία τροφίμων

Στην καθημερινότητα του ο άνθρωπος καταναλώνει διάφορες τροφές για να εξυπηρετήσει της βασικές του ανάγκες και όχι μόνο, από νερό μέχρι το μαγειρεμένο σπιτικό φαγητό. Σε όλα αυτά τα τρόφιμα υπάρχουν μικροοργανισμοί λόγω της υψηλής περιεκτικότητας τους σε θρεπτικά συστατικά και την ευκολία μόλυνσης τους. Οι μικροοργανισμοί μπορεί να αποτελούν την φυσιολογική μικροχλωρίδα του τροφίμου, είτε αποτελούν το μικροβιακό φορτίο το οποίο δημιουργείται κατά την συλλογή, επεξεργασία, αποθήκευση, διανομή και παρασκευή του τροφίμου. Οι παράγοντες που επηρεάζουν την ακίνδυνη για την δημόσια υγεία μικροβιακή μικροχλωρίδα μετατρέποντας την σε απειλητική για την υγεία των ατόμων είναι οι ιδιότητες του τροφίμου, το περιβάλλον αποθήκευσης, οι ιδιότητες των μικροοργανισμών και οι επιδράσεις της επεξεργασίας. Η ασφάλεια των τροφίμων που καταναλώνονται από τον άνθρωπο, αποτελεί ζήτημα ζωτικής σημασίας κυρίως στις ανεπτυγμένες χώρες λόγω της αύξησης των κρουσμάτων τροφιμογενών νοσημάτων και τροφιμογενών λοιμώξεων. Ο επιστημονικός κλάδος που έχει ως σκοπό την μελέτη των τροφίμων, αλλά και την εξασφάλιση της υγιεινής τους είναι η «Υγιεινή και η Ασφάλεια των τροφίμων» που αποτελεί έναν εξειδικευμένο κλάδο της μικροβιολογίας τροφίμων. Η **μικροβιολογία τροφίμων** περιλαμβάνει την μελέτη των μικροοργανισμών, οι οποίοι έχουν ωφέλιμες αλλά και αρνητικές επιδράσεις στην ποιότητα και ασφάλεια των τροφίμων. Ο κλάδος της μικροβιολογίας τροφίμων εστιάζει στην γενική βιολογία των μικροοργανισμών που βρίσκονται στα τρόφιμα, περιλαμβάνονται επιπλέον τα χαρακτηριστικά ανάπτυξης, η ταυτοποίηση και την παθογένεια τους. Συγκεκριμένα το πεδίο ενδιαφέροντος το οποίο πραγματεύεται ο κλάδος της μικροβιολογίας τροφίμων αφορά τις τροφικές δηλητηριάσεις, την φθορά των τροφίμων, την διατήρησή τους και την νομοθεσία γύρω από τα τρόφιμα. Η παρουσία παθογόνων μικροοργανισμών στα προϊόντα ή επικίνδυνοι μικροοργανισμοί, έχουν ως αποτέλεσμα σοβαρά προβλήματα δημόσιας υγείας παγκοσμίως και είναι οι κύριοι λόγοι πρόκλησης ασθένειας και θανάτου.

1.1 Τροφιμογενή νοσήματα

Με τον όρο «Τροφιμογενή νοσήματα» χαρακτηρίζουμε τα νοσήματα τα οποία οφείλονται στην κατανάλωση μολυσμένων τροφίμων ή ποτών. Τα τροφιμογενή νοσήματα διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες ανάλογα με τον λόγο πρόκλησης της ασθένειας.

- **Τροφική λοίμωξη** - Η τροφική λοίμωξη ή τροφολοίμωξη οφείλεται στην κατανάλωση τροφίμων που περιέχουν κάποιον παθογόνο μικροοργανισμό. Ο μικροοργανισμός μετά την κατανάλωση του μολυσμένου τροφίμου εγκαθίσταται στον γαστρεντερικό σωλήνα όπου και πολλαπλασιάζεται με αποτέλεσμα την σταδιακή εμφάνιση συμπτωμάτων. Υπάρχουν περιπτώσεις στις οποίες ο

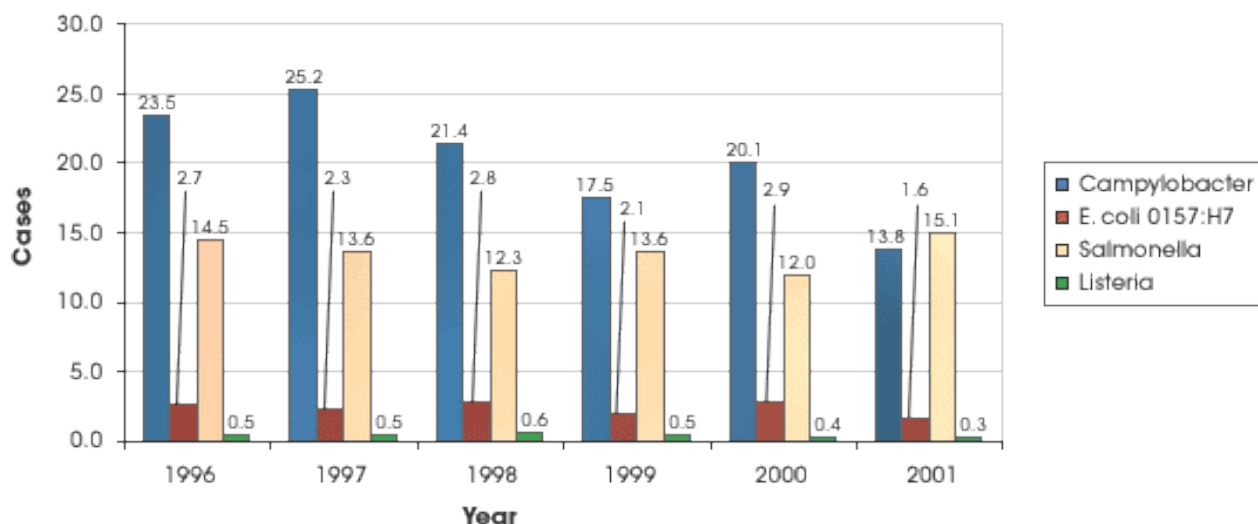
μικροοργανισμός μπορεί να μεταφερθεί μέσω του κυκλοφοριακού συστήματος προσβάλλοντας άλλα όργανα και ιστούς του ανθρωπίνου σώματος.

- **Τροφοτοξίκωση** - Η τροφοτοξίκωση οφείλεται στην κατανάλωση κάποιας επικίνδυνης για τον οργανισμό τοξίνης που έχει παραχθεί και υπάρχει μέσα ή πάνω στο τρόφιμο. Η παρουσία της τοξίνης στο τρόφιμο δεν δηλώνει και την παρουσία του μικροοργανισμού που την παρήγαγε, καθώς αυτός μπορεί να έχει καταστραφεί. Τροφική τοξίκωση μπορεί να προκληθεί και από τοξικές χημικές ουσίες αν υπάρχουν στο τρόφιμο, όπως υπολείμματα φυτοφαρμάκων, απορρυπαντικά κ.ά.
- **Τοξική λοίμωξη** - Η τοξική λοίμωξη οφείλεται στην παρουσία υψηλής συγκέντρωσης κάποιου μικροοργανισμού ο οποίος όταν βρεθεί μέσα στον οργανισμό του ανθρώπου παράγει την τοξίνη η οποία οδηγεί στην αδιαθεσία του ατόμου που έχει καταναλώσει το μολυσμένο τρόφιμο. (Αρβανιτίδου-Βαγιονά, 2009).

Στον πίνακα 1.1 μπορούμε να δούμε κάποιους μικροοργανισμούς που είναι υπεύθυνοι για την πρόκληση τροφιμογενών νοσημάτων. Καθώς και στην εικόνα 1.2 βλέπουμε τα αποτελέσματα μιας έρευνας που διεξήχθη από το 1996 έως το 2001 και δείχνει τον αριθμό περιστατικών τροφικής δηλητηριάσεις από κάποιους μικροοργανισμούς.

Πίνακας 1.1 Μικροοργανισμοί που προκαλούν τροφιμογενή νοσήματα. Πηγή: Χρυσάνθη Παπαδοπούλου, Θεωρία Μεθοδολογία και Υγιεινή-Μικροβιολογία τροφίμων, 2001

Παράσιτα	Βακτήρια	Ιοί	Μύκητες	Prions
<i>Ascaris</i> sp.	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Astroviruses	<i>Aspergillus</i> sp.	PrP ^{res}
<i>Anisakis</i> sp.	<i>Bacillus cereus</i>	Coxsackie viruses	<i>Fusarium</i> sp.	
<i>Blastocystis</i> sp.	<i>Brucella melitensis</i>	Echo viruses	<i>Penicillium</i> sp.	
<i>Cryptosporidium</i> sp.	<i>Campylobacter jejuni</i>	Hepatitis A. E viruses		
<i>Cyclospora cayietanesis</i>	<i>Citrobacter</i> sp.	Norwalk virus group		
<i>Echinococcus granulosus</i>	<i>Clostridium perfringens</i>	Poliovirus		
<i>Entamoeba histolytica</i>	<i>Clostridium botulinum</i>	Rotaviruses		
<i>Fasciola hepatica</i>	<i>Edwardsiella</i> sp.	Tick borne encephalitis virus		
<i>Giardia lamblia</i>	<i>Enterobacter</i> sp.			
<i>Isospora</i> sp.	<i>Enterococcus faecalis</i>			
<i>Microsporidium</i> sp.	<i>Escherichia coli</i>			
<i>Oxyurus</i> sp.	<i>Listeria monocytogenes</i>			
<i>Taenia solium</i>	<i>Mycobacterium</i> sp.			
<i>Taenia saginata</i>	<i>Proteus</i> sp.			
<i>Toxoplasma gondii</i>	<i>Providencia</i> sp.			
<i>Trichinella spiralis</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.			
<i>Sarcocystis</i> sp.	<i>Salmonella</i> sp.			
	<i>Shigella</i> sp.			
	<i>Staphylococcus aureus</i>			
	<i>Vibrio</i> sp.			



Εικόνα 1.2 Περιστατικά τροφιμογενών νοσημάτων από το 1996 έως το 2001. Πηγή: Preliminary Foodnet Data on the Incidence of Food-borne Illnesses

1.2 Νέες τεχνολογίες στην μικροβιολογία τροφίμων

Όπως έχει προαναφερθεί τα τρόφιμα αποτελούν ένα ιδανικό υπόστρωμα για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών, κάτι το οποίο μπορεί να έχει δυσάρεστα αποτελέσματα στην υγεία του καταναλωτή. Αυτό έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη τεχνολογιών αλλά και μέτρων ελέγχου του προϊόντος από το στάδιο της παραγωγής μέχρι και το τελικό στάδιο που είναι η διάθεση στον καταναλωτή. Οι υπάρχουσες παραδοσιακές μέθοδοι που ακολουθούνται για την διασφάλιση ποιότητας και υγιεινής του τροφίμου έχουν κριθεί πλέον βάση των σύγχρονων απαιτήσεων που περιλαμβάνουν άμεση διανομή, έλεγχο διαδικασίας σε πραγματικό χρόνο και υγειονομικό έλεγχο, αρκετά αργές και κοπιαστικές (αερόβια μέτρηση σε τριβλία, διάλυση σε σωλήνες κ.ά.) ως προς τον χρόνο που χρειάζονται για να δώσουν αποτελέσματα, ενώ και οι έμμεσες μέθοδοι που βασίζονται σε φυσικές, χημικές ή φυσικοχημικές αλλαγές, δεν δίνουν αποτελέσματα αν δεν υπάρχει μεγάλος αριθμός κυττάρων. Στην περίπτωση μικροοργανισμών αλλοίωσης, απαιτούνται 10^7 κύτταρα / g ή mL του προϊόντος κάτι το οποίο σηματοδοτεί ήδη την αρχή αλλοίωσης του τροφίμου. Σήμερα λόγω των αυξημένων απαιτήσεων ο ακριβής και αποτελεσματικός μικροβιολογικός έλεγχος έχει γίνει επιτακτική ανάγκη για τις βιομηχανίες τροφίμων καθώς μπορεί να έχουν τεράστιες οικονομικές απώλειες, από την μη παραγωγή ασφαλών και υγιεινών προϊόντων. Τρεις νέες προσεγγίσεις, που στοχεύουν στην συστηματοποίηση και βέλτιστη αξιοποίηση της έρευνας και της αποκτούμενης γνώσης της μικροβιολογίας τροφίμων, ώστε να διασφαλίζεται η υγιεινή και η ποιότητα των τροφίμων από τον σχεδιασμό ως την κατανάλωση είναι η τεχνολογία εμποδίων (hurdles), το σύστημα διασφάλισης ασφάλειας και υγιεινής HACCP και η προρρητική μικροβιολογία (predictive microbiology).

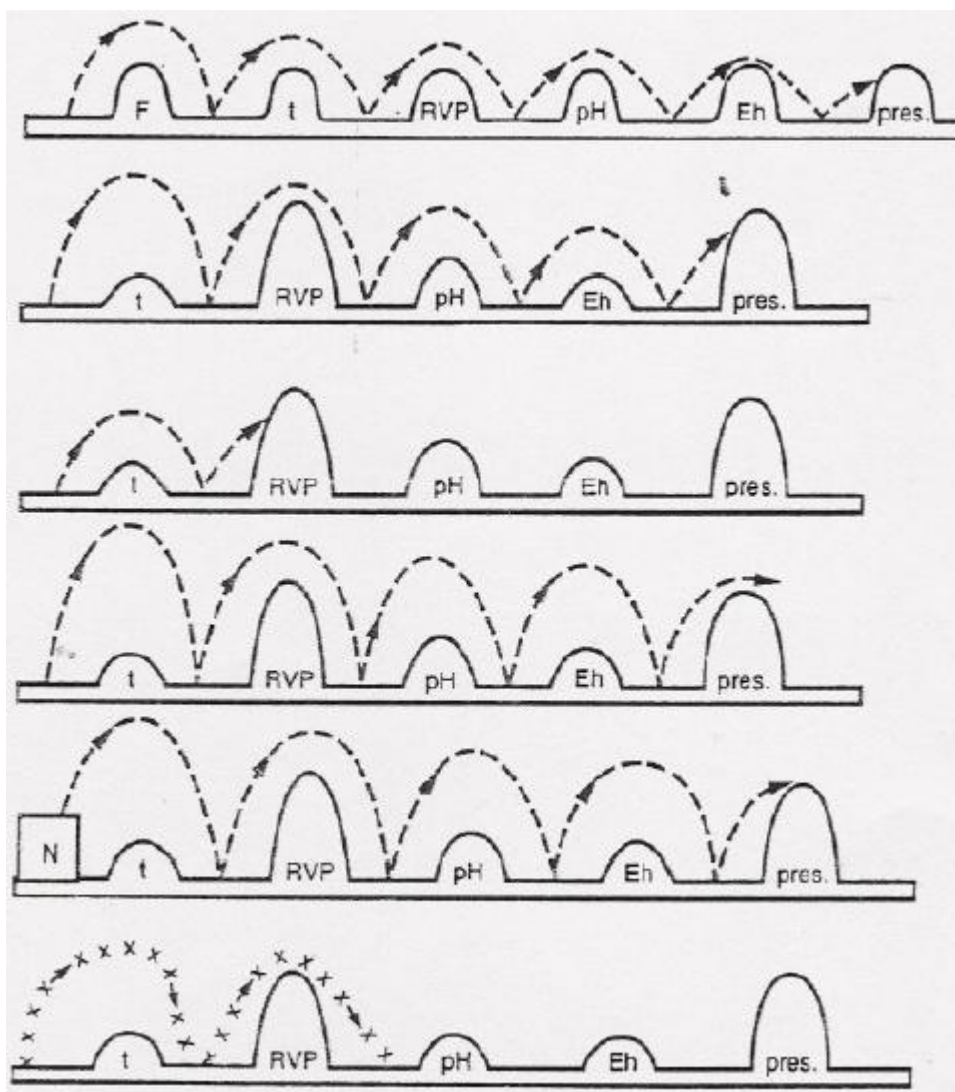
1.2.1 Τεχνολογία εμποδίων (hurdles)

Η μικροβιακή ανάπτυξη εξαρτάται από πολλούς παράγοντες που υπάρχουν στο περιβάλλον των οργανισμών όπως τα συστατικά, τα θρεπτικά συστατικά, η ενεργότητα νερού (a_w), η οξύτητα (pH), η παρουσία συντηρητικών, η ανταγωνιστική μικροχλωρίδα, αντισηπτική συσκευασία, θερμοκρασία συντήρησης, χρόνος κ.ά. Στον πίνακα 1.2.1 συνοψίζονται τα κυριότερα εμπόδια.

Πίνακας 1.2.1 Εμπόδια (hurdles)

ΦΥΣΙΚΑ ΕΜΠΟΔΙΑ	ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΑ ΕΜΠΟΔΙΑ
1. Θερμική επεξεργασία (παστερίωση, αποστείρωση, λεύκανση)	1. Ενεργότητα νερού (a_w)
2. Θερμική συντήρηση	2. Οξύτητα (pH)
3. Ακτινοβολήση	3. Κανονικό οξειδοαναγωγικό δυναμικό (Eh)
4. Ηλεκτρομαγνητική ενέργεια	4. NaCl
5. Υπερύψηλη πίεση	5. NaNO ₂
6. Ultrasonication	6. CO ₂
7. Συσκευασία	7. Οργανικά οξέα
8. Συσκευασία σε Τροποποιημένη ατμόσφαιρα (MAP)	8. Συντηρητικά
9. Αντισηπτική συσκευασία	9. Κάπνισμα
10. Μικροϋφή	10. Μπαχαρικά
	11. Ανταγωνιστική μικροχλωρίδα
	12. Βακτηριοσίνες

Ο έλεγχος αυτών των συνθηκών μπορεί ως εκ τούτου να χρησιμοποιηθεί για να περιορίσει, επιβραδύνει ή και να αποτρέψει την μικροβιακή ανάπτυξη. Την ιδέα αυτή την εισήγαγε πρώτη φορά ο Leistner το 1977 και το 1982 οι Rodel and Leistner. Μερικά εμπόδια μπορεί να επηρεάσουν την ασφάλεια και ποιότητα του τροφίμου επειδή έχουν αντιμικροβιακές ιδιότητες και ταυτόχρονα βελτιώνουν την γεύση του προϊόντος. Το ίδιο εμπόδιο μπορεί να έχει τόσο θετικά όσο και αρνητικά αποτελέσματα στο τρόφιμο, αυτό εξαρτάται από την ένταση του. Για παράδειγμα η ψύξη κάποιων γεωργικών προϊόντων σε πολύ χαμηλές θερμοκρασίες έχει καταστροφικά αποτελέσματα στο τρόφιμο. Συνεπώς για την διασφάλιση της καλύτερης ποιότητας του τροφίμου, ο οποίος είναι και ο στόχος της τεχνολογίας εμποδίων πρέπει να εφαρμοστεί ένας έξυπνος συνδυασμός από εμπόδια. Στην Εικόνα 1.2.1 φαίνονται κάποια παραδείγματα της τεχνολογίας εμποδίων.



Εικόνα 1.2.1 Παραδείγματα συνδυασμού εμποδίων. Πηγή: Food Engineering-Vol III-Hurdle Technology Leistner, L.

1.2.2 HACCP

Το ακρωνύμιο HACCP αποτελεί συντομογραφία του Hazard Analysis Critical Control Points, ενός συστήματος διασφάλισης της ασφάλειας των τροφίμων που βασίζεται στην ανάλυση κινδύνων και τον προσδιορισμό των κρίσιμων σημείων ελέγχου (CCPs). Το σύστημα HACCP αναπτύχθηκε από την αμερικανική εταιρεία Pillsbury σε συνεργασία με την NASA με στόχο τη μέγιστη δυνατή διασφάλιση της μικροβιολογικής ασφάλειας των τροφίμων των πρώτων επανδρωμένων διαστημικών αποστολών. Βασίστηκε στις αρχές του συστήματος FMEA (Failure, Mode and Effect Analysis) που μελετά σε κάθε στάδιο μιας διεργασίας, τι μπορεί να πάει στραβά, τις πιθανές αιτίες και το αναμενόμενο αποτέλεσμα με σκοπό να εγκαταστήσει αποτελεσματικούς μηχανισμούς ελέγχου. Το HACCP

χρησιμοποιεί την ίδια προσέγγιση αλλά με έμφαση στην ασφάλεια του προϊόντος. Αναλυτικότερα για το HACCP θα αναφερθούμε σε παρακάτω κεφάλαιο.

1.2.3 Προρρητική μικροβιολογία (predictive microbiology)

Η προρρητική μικροβιολογία είναι ένας νέος αναπτυσσόμενος τομέας που παρέχει γρήγορα αποτελέσματα συνδυάζοντας στοιχεία μικροβιολογίας, μαθηματικών και στατιστικής. Βασίζεται στην ανάπτυξη μαθηματικών μοντέλων, τα οποία μπορούν να προβλέψουν τον ρυθμό ανάπτυξης ή μείωσης των μικροοργανισμών κάτω από συγκεκριμένες περιβαλλοντικές συνθήκες, επιτρέποντας έτσι την ποσοτικοποίηση πολλαπλών ανεξαρτήτων μεταβλητών (pH, a_w κ.ά.) και αλληλεπιδράσεων τους. Οι αρχές της προρρητικής μικροβιολογίας είναι η κινητική προσέγγιση, η καταγραφή της ανάπτυξης/θανάτου των μικροοργανισμών υπό καθορισμένες συνθήκες και η έκφραση των αποτελεσμάτων υπό την μορφή μαθηματικών εξισώσεων δίνοντας έτσι την δυνατότητα πρόβλεψης της ανάπτυξης/θανάτου σε συνθήκες που δεν έχουν καταγραφεί. Τα μοντέλα που χρησιμοποιούνται διακρίνονται σε πρωτογενή μοντέλα (primary models) και σε δευτερογενή μοντέλα (secondary models), τα οποία φαίνονται στον πίνακα 1.2.3.

Πίνακας 1.2.3 Μοντέλα προρρητικής μικροβιολογίας

Πρωτογενή μοντέλα	Δευτερογενή μοντέλα
<u>Μοντέλο εκθετικής ανάπτυξης</u> $\frac{dN}{dt} = N * x * \mu_{exp}$	<u>Εμπειρικά μοντέλα: πολυωνυμικά</u> $\ln A = \alpha_0 + \alpha_1 x + \alpha_2 y + \alpha_3 z + \alpha_4 xy + \alpha_5 xz + \alpha_6 yz + \alpha_7 x^2 + \alpha_8 y^2 + \alpha_9 z^2 + e$ A: κινητική παράμετρος x, y, z: ανεξάρτητες μεταβλητές $\alpha_0, \alpha_1 \dots \alpha_n$: παράμετροι προς υπολογισμό e: τυχαίο σφάλμα
<u>Λογιστικό μοντέλο</u> $\frac{dN}{dt} = N * x * \mu_{max} * x * \left(1 - \frac{N}{N_{max}}\right)$	<u>Κινητικά μοντέλα:</u>
<u>Μοντέλο Gompertz</u>	<u>Μοντέλο Arrhenius</u> $\mu_{max} = k * x * e^{\frac{-E_A}{R_x * t}}$ E_A : ενέργεια ενεργοποίησης
<u>Μοντέλο Richard</u>	<u>Μοντέλο τύπου Belerhaddek</u> $\sqrt{\mu_{max}} = b * x * (T - T_{min})$ T_{min} : θερμοκρασία όπου $\mu_{max}=0$
<u>Μοντέλο Barayni</u>	

Εν κατακλείδι η προρρητική μικροβιολογία είναι μία κινητική προσέγγιση στα πλαίσια των γενικών αρχών της κινητικής αλλοίωσης των τροφίμων (Frakruddin et al 2011).

Κεφάλαιο 2: Τρόφιμα

Ως τρόφιμο ονομάζουμε κάθε προϊόν το οποίο προορίζεται για κατανάλωση άμεσα από την φύση όπως λαχανικά και φρούτα είτε δέχεται κάποια επεξεργασία για να φτάσει στο στάδιο πώλησης, όπως το τυρί το κρέας κ.ά. Ο ΕΦΕΤ έχει εκδώσει μία λίστα στην οποία φαίνονται αναλυτικά όλες οι κατηγορίες τροφίμων.

2.1 Κατηγορίες τροφίμων

Τα τρόφιμα είναι ένας πολύ γενικός όρος για τον χαρακτηρισμό ενός προϊόντος. Σύμφωνα με τον ΕΦΕΤ τα τρόφιμα χωρίζονται στις παρακάτω κατηγορίες.

1. Γαλακτοκομικά προϊόντα και ανάλογα
2. Λίπη και έλαια και γαλακτώματα λιπών.
3. Παγωτά
4. Φρούτα και λαχανικά
5. Είδη ζαχαροπλαστικής.
6. Δημητριακά και προϊόντα δημητριακών
7. Αρτοσκευάσματα
8. Κρέας και προϊόντα κρέατος
9. Ψάρια και είδη αλιείας
10. Αυγά και προϊόντα αυγών
11. Σάκχαρα, σιρόπια, μέλι και επιτραπέζια γλυκαντικά
12. Αλάτι, καρυκεύματα, σούπες, σάλτσες, σαλάτας και πρωτεϊνούχα ποτά
13. Τρόφιμα που προορίζονται για ειδική διατροφή, όπως ορίζεται στην οδηγία 2009/39/EK
14. Ποτά,
15. Έτοιμα ορεκτικά και πρόχειρα φαγητά
16. Γλυκά, πλην των προϊόντων που εμπίπτουν στις κατηγορίες 1,3,4
17. Συμπληρώματα τροφίμων, όπως ορίζονται στην οδηγία 2002/46/EK, πλην των συμπληρωμάτων τροφίμων για βρέφη και μικρά παιδιά
18. Επεξεργασμένα τρόφιμα που δεν εμπίπτουν στις κατηγορίες 1 έως 17, εκτός από τα τρόφιμα για βρέφη και μικρά παιδιά

2.2 Πηγές μολύνσεων των τροφίμων

Όπως προαναφέρθηκε στο παραπάνω κεφάλαιο όλα τα τρόφιμα καθώς και το νερό που καταναλώνεται από τον άνθρωπο περιέχουν κάποιους μικροοργανισμούς. Οι μικροοργανισμοί αυτοί μπορεί να αποτελούν την φυσιολογική μικροχλωρίδα του τροφίμου, αλλά η παρουσία τους μπορεί να οφείλεται και σε κάποια εξωγενή μόλυνση. Οι κυριότερες πηγές μολύνσεων των τροφίμων είναι:

- Το έδαφος και το νερό
- Φυτά και φυτικά προϊόντα
- Τα δοχεία, σκεύη και μηχανήματα επεξεργασίας
- Η εντερική οδός των ανθρώπων και των ζώων
- Το προσωπικό που έρχεται σε επαφή με τα τρόφιμα
- Οι ζωοτροφές
- Το δέρμα των ζώων
- Ο αέρας και η σκόνη
- Τα έντομα και τα τρωκτικά (Belitz et al 2009)

Βλέπουμε ότι μολύνσεις των τροφίμων μπορεί να οφείλονται τόσο σε φυσικούς παράγοντες, όπως για παράδειγμα οι καλλιέργειες οπωροκηπευτικών σε περιοχές που έχουμε μολυσμένο έδαφος ή το πότισμα τους με νερό που θεωρείται μολυσμένο από διάφορους μικροοργανισμούς. Μέχρι και κατά την επεξεργασία τους, για παράδειγμα, αν το προσωπικό σε μία επιχείρηση παρασκευής τροφίμων δεν ακολουθεί τους κανόνες υγιεινής ή αν δεν υπάρχει σωστό σύστημα εξολόθρευσης εντόμων και τρωκτικών που είναι φορείς μικροβίων.

2.3 Μικροοργανισμοί που ανιχνεύονται στα τρόφιμα

Οι μικροοργανισμοί που βρίσκονται στο περιβάλλον διαχωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες ανάλογα με τα χαρακτηριστικά τους γνωρίσματα. Σε ευκαρυωτικούς και σε προκαρυωτικούς. Στην κατηγορία των ευκαρυωτικών μικροοργανισμών κατατάσσονται αυτοί οι οποίοι έχουν ανασυγκροτημένο πυρήνα ενώ στους προκαρυωτικούς ανήκουν οι μικροοργανισμοί που δεν περιέχουν ανασυγκροτημένο πυρήνα. Στην συνέχεια ανάλογα με άλλα γνωρίσματα τους οι μικροοργανισμοί διαχωρίζονται σε περισσότερες κατηγορίες. Οι κατηγορίες μικροοργανισμών που απαντώνται στα τρόφιμα είναι τα βακτήρια, οι ιοί, οι μύκητες, και τα παράσιτα. Περισσότερες πληροφορίες για τους μικροοργανισμούς θα δούμε στο Κεφάλαιο 3.

2.4 Παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών στα τρόφιμα

Η ανάπτυξη των μικροοργανισμών στο περιβάλλον μπορεί να επιταχυνθεί ή και να επιβραδυνθεί από μία πληθώρα παραγόντων. Με παρόμοιο τρόπο στα τρόφιμα διάφοροι παράμετροι επηρεάζουν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Οι παράμετροι αυτοί διακρίνονται σε ενδογενείς (παράγοντες που εξαρτώνται από το τρόφιμο), σε εξωγενείς (παράγοντες που δεν εξαρτώνται από το τρόφιμο) και σε συνδυασμό των δύο παραπάνω.

Ενδογενείς παράγοντες
οξύτητα τροφίμου (pH)
υγρασία και συντελεστής ενεργού ύδατος (a_w)
δυναμικό οξειδοαναγωγής (Eh-OR)
αντιμικροβιακοί παράγοντες του τροφίμου
επάρκεια του τροφίμου σε θρεπτικά συστατικά
δομή τροφίμου

Εξωγενείς παράγοντες
θερμοκρασία περιβάλλοντος (T)
σχετική υγρασία περιβάλλοντος
τροποποιημένες ατμόσφαιρες

Συνδυασμός παραγόντων
μικροβιακά εμπόδια

Για κάθε παράγοντα που επηρεάζει την ανάπτυξη των μικροοργανισμών έχει καθοριστεί ένα εύρος τιμών με ελάχιστη, βέλτιστη και μέγιστη τιμή. Στους πίνακες 2.4.1, 2.4.2 και 2.4.3 βλέπουμε τις τιμές για θερμοκρασία, a_w και pH για κάποιους από τους μικροοργανισμούς που συναντάμε κατά τον μικροβιακό έλεγχο των τροφίμων.

Πίνακας 2.4.1 Εύρος διακύμανσης του pH ανάπτυξης

Μικροοργανισμοί	pH		
	minimum	optimum	maximum
<i>Clostridium botulinum</i>	4.8-5.0	6.0-8.0	8.5-8.8
<i>E.coli</i>	4.3-4.4	6.0-8.0	9.0-10.0
<i>Pseudomonas sp.</i>	5.6	6.6-7.0	8.0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5.6	6.6-7.0	8.0-9.0
<i>Salmonella sp.</i>	4.5-5.0	6.0-7.5	8.0-9.6
<i>Staphylococcus aureus</i>	4.0-4.7	6.0-7.0	9.5-9.8
<i>Listeria monocytogenes</i>	4.4-5.0	7.0-7.5	9

Πίνακας 2.4.2 Εύρος διακύμανσης της θερμοκρασίας ανάπτυξης

Μικροοργανισμοί	Θερμοκρασία T (°C)		
	Minimum	optimum	maximum
<i>Aeromonas sp.</i>	10	-	47-50
<i>Bacillus cereus</i>	5	-	42
<i>Clostridium sp.</i>	3-10	30-40	42-45
<i>E. coli</i>	3-10	37-41	48-50
<i>Pseudomonas sp.</i>	-7-4	20-30	31-43
<i>P. aeruginosa</i>	8	-	42
<i>P. fluorescens</i>	0-6	20-25	40
<i>Salmonella sp.</i>	5-10	35-37	46-49
<i>Staphylococcus sp.</i>	5-10	35-40	46-48
<i>S. aureus</i>	5-10	35-39	44-48
<i>L. monocytogenes</i>	4	30-37	45

Πίνακας 2.4.3 Ελάχιστη τιμή του a_w για την ανάπτυξη

Μικροοργανισμοί	a_w
	Minimum
<i>Aeromonas sp.</i>	0.95-0.98
<i>Bacillus cereus</i>	0.90-0.99
<i>Clostridium sp.</i>	0.90-0.98
<i>E. coli</i>	0.94-0.97
<i>P. aeruginosa</i>	0.96-0.98
<i>P. fluoresces</i>	0.94-0.97
<i>Salmonella sp.</i>	0.93-0.96
<i>S. aureus</i>	0.83-0.92
<i>L. monocytogenes</i>	0.92

Οι τιμές των παραγόντων αυτών καθορίζουν τον ρυθμό ανάπτυξης των μικροοργανισμών όχι κατά απόλυτη τιμή καθώς υπάρχει συνεχείς αλληλεπίδραση μεταξύ τους. Ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων των μικροοργανισμών καθορίζεται από την σχέση αλληλεπίδρασης που έχουν μεταξύ τους αυτοί οι παράγοντες, δηλαδή από τον βαθμό επιρροής που έχει ο κάθε παράγοντας σε κάποιον άλλον. Για παράδειγμα αν ένα τρόφιμο με χαμηλό a_w βρεθεί σε περιβάλλον με υψηλά ποσοστά υγρασίας (RH) το τρόφιμο θα απορροφήσει υγρασία με αποτέλεσμα την επιφανειακή αλλοίωση του τροφίμου από ζύμες, μύκητες και κάποια βακτήρια. Αντίθετα στην περίπτωση που κάποιο τρόφιμο με υψηλό a_w βρεθεί σε περιβάλλον με χαμηλό ποσοστό υγρασίας θα αποβάλλει υγρασία προς το περιβάλλον με αποτέλεσμα την παράταση του χρόνου συντήρησης του.

2.5 Συντήρηση τροφίμων

Η συντήρηση των τροφίμων περιλαμβάνει τις ενέργειες που πραγματοποιούνται ώστε να διατηρήσουμε τις ιδιότητες των τροφίμων για όσο περισσότερο είναι αυτό δυνατό. Η βασική αρχή όλων των μορφών της συντήρησης τροφίμων είναι είτε η επιβράδυνση της ανάπτυξης των μικροοργανισμών που μπορεί να βλάψουν των καταναλωτή είτε η εξολόθρευση τους. Για να επιτευχθεί αυτός ο στόχος θα πρέπει να είναι γνωστή αλλά και κατανοητή όλη η τροφική αλυσίδα συμπεριλαμβανομένων και την ανάπτυξη, συλλογή, επεξεργασία, συσκευασία και διανομή. Ως εκ τούτου θα πρέπει να εφαρμοστεί μία πιο ολοκληρωμένη προσέγγιση. Αρχικά είναι σημαντικό να ταυτοποιηθούν οι ιδιότητες ή χαρακτηριστικά του τροφίμου που θέλουμε να διατηρήσουμε. Μία ιδιότητα ενός τροφίμου που θέλουμε να διατηρήσουμε και είναι σημαντική, μπορεί να είναι καθοριστική για κάποιο άλλο τρόφιμο. Για παράδειγμα κατά την αποξήρανση, η ελάττωση του πορώδους προκαλεί σμίκρυνση στο προϊόν. Αυτό μπορεί να είναι επιθυμητό ή μη ανάλογα με την επιθυμητή ποιότητα του αποξηραμένου προϊόντος, για παράδειγμα στα συστατικά των δημητριακών είναι επιθυμητή η δημιουργία κρούστας, ενώ στην περίπτωση τροφών σε σκόνη είναι αναγκαία η γρήγορα ενυδάτωση. Κατά την συντήρηση υπάρχουν τρία ερωτήματα τα οποία πρέπει να απαντηθούν:

- Το επιθυμητό επίπεδο της ποιότητας
- Η διάρκεια συντήρησης
- Η ομάδα για την οποία προορίζεται το προϊόν (Shafiur Rahman et al 2007)

Έχουν αναπτυχθεί διάφορες τεχνικές συντήρησης των τροφίμων ώστε ανάλογα με τις ανάγκες του τροφίμου να επιλέγεται η καταλληλότερη. Οι πιο συνηθισμένες μέθοδοι που χρησιμοποιούνται είναι:

- Ψύξη και κατάψυξη
- Κονσερβοποίηση
- Ακτινοβόληση
- Χημική συντήρηση
- Παστερίωση
- Αποξήρανση
- Ζύμωση
- Κάπνισμα

(Jay et al 2000)

Κεφάλαιο 3: Μικροοργανισμοί

Ο όρος «μικρόβιο» ή «μικροοργανισμός» είναι όρος της τεχνολογίας και αφορά ένα σύνολο έμβιων όντων από διάφορες ταξινομικές ομάδες με ορισμένα κοινά χαρακτηριστικά. Οι μικροοργανισμοί είναι αόρατοι με γυμνό οφθαλμό, με μικροσκοπικές διαστάσεις μεγαλύτερες από την διακριτική ικανότητα του μικροσκοπίου (0,16μm). Γενικά, πρόκειται για μονοκύτταρους οργανισμούς ή κοινοκυτταρικούς χωρίς εγκάρσια τοιχώματα ή και πολυκυτταρικούς χωρίς όμως διαφοροποίηση των κυττάρων για σχηματισμό οργάνων ή ιστών. Σύμφωνα με τον Haeckel, οι μικροοργανισμοί κατατάσσονται στα πρώτιστα, τα οποία διακρίνονται σε δύο μεγάλες ομάδες:

1. Τα ευκαρυωτικά
2. Τα προκαρυωτικά

Στην ομάδα των ευκαρυωτικών οργανισμών ανήκουν:

- Τα φύκη
- Τα πρωτόζωα
- Οι μύκητες
- Οι μυξομύκητες

Στην ομάδα των προκαρυωτικών οργανισμών ανήκουν:

- Τα βακτήρια
- Τα κυανοπράσινα φύκη
- Τα μυκοπλάσματα

Περαιτέρω οι μικροοργανισμοί διαχωρίζονται ανάλογα με την πηγή άνθρακα, αζώτου και ενέργειας. Βάση αυτού του διαχωρισμού δημιουργούνται 4 ομάδες:

1. Τα φωτοαυτότροφα, τα οποία χρησιμοποιούν ως πηγή ενέργειας την ηλιακή ακτινοβολία και ως πηγή άνθρακα το CO₂.
2. Τα φωτοετερότροφα, τα οποία χρησιμοποιούν ως πηγή ενέργειας την ηλιακή ακτινοβολία και ως πηγή άνθρακα οργανικές ουσίες.
3. Τα χημειοαυτότροφα, τα οποία χρησιμοποιούν το CO₂ ως μοναδική πηγή άνθρακα και αντλούν ενέργεια από τις οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις ανόργανων ουσιών.
4. Τα χημειοετερότροφα, τα οποία χρησιμοποιούν ως πηγή άνθρακα οργανικές ουσίες και αντλούν ενέργεια από οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις οργανικών πάντα ουσιών

Στην μικροβιολογία τροφίμων τα μικρόβια που απασχολούν κυρίως είναι τα χημειοετερότροφα. Τα χημειοετερότροφα διακρίνονται σε τρεις υποκατηγορίες ανάλογα με την σχέση τους προς το υπόστρωμα ή τον ξενιστή πάνω στον οποίο αναπτύσσονται.

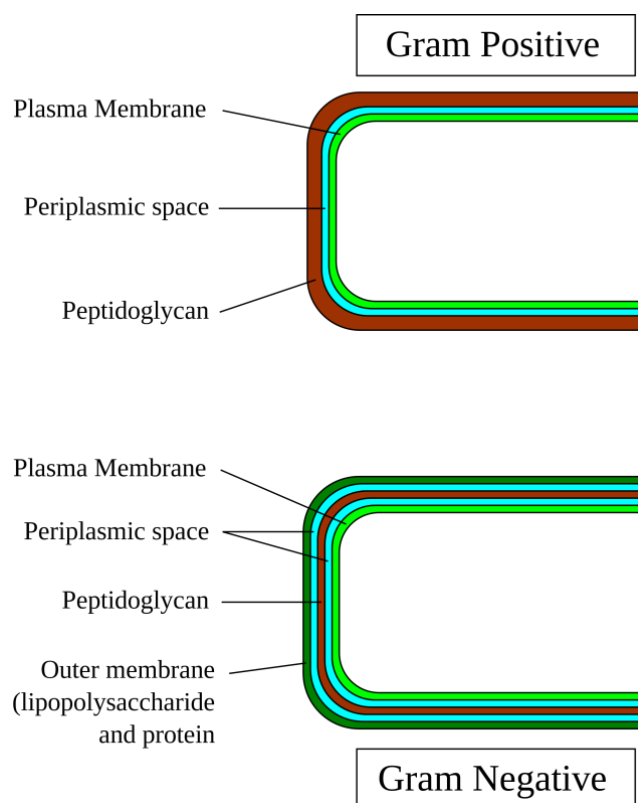
- Παθογόνα μικρόβια. Τα μικρόβια αυτά αναπτύσσονται πάνω σε ζωντανούς οργανισμούς και δημιουργούν με την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό τους παθολογικές καταστάσεις.
- Παράσιτα μικρόβια. Οι μικροοργανισμοί αυτοί αναπτύσσονται πάνω σε ζωντανούς οργανισμούς χωρίς να δημιουργούν νοσηρές ή παθολογικές καταστάσεις, τουλάχιστον κάτω από φυσιολογικές συνθήκες. Στην περίπτωση όμως που μειωθεί η αντοχή του οργανισμού (πχ λοιμώξεις), τότε εξελίσσονται σε ισχυρά παθογόνα που προκαλούν σοβαρές παθολογικές καταστάσεις.
- Σαπρόφυτα μικρόβια. Αναπτύσσονται πάνω σε νεκρή οργανική ουσία και όχι σε ζωντανούς οργανισμούς. Αναπτυσσόμενα όμως πάνω σε τρόφιμα προξενούν αλλοιώσεις, οπότε είναι ανεπιθύμητα, ή διασπάσεις προς ενδιάμεσα προϊόντα που είναι πολύτιμα για τον άνθρωπο, οπότε είναι ωφέλιμα.

3.1 Βακτήρια

Τα βακτήρια είναι η κυριότερη πηγή μολύνσεων και αλλοίωσης των τροφίμων. Η συγκριτική «υπεροχή» τους αυτή έναντι των άλλων μικροβίων οφείλεται :

- Στην μεγάλη παραλλακτικότητα των διαφόρων ειδών τους ως προς τις απαιτήσεις σε pH, θρεπτικά συστατικά, θερμοκρασία και ERH
- Στην δυνατότητα σχηματισμού ενδοσπορίων
- Στην δυνατότητα αναερόβιας ανάπτυξης
- Στην έκκριση τοξινών

Είναι μονοκύτταροι προκαρυωτικοί οργανισμοί. Το σχήμα τους μπορεί να είναι σφαιρικό και χαρακτηρίζονται ως κόκκοι, ραβδοειδές και χαρακτηρίζονται ως βάκιλοι και σπειροειδές και χαρακτηρίζονται ως σπειρίλια. Η κυτταρική δομή των βακτηρίων είναι σχετικά απλή, το κύτταρο αποτελείται από το κυτταρικό τοίχωμα, την κυτταρική μεμβράνη, το κυτταρόπλασμα και από το γενετικό υλικό, το οποίο βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα και όχι σε πυρήνα καθώς τα βακτήρια είναι προκαρυωτικοί οργανισμοί. Ένα από τα σημαντικότερα δομικά χαρακτηριστικά του βακτηρίου είναι το κυτταρικό του τοίχωμα. Η σύσταση του



Εικόνα 3.1 Δομική διαφορά Gram θετικών και Gram αρνητικών βακτηρίων.

Πηγή: www.wikipedia.com

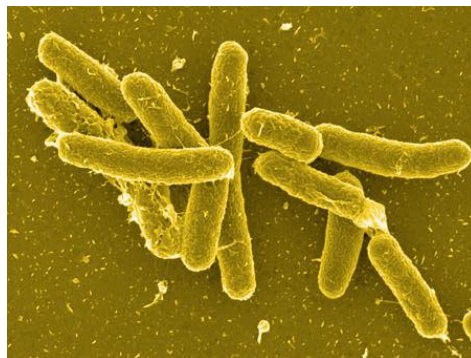
κυτταρικού τοιχώματος ποικίλει μεταξύ των βακτηριών και είναι ένας σημαντικός παράγοντας ανάλυσης και διαφοροποίησης στα είδη τους. Η κύρια λειτουργία του είναι να προστατεύει την κυτταρική μεμβράνη και να δίνει στο βακτήριο το σχήμα του. Η διαφορετική σύσταση του κυτταρικού τοιχώματος στα βακτήρια μας επιτρέπει να τα διαχωρίσουμε σε δύο κατηγορίες μέσω της μεθόδου χρώσης κατά Gram (βλ. Εικόνα 3.1). Η χρώση Gram είναι θεμελιακή ιδιότητα των βακτηρίων που συνδέεται με διαφορετική συμπεριφορά όσον αφορά την παθογένεια, την αντοχή στα αντιβιοτικά και άλλων παραγόντων (Pepper et al 2009).

- ❖ **Gram θετικά (+):** Χαρακτηρίζονται τα βακτήρια που διατηρούν την μωβ κρυσταλλική ιώδη χρώση όταν υπόκεινται στην διαδικασία χρώσης Gram. Το κυτταρικό τοίχωμα που γειτνιάζει με την εσωτερική ή κυτταροπλασματική μεμβράνη έχει πάχος 15-80 nm και αποτελείται από πολλές στρώσεις πεπτιδογλυκάνης, επίσης γνωστής και ως μуреΐνη. Γενικά τα Gram θετικά βακτήρια παράγουν εξωκυτταρικές ουσίες-τοξίνες, μέσω των οποίων εκδηλώνεται και η πάθηση. Η εκδήλωση των συμπτωμάτων συμβαίνει εντός 1-6 ωρών και διαρκούν 24-48 ώρες. Τα συμπτώματα είναι επίπονα αλλά δεν είναι επικίνδυνα πχ του *S. aureus*, σε αντίθεση με το *Clostridium botulinum* που παράγει μία ισχυρή θανατηφόρα νευροτοξίνη. Μία σημαντική ιδιότητα των Gram θετικών βακτηρίων είναι η ικανότητα σχηματισμού ενδοσπορίων, τα οποία είναι ιδιαίτερα ανθεκτικά, αδρανή μη αναπαραγωγικές μορφές. Τα ενδοσπόρια εμφανίζονται να μην έχουν μεταβολικές διαδικασίες και μπορούν να επιβιώσουν σε ακραίες φυσικές και χημικές συνθήκες. Ως τέτοιες συνθήκες μπορούν να αναγνωρισθούν τα υψηλά επίπεδα υπερϊώδους ακτινοβολίας, η ακτινοβολία γ, τα απορρυπαντικά, τα απολυμαντικά, η θερμότητα, η κατάψυξη και η πίεση. Η λήψη αυτής της μορφής από τα βακτήρια, λαμβάνει χώρα, συνήθως όταν το βακτήριο εκταθεί σε συνθήκες έλλειψης θρεπτικών στοιχείων. Όταν το περιβάλλον γίνει ξανά ευνοϊκό για τα βακτήρια, τα ενδοσπόρια μπορούν να επιστρέψουν στην προηγούμενη μεταβολική τους κατάσταση. Αυτή η ικανότητα μετατροπής σε ενδοσπόρια δεν ισχύει για όλα τα βακτήρια και για αυτό χωρίζονται σε σπορογόνα και σε μη σπορογόνα. Κάποια Gram (+) βακτήρια είναι: *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *Bacillus subtilis* κ.ά
- ❖ **Gram αρνητικά (-):** Χαρακτηρίζονται τα βακτήρια που δεν διατηρούν την μωβ κρυσταλλική ιώδη χρώση όταν υπόκεινται στην διαδικασία χρώσης Gram. Το κυτταρικό τοίχωμα που γειτνιάζει με την εσωτερική ή κυτταροπλασματική μεμβράνη είναι σχετικά λεπτό (10nm) και αποτελείται από ένα μόνο στρώμα πεπτιδογλυκάνης περιλαμβανόμενο από μία μεμβρανώδη δομή που ονομάζεται εξωτερική μεμβράνη. Η εξωτερική μεμβράνη των Gram αρνητικών βακτηρίων αποτελείται κατά κανόνα από ένα μοναδικό συστατικό, λιποπολυσακχαρίτες (LPS ή ενδοτοξίνες), που είναι τοξικά για τα ζώα. Η εξωτερική μεμβράνη θεωρείται συνήθως ως μέρος του κυτταρικού τοιχώματος. Η παθογένεια και μολυσματική ικανότητα των Gram αρνητικών είναι πολυπλοκότερη καθώς περιλαμβάνει τα συστατικά της εξωτερικής μεμβράνης όπως και άλλα κυτταρικά παράγωγα, πχ *E.coli* O157:H7 (Salton et al 1996). Γενικά Gram (-) βακτήρια συναντάμε σε

πεπτικά όργανα, κόπρανα, έδαφος, γάλα, κρέας-πουλερικά και θαλασσινά. Στην βιομηχανία χρησιμοποιούνται ως δείκτες για την σωστή ή μη τήρηση της ορθής βιομηχανικής πρακτικής (Good Manufacturing Practices-GMP) και της καλής υγιεινής πρακτικής (Good Hygiene Practices GHP). Μερικά από τα Gram (-) βακτήρια είναι: *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *E.coli*, *Campylobacter jejuni*, *Vibrio parahaemolyticus*.

3.1.1 Σαλμονέλα (*Salmonella* sp.)

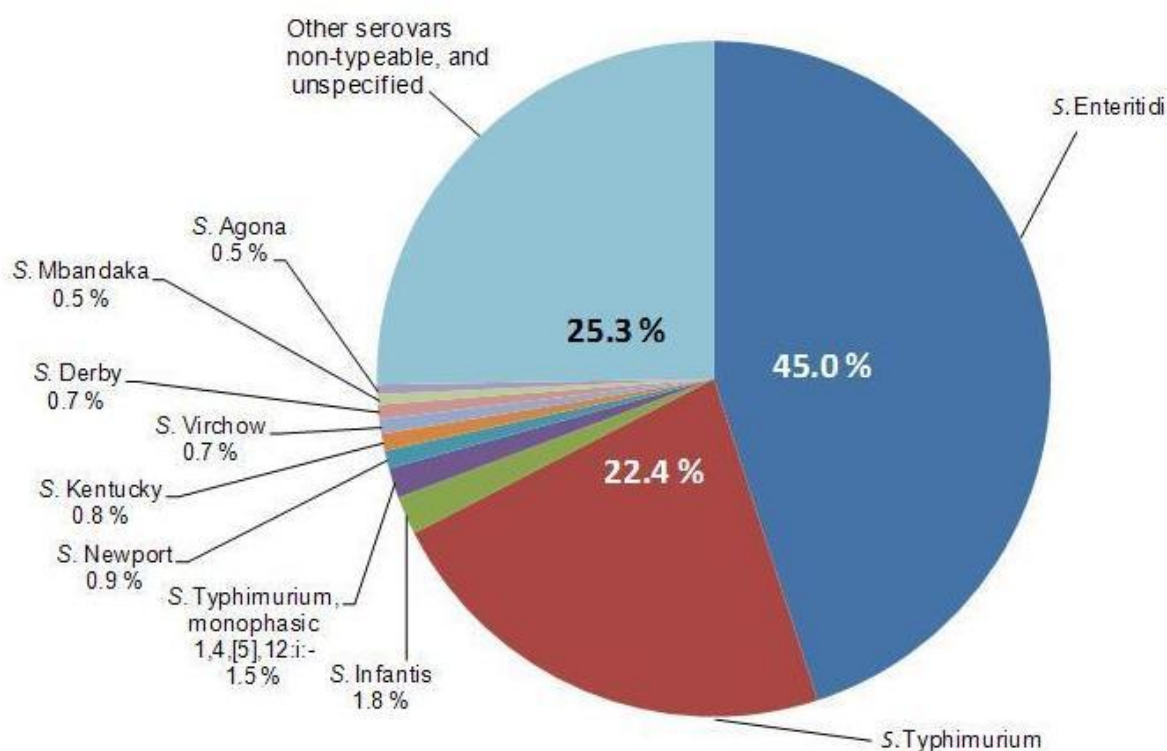
Η σαλμονέλα είναι ένα βακτήριο ραβδόμορφο, μη σπορογόνο, οξειδάση αρνητικό και ανήκει στα Gram αρνητικά (βλ. εικόνα 3.1.1). Ο συγκεκριμένος μικροοργανισμός αναπτύσσεται σε θερμοκρασίες από 6,5-47 °C, σε χαμηλό pH με ενδεικτική τιμή το 4,5, σε αερόβιες και μη αερόβιες συνθήκες και σε τιμές ενεργότητας νερού $a_w > 0.95$ κάτι το οποίο διαφοροποιείται ανάλογα με το στέλεχος. Η άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης της σαλμονέλας είναι αυτή του ανθρώπινου σώματος (36°C). Τα στελέχη της σαλμονέλας είναι προαιρετικά ενδοκυτταρικά παθογόνα. Οι περισσότερες μολύνσεις οφείλονται στην κατανάλωση μολυσμένων τροφίμων. Τα στελέχη της σαλμονέλας μπορούν να χωριστούν σε δύο μεγάλες κατηγορίες-τα τυφοειδή και τα μη τυφοειδή. Τα πιο κοινά στελέχη είναι τα μη τυφοειδή και συνήθως προκαλούν αυτοπεριοριζόμενες γαστρεντερικές νόσους. Επιπλέον μπορούν να μολύνουν μία μεγάλη γκάμα ζώων και είναι ζωονοσογόνα, που σημαίνει ότι μπορούν να μεταφερθούν μεταξύ των ανθρώπων και άλλων ζώων. Τα τυφοειδή στελέχη περιλαμβανομένων της *Salmonella typhi* και της *Salmonella paratyphi* A προσαρμόζονται στον ανθρώπινο οργανισμό και δεν εμφανίζονται στα ζώα (www.wikipedia.com, Overview of Food Microbiology, USDA, 2011, Monaghan et al 2010).



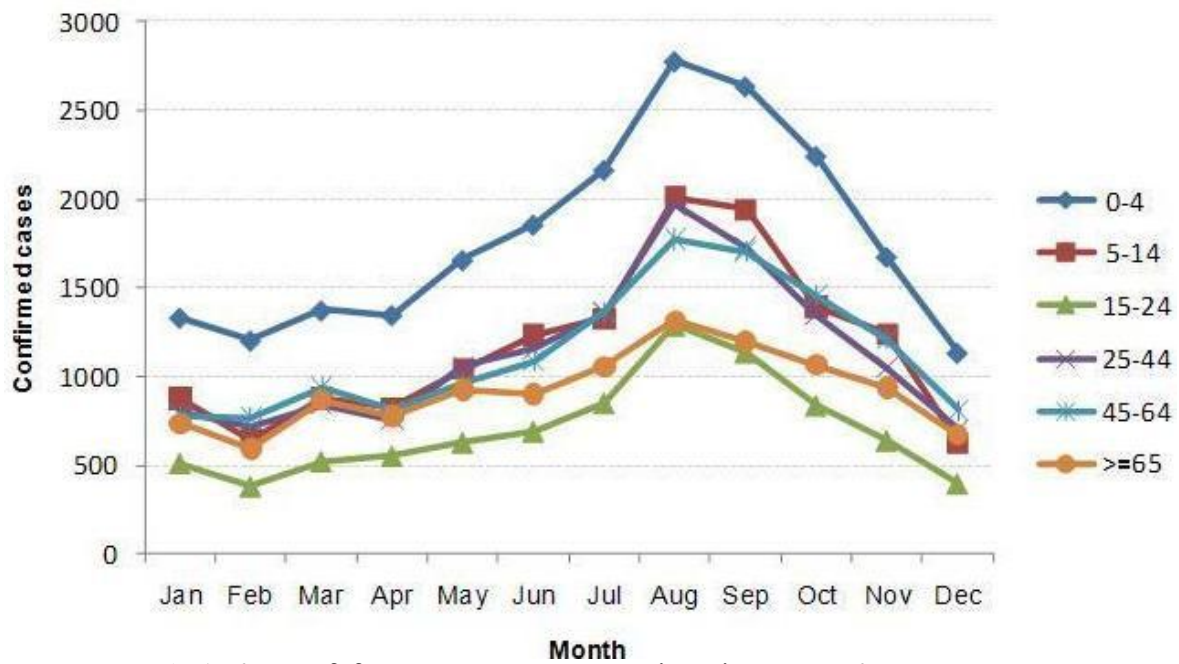
Εικόνα 3.1.1 Βακτήριο σαλμονέλας.
Πηγή: www.wikipedia.com

3.1.1.1 Παθογένεια

Παλαιότερα ο μικροοργανισμός αυτός είχε συσχετισθεί με τροφικές λοιμώξεις από αυγά, πουλερικά και γαλακτοκομικά προϊόντα, αλλά μπορεί να μεταδοθεί και από φρέσκα προϊόντα. Συνήθως όμως η μεταφορά στον άνθρωπο γίνεται μέσω τροφών ζωικής προέλευσης όπως το μοσχάρι, τα πουλερικά, τα γαλακτοκομικά και τα αυγά. Οι εντεροτοξίνες που παράγονται από την σαλμονέλα έχουν ως αποτέλεσμα την εμφάνιση συμπτωμάτων όπως ναυτία, εμετό, κοιλιακές κράμπες, διάρροια, πυρετό και πονοκέφαλο. Τα συμπτώματα εμφανίζονται 6-48 ώρες μετά την έκθεση του οργανισμού στο μολυσμένο τρόφιμο και διαρκούν από 1-7 μέρες ή και παραπάνω κάτι το οποίο εξαρτάται από την ηλικία, την κατάσταση υγείας του ξενιστή, την ποσότητα που κατανάλωσε και τον βαθμό παθογένειας του στελέχους της σαλμονέλας (www.wikipedia.com, Overview of Food Microbiology, USDA,2011, Monaghan et al 2010). Πειράματα σε εθελοντές έχουν δείξει ότι η λοιμογόνος δόση διαφέρει ανάλογα με το είδος των σαλμονέλων. Γενικά η λοιμογόνος δόση είναι δυνατόν να κυμαίνεται από μερικά κύτταρα μέχρι μερικά εκατομμύρια κύτταρα κάτι το οποίο εξαρτάται από το είδος της σαλμονέλων, από την ηλικία και την κατάσταση του ανοσοποιητικού συστήματος των ασθενών (Παπαδοπούλου, 2001).



Εικόνα 3.1.1.1 (α) Κατανομή των 10 πιο συνηθισμένων στελεχών σαλμονέλας στον άνθρωπο, δεδομένα από 26 κράτη μέλη, 2010. Πηγή: EFSA, ECDC- EU summary report 2010, EFSA Journal 2012; 10(3):2597



Εικόνα 3.1.1.1(b) Αριθμός επιβεβαιωμένων περιστατικών σαλμονέλλωσης σε ανθρώπους σε σχέση με την ηλικία τους το 2010. Πηγή: EFSA, ECDC-EU summary report 2010, EFSA Journal 2012;10(3)2597

Παρατηρείται στο διάγραμμα της Εικόνας 3.1.1.1(b) ότι οι πιο ευάλωτες ηλικιακές ομάδες είναι από 0-14 και ειδικά τα παιδιά από 0-4. Ο πιθανότερος λόγος μόλυνσης των παιδιών σε αυτές τις ηλικίες είναι το χαμηλό επίπεδο υγιεινής όσον αφορά το πλύσιμο των χεριών, καθώς τα παιδιά αυτής της ηλικίας μπορεί να πιάσουν κάποιο αντικείμενο και στην συνέχεια να τοποθετήσουν τα χέρια τους στο στόμα επιτρέποντας με αυτό τον τρόπο την είσοδο του μικροβίου στον οργανισμό τους. Επίσης μπορεί να οφείλεται στο ότι παιδιά τέτοιας ηλικίας δεν έχουν τα απαιτούμενα αντισώματα, καθώς δεν έχουν προσβληθεί από πολλούς μικροοργανισμούς.

Country	2012						2011		2010		2009		2008		
	National data	Report type	Total cases	Confirmed cases	Rate	ASR	Cases	Rate	Cases	Rate	Cases	Rate	Cases	Rate	
Austria	Y	C	1 778	1 773	21.09	21.75	1 432	17.04	2 179	26.02	2 775	33.21	2 312	27.79	
Belgium	N	C	3 101	3 101	-	-	3 177	-	3 169	-	3 113	-	3 831	-	
Bulgaria	Y	A	839	839	11.45	12.37	924	12.54	1 154	15.55	1 247	16.70	1 516	20.17	
Cyprus	Y	C	90	90	10.44	10.29	110	13.10	136	16.60	134	16.82	169	21.77	
Czech Republic	Y	C	10 397	10 245	97.53	99.35	8 499	81.05	8 209	78.47	10 480	100.53	10 707	103.52	
Denmark	Y	C	1 207	1 207	21.63	21.34	1 170	21.04	1 608	29.05	2 130	38.65	3 669	67.00	
Estonia	Y	C	287	249	18.67	18.70	375	28.07	381	28.48	261	19.49	647	48.24	
Finland	Y	C	2 199	2 199	40.71	41.55	2 098	39.03	2 421	45.24	2 327	43.69	3 127	59.00	
France	Y	C	8 705	8 705	13.34	12.55	8 685	13.37	7 184	11.12	7 153	11.12	7 186	11.23	
Germany	Y	C	20 848	20 493	25.10	26.55	23 982	29.40	24 833	30.43	31 395	38.37	42 885	52.27	
Greece	Y	C	404	404	3.63	3.75	471	4.23	297	2.66	403	3.60	792	7.08	
Hungary	Y	C	5 867	5 462	55.24	57.83	6 169	62.85	5 953	60.42	5873	59.47	6 637	67.05	
Ireland	Y	C	315	309	6.74	6.24	311	6.80	349	7.81	335	7.53	447	10.03	
Italy ²	N	C	1 453	1 453	-	-	4 464	7.36	5305	8.79	5 715	9.52	6 662	11.17	
Latvia	Y	C	556	547	26.75	27.52	995	47.96	877	41.36	795	36.76	1 229	56.08	
Lithuania	Y	C	1 762	1 762	58.67	60.02	2 294	75.16	1 962	62.45	2063	64.80	3 308	102.98	
Luxembourg	Y	C	136	136	25.91	25.35	125	24.42	211	42.03	162	32.83	153	31.64	
Malta	Y	C	88	88	21.08	19.74	129	31.09	160	38.65	125	30.42	161	39.48	
Netherlands	N	C	2 198	2 198	-	-	1 284	-	1447	-	1204	-	1627	-	
Poland	Y	A	8 444	7 952	20.64	-	8 400	21.80	9 257	24.26	8 529	22.37	9 149	24.01	
Portugal	Y	C	190	185	1.76	1.90	174	1.68	205	1.98	220	2.12	332	3.20	
Romania	Y	C	775	698	3.47	3.52	989	4.96	1285	6.41	1105	5.47	624	3.06	
Slovakia	Y	C	4 965	4 627	85.62	86.49	3 897	72.27	4 942	91.69	4182	77.70	6 849	127.40	
Slovenia	Y	C	392	392	19.07	19.62	400	19.51	363	17.73	616	30.31	1 033	51.39	
Spain	N	C	4 181	4 181	-	-	3 786	-	4 420	-	4 304	-	3 833	-	
Sweden	Y	C	2 922	2 922	30.81	30.70	2 887	30.66	3 612	38.67	3 054	32.99	4 185	45.57	
United Kingdom	Y	C	8 812	8 812	13.99	13.51	9 455	15.12	9 670	15.58	10 479	17.00	11 511	18.82	
EU Total	-	-	92 911	91 029	21.82	21.82	96 682	20.75	101 589	21.78	110 179	23.94	134 581	29.61	
Iceland	Y	C	38	38	11.89	12.23	45	14.13	34	10.70	35	10.96	134	42.48	
Liechtenstein	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0.00	
Norway	Y	C	1 371	1 371	27.50	27.22	1 290	26.22	1370	28.20	1 235	25.73	1 941	40.97	
EU/ EEA Total	-	-	94 320	92 438	21.89	21.88	98 017	20.80	102 993	21.84	111 449	23.95	136 656	29.74	

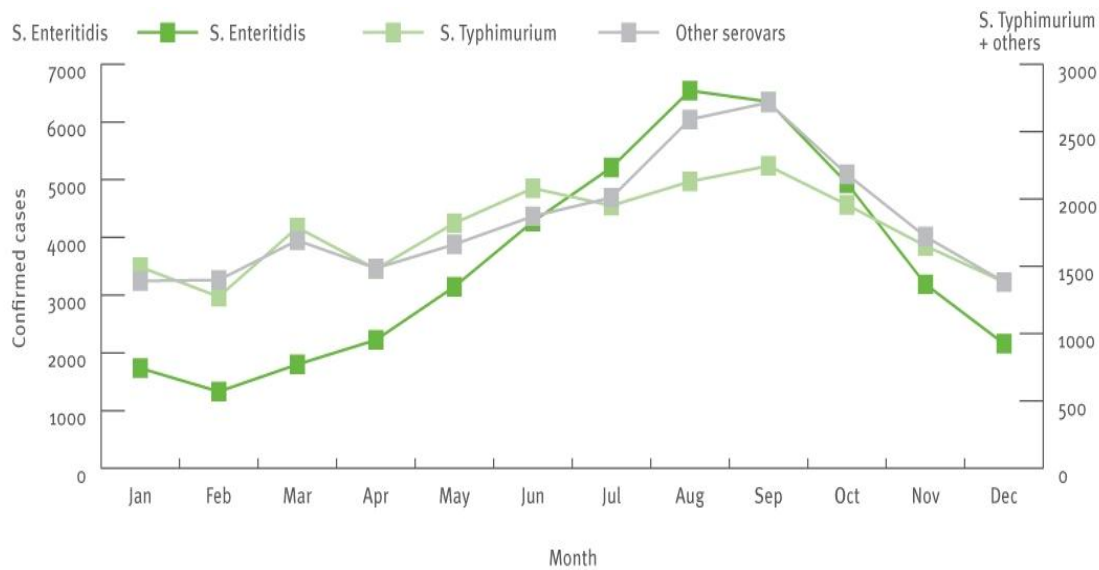
Εικόνα 3.1.1.2(c) Αριθμοί και λόγοι επιβεβαιωμένων περιστατικών σαλμονέλλωσης, EU/EEA, 2008-2012.

Πηγή: European Centre for Disease Prevention and Control. Annual epidemiological report 2014-food and waterborne diseases and zoonoses, 2014

3.1.1.2 Προστασία

Για την προστασία των καταναλωτών έχουν θεσπιστεί διάφορα μέτρα και τρόποι επεξεργασίας για τα τρόφιμα. Το βακτήριο της σαλμονέλλας δεν καταστρέφεται με την ψύξη-κατάψυξη παρά μόνο επιβραδύνεται η ανάπτυξη του. Για την καταστροφή του χρησιμοποιείται ακτινοβολία UV ή θέρμανση. Η σαλμονέλλα καταστρέφεται αν θερμανθεί στους 55 °C για 90 λεπτά ή στους 60 °C για 12 λεπτά. Για την προστασία από μολύνσεις σαλμονέλλας προτείνεται η θέρμανση του τροφίμου για τουλάχιστον 10 λεπτά σε θερμοκρασία 75 °C. Ιδιαίτερη προσοχή χρειάζεται τους καλοκαιρινούς μήνες κυρίως καθώς τα τρόφιμα είναι πιο πιθανό να αλλοιωθούν λόγω των υψηλών θερμοκρασιών του περιβάλλοντος και των υψηλών ποσοστών υγρασίας που βοηθούν στην καλύτερη και γρηγορότερη ανάπτυξη μικροοργανισμών. Αυτό επιβεβαιώνεται από το διάγραμμα της

Εικόνας 3.1.1.2 που δείχνει επιβεβαιωμένα περιστατικά σαλμονέλλωσης στους μήνες του έτους 2009.

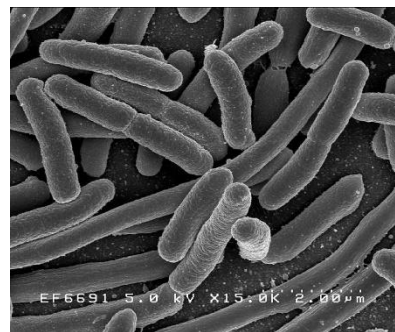


TESSy: The European Surveillance System.
Reporting countries: Austria, Belgium, Cyprus, Czech Republic, Denmark, Estonia, Finland, France, Germany, Greece, Hungary, Ireland, Italy, Lithuania, Luxembourg, Malta, Netherlands, Portugal, Slovakia, Slovenia, Spain, Sweden and the United Kingdom.

Εικόνα 3.1.1.2 Επιβεβαιωμένα περιστατικά σαλμονέλλωσης σε ανθρώπους ανά μήνα το έτος 2009. Πηγή: EFSA, ECDC-EU summary report 2009, EFSA Journal 2011;9(3):2090

3.1.2 *Escherichia coli*

Η *Escherichia coli* είναι ένα Gram αρνητικό βακτήριο, προαιρετικά αναερόβιο, με ραβδοειδές σχήμα, του γένους *Escherichia* που το συναντάμε συνήθως στην πεπτική οδό θερμόαιμων οργανισμών. Τα περισσότερα στελέχη της *E. coli* είναι άκακα για τον ξενιστή αλλά κάποια άλλα μπορούν να προκαλέσουν σοβαρές τροφικές δηλητηριάσεις και είναι ανά διαστήματα υπεύθυνα για την απόσυρση τροφίμων από την αγορά λόγω μόλυνσης. Τα άκακα στελέχη είναι μέρος της φυσικής μικροχλωρίδας του πεπτικού και είναι ωφέλιμα για τον ξενιστή καθώς παράγουν την βιταμίνη K και αποτρέπουν την εγκατάσταση παθογόνων βακτηρίων στο πεπτικό σύστημα. Η *E. coli* μαζί με άλλους προαιρετικά αναερόβιους μικροοργανισμούς αποτελούν το 0,1% της φυσικής μικροχλωρίδας. Από την άλλη τα στελέχη που προκαλούν προβλήματα στην υγεία του



Εικόνα 3.1.2 *E. Coli* Πηγή: www.wikipedia.com

ξενιστή βρίσκονται κυρίως σε χορτοφάγα ζώα, βοοειδή κυρίως. Το κρέας τους μπορεί να μολυνθεί από τα περιττώματα λόγω χαμηλών συνθηκών επεξεργασίας κατά την σφαγή και

τα περιπτώματα τους μπορεί επιπλέον να μολύνουν και άλλα τρόφιμα (γάλα, λαχανικά) αλλά και το νερό. Η *E. coli* αναπτύσσεται σε θερμοκρασίες από 3-50 °C με άριστη τιμή 37-41 °C, σε τιμές pH από 4.3-10.0 και σε τιμές $a_w > 0.94$ (www.ecdc.europa.eu, www.wikipedia.com).

3.1.2.1 Παθογένεια

Τα λοιμογόνα στελέχη της *E. coli* μπορούν να προκαλέσουν γαστρεντερικές μολύνσεις καθώς και μολύνσεις του ουροποιητικού συστήματος και νεογνική μηνιγγίτιδα. Τα συμπτώματα κάνουν την εμφάνιση τους μέσα σε 3-4 ημέρες από την μόλυνση του οργανισμού και είναι έντονες κοιλιακές κράμπες, διάρροια που συνήθως συνοδεύεται από αίμα μέσα σε διάστημα 24 ωρών και κάποιες φορές και πυρετό. Σε σπάνιες περιπτώσεις, περίπου 8%, τα λοιμογόνα στελέχη είναι υπεύθυνα για νέκρωση του εντερικού ιστού και διάτρηση του που οδηγεί σε αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο (HUS). Η αντιμετώπιση με αντιβιοτικά δεν βοηθάει και υπάρχει ένα ποσοστό θνησιμότητας της τάξης 3-5%. Υπάρχει μία ομάδα λοιμογόνων στελεχών της *E. coli* τα οποία έχουν την ικανότητα να παράγουν μία τοξίνη που ονομάζεται τοξίνη Shiga. Η ομάδα αυτή ονομάζεται Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC). Το σημαντικότερο κλινικά στέλεχος θεωρείται το O157:H7. Εκτός της Shiga μία άλλη επικίνδυνη τοξίνη είναι η βεροκυτοτοξίνη που παράγεται από τα Verocytotoxin-producing *E. coli* (VTEC). Τα συμπτώματα που προκαλούνται από αυτές τις τοξίνες είναι διάρροια, πυρετός και εμετός. Σε γενικές γραμμές η μόλυνση του οργανισμού επιτυγχάνεται μετά την κατανάλωση μολυσμένου φαγητού, όπως είναι το μη σωστά μαγειρεμένο βοδινό ή μολυσμένα λαχανικά ή μολυσμένο νερό, αλλά επιπλέον μπορεί να υπάρξει και άμεση μόλυνση από άτομο σε άτομο και από ζώα στον άνθρωπο. Η κύριες πηγές όμως STEC και VTEC είναι τα βοοειδή, τα πρόβατα και τα αρνιά. Στην Εικόνα 3.1.2.1 φαίνονται περιστατικά μολύνσεων από STEC, VTEC από το 2007-2011 σε χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης (Fraser et al 2013, ECDC-annual epidemiologic report, Overview of Food Microbiology, USDA, 2011).

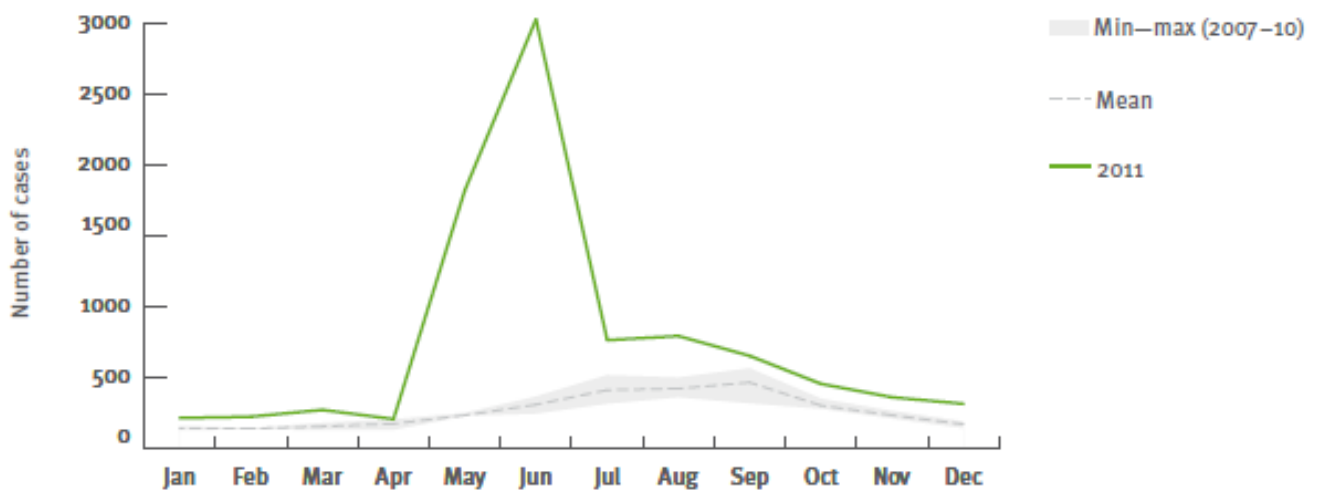
Country	2011						2010		2009		2008		2007	
	National coverage	Report type	Total cases	Confirmed cases and notification rate per 100 000 population			Confirmed cases and notification rate per 100 000 population		Confirmed cases and notification rate per 100 000 population		Confirmed cases and notification rate per 100 000 population		Confirmed cases and notification rate per 100 000 population	
				Cases	Rate	Age-standardised rate	Cases	Rate	Cases	Rate	Cases	Rate	Cases	Rate
Austria	Y	C	129	120	1.43	1.53	88	1.05	91	1.09	69	0.83	82	0.99
Belgium	N	C	100	100	-	-	84	-	96	-	103	-	47	-
Bulgaria	Y	A	1	1	0.01	0.01	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00
Cyprus	Y	C	0	0	0.00	0.00	0	0.00	0	0.00	2	0.25	0	0.00
Czech Republic	Y	C	7	7	0.07	0.06	-	-	-	-	-	-	-	-
Denmark	Y	C	225	215	3.87	3.70	178	3.22	160	2.90	161	2.94	156	2.86
Estonia	Y	C	4	4	0.30	0.30	5	0.37	4	0.30	3	0.22	3	0.22
Finland	Y	C	28	27	0.50	0.48	21	0.39	29	0.54	8	0.15	12	0.23
France	N	C	221	221	-	-	103	-	93	-	85	-	58	-
Germany	Y	C	5638	5558	6.80	6.93	955	1.17	887	1.08	876	1.07	870	1.06
Greece	Y	C	1	1	0.01	0.01	1	0.01	0	0.00	0	0.00	2	0.02
Hungary	Y	C	11	11	0.11	0.12	7	0.07	1	0.01	0	0.00	1	0.01
Ireland	Y	C	285	275	6.14	4.99	197	4.41	237	5.33	213	4.84	115	2.67
Italy	N	C	69	51	-	-	33	-	51	-	26	-	27	-
Latvia	Y	C	0	0	0.00	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00
Lithuania	Y	C	0	0	0.00	0.00	1	0.03	0	0.00	0	0.00	0	0.00
Luxembourg	Y	C	14	14	2.74	2.65	7	1.39	5	1.01	4	0.83	1	0.21
Malta	Y	C	2	2	0.48	0.47	1	0.24	8	1.93	8	1.95	4	0.98
Netherlands	Y	C	845	845	5.07	5.08	478	2.88	314	1.91	92	0.56	88	0.54
Poland	Y	C	5	5	0.01	0.01	3	0.01	0	0.00	3	0.01	2	0.01
Portugal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Romania	Y	C	2	2	0.01	0.01	2	0.01	0	0.00	4	-	0	0.00
Slovakia	Y	C	5	5	0.09	0.09	10	0.18	14	0.26	8	0.15	6	0.11
Slovenia	Y	C	25	25	1.22	1.24	20	0.98	12	0.59	7	0.35	4	0.20
Spain	Y	C	20	20	0.04	0.04	18	0.04	14	0.03	24	0.05	19	0.04
Sweden	Y	C	477	467	4.96	4.85	334	3.58	228	2.46	304	3.31	262	2.88
United Kingdom	Y	C	1509	1509	2.41	2.34	1110	1.79	1339	2.17	1164	1.90	1149	1.89
EU total	-	-	9623	9485	2.57	2.57	3656	1.00	3583	0.97	3164	0.92	2908	0.81
Iceland	Y	C	2	2	0.63	0.49	2	0.63	8	2.51	4	1.27	13	4.23
Liechtenstein	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0.00	-	-
Norway	Y	C	47	47	0.96	0.89	52	1.07	108	2.25	22	0.46	26	0.56
Total	-	-	9672	9534	2.54	2.54	3710	1.00	3699	0.99	3190	0.91	2947	0.81

Εικόνα 3.1.2.1 Αριθμός περιστατικών STEC,VTEC-EU/EEA το 2007-2011. Πηγή: www.ecdc.europa.eu

3.1.2.2 Προστασία

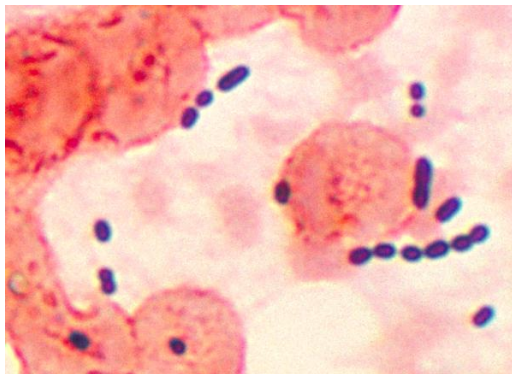
Η *E. coli* είναι ένα μη σπορογόνο βακτήριο, αυτό σημαίνει ότι μπορεί να καταστραφεί με την θέρμανση ή με άλλες τεχνικές που στρεσάρουν τον μικροοργανισμό. Παρόλα αυτά η *E. coli* δεν καταστρέφεται με την ψύξη-κατάψυξη του τροφίμου. Ο αποτελεσματικότερος τρόπος είναι η παστερίωση και η θέρμανση. Για την αποφυγή μολύνσεων πρέπει να αποφεύγεται η κατανάλωση μη σωστά μαγειρεμένου φαγητού από βοδινό, μη παστεριωμένα γάλατα και χυμοί, λαχανικά και να γίνεται θέρμανση του φαγητού στους 70°C. Επιπλέον σημαντικό ρόλο έχει η τήρηση των κανόνων υγιεινής, όπως το πλύσιμο των χεριών πριν την ετοιμασία του φαγητού ή μετά την επαφή με ζώα όπως αγελάδες και αιγοπρόβατα ή και την τροφή τους. Για την προστασία των ανθρώπων

από μολυσμένο νερό ο μικροοργανισμός μπορεί να καταστραφεί με την χλωρίωση του νερού (www.foodsafety.gov).



Εικόνα 3.1.2.2 Εποχιακή διακύμανση: αριθμός επιβεβαιωμένων περιστατικών STEC/VTEC ανά μήνα, ΕΕ/ΕΕΑ, 2007-2011. Πηγή: annual epidemiological report 2013 ECDC

3.1.3 *Enterococcus* sp.



Εικόνα 3.1.3 Εντερόκοκκος Πηγή: wikipedia

Ο εντερόκοκκος είναι ένας προαιρετικά αναερόβιος μικροοργανισμός που ανήκει στα Gram θετικά και έχει σχήμα σφαίρας. Συχνά εμφανίζεται σε ζεύγη ή κοντές αλυσίδες (βλ. Εικόνα 3.1.3). Γενικά είναι δύσκολο να τον ξεχωρίσουμε από τους στρεπτόκοκκους βάση μόνο τον φυσικών χαρακτηριστικών. Δύο από τα είδη του εντερόκοκκου συμβιώνουν συνήθως στο ανθρώπινο έντερο, ο *E. faecalis* (90-95%) και ο *E. faecium* (5-10%). Παρόλο Gram θετικός, ο εντερόκοκκος δεν σχηματίζει σπόρια. Παρόλα αυτά είναι ιδιαίτερα ανθεκτικός σε ένα ευρύ φάσμα περιβαλλοντικών συνθηκών, όπως ακραίες θερμοκρασίες (10-45°C), pH (4.5-10.0) και υψηλές συγκεντρώσεις χλωριούχου νατρίου (6,5%) και χολικών αλάτων (40%).

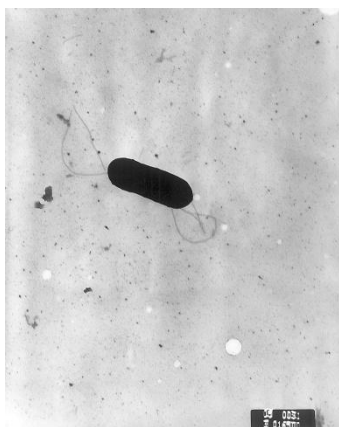
3.1.3.1 Παθογένεια

Οι εντερόκοκκοι είναι παρασιτικοί μικροοργανισμοί και δεν διαθέτουν δραστικές τοξίνες. Για τον λόγο αυτό τα βακτήρια αυτά θεωρούνται ότι έχουν περιορισμένη ικανότητα πρόκλησης κάποιας νόσου. Στην περίπτωση όμως πρόκλησης νόσου, η νόσος που θα προκαλέσουν μπορεί να είναι θανάσιμη για τον ασθενή ιδιαίτερα σε άτομα που νοσηλεύονται. Οι εντερόκοκκοι προκαλούν λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος, βακτηριαιμία, βακτηριακή ενδοκαρδίτιδα και μηνιγγίτιδα (www.wikipedia.com).

3.1.3.2 Προστασία

Ο εντερόκοκκος βρίσκεται στα περιττώματα ανθρώπων και ζώων καθώς απαντάτε στο παχύ έντερο αλλά και στην ουρογεννητική οδό. Συνεπώς μπορεί να μεταφερθεί στον άνθρωπο μέσω μολυσμένης τροφής λόγω κακής υγιεινής των εγκαταστάσεων επεξεργασίας κρεάτων ή μέσω μολυσμένου νερού. Σε γενικές γραμμές οι περισσότερες λοιμώξεις από εντερόκοκκους προκαλούνται από την εντερική χλωρίδα του ασθενούς, αν και οι μικροοργανισμοί αυτοί μπορούν να μεταφερθούν από ασθενή σε ασθενή ή να αποκτηθούν από την κατανάλωση μολυσμένου τροφίμου ή νερού, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως. Η πρόληψη και ο έλεγχος των εντεροκοκκικών λοιμώξεων είναι δύσκολος. Ο προσεκτικός περιορισμός της αντιβιοτικής αγωγής και η υιοθέτηση κατάλληλων πρακτικών ελέγχου των λοιμώξεων και κανόνων υγιεινής μπορεί να ελαττώσει τον κίνδυνο αποικισμού από αυτά τα βακτήρια, αλλά η πλήρης εξάλειψη αυτών των λοιμώξεων είναι αδύνατη (www.wikipedia.com).

3.1.4 *Listeria* sp.



Εικόνα 3.1.4 *L. monocytogenes*
Πηγή: www.wikipedia.com

Η *Listeria* είναι ένα Gram θετικό βακτήριο, μη σπορογόνο, με ραβδοειδές σχήμα και εμφανίζεται ατομικά ή σε μορφές κοντών αλυσίδων (βλ. Εικόνα 3.1.4). Η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης της είναι 30-37 °C, αλλά μπορεί να αναπτύσσεται και σε θερμοκρασίες πολύ χαμηλές μέχρι και 4 °C απλά με πιο αργό ρυθμό, σε pH 4.4-9.4 και σε $a_w > 0.92$. Η *Listeria* είναι ευρέως διανεμημένη στο περιβάλλον, στο έδαφος, σε λαχανικά που αποσυντίθενται, σε λύματα, στο νερό, σε ζωοτροφές, σε φρέσκα και κατεψυγμένα πουλερικά, σε επεξεργασμένα κρέατα, στο γάλα, στο τυρί, στους ανθρώπους, αλλά και σε μονάδες επεξεργασίας τροφίμων μολύνοντας και ένα μεγάλο εύρος επεξεργασμένων κρεάτων. Κύρια όμως μέρη που αναπτύσσεται η *Listeria*

θεωρούνται το έδαφος και το λαχανικά σε στάδιο αποσύνθεσης, ζώντας σαν σαπρόφυτα. Μπορεί επίσης να επιβιώσει σε αρκετές δύσκολες συνθήκες όπως η υψηλή συγκέντρωση χλωριούχου νατρίου-αλάτι, σε υψηλές τιμές pH αλλά και σε υψηλές/χαμηλές θερμοκρασίες. Της ιδιότητας αυτές της κατέχουν και οι αβλαβής αλλά και οι λοιμογόνες μορφές του βακτηρίου (www.microbewiki.com).

Το γένος της *Listeria* αποτελείται από δέκα (10) στελέχη: *L. fleischmannii*, *L. grayi*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. marthii*, *L. monocytogenes*, *L. rocourtiae*, *L. seeligeri*, *L. weihenstephanensis*, *L. welshimeri* και *L. dinitrificans*. Κάθε στέλεχος αποτελείται από δύο (2) υποστελέχη.

3.1.4.1 Παθογένεια

Ο όρος λιστερίωση συνδέεται με μία ποικιλία συμπτωμάτων που είναι κοινά σε ανθρώπους και ζώα. Η *L.monocytogenes* προκαλεί λιστερίωση σε ανθρώπους και σε ζώα, ενώ η *L.ivenovii* μόνο σε ζώα και κυρίως σε πρόβατα (Todar, 2012). Η *L.monocytogenes* είναι ο αιτιολογικός παράγοντας της λιστερίωσης (www.microbewiki.com). Μέχρι το 1960 υπήρχε η πεποίθηση ότι η *L.monocytogenes* σχετίζεται αποκλειστικά με λοιμώξεις ζώων και σπανιότερα με ανθρώπους. Οι πραγματικές επιπτώσεις της λιστερίωσης στον άνθρωπο δεν είναι γνωστές, επειδή ο μέσος υγιής ενήλικας περνάει την λοίμωξη χωρίς συμπτώματα ή στην χειρότερη μοιάζει με μία απλή γρίπη. Σύμφωνα με πληροφορίες η *L.monocytogenes* υπάρχει στην εντερική οδό σε ποσοστό 5-10% του παγκόσμιου πληθυσμού χωρίς να προκαλεί την εκδήλωση συμπτωμάτων στους ξενιστές. Η *Listeria* προσβάλλει κυρίως εγκύους, νεογνίδια, και ενήλικες που βρίσκονται σε ανοσοκαταστολή (άτομα με AIDS, άτομα σε αιμοκάθαρση κ.ά.). Στις εγκύους ωστόσο αν και το σύνηθες σύμπτωμα είναι μία εικονική γρίπη, είναι πολύ πιθανή η μόλυνση του εμβρύου που μπορεί να οδηγήσει σε αποβολή, θνησιγένεια ή και γέννηση ενός εξαιρετικά άρρωστου νεογνού. Για την μόλυνση ενός ατόμου δεν μπορούμε να πούμε ακριβώς τη ποσότητα του μικροοργανισμού χρειάζεται καθώς εξαρτάται από το στέλεχος και από την κατάσταση υγείας του ατόμου. Σε περιστατικά που προκλήθηκαν όμως από γάλα παστεριωμένο και μη, λιγότεροι από 1.000 μικροοργανισμοί ήταν ικανοί να προκαλέσουν την ασθένεια. Η *Listeria* είναι ένα ενδοκυτταρικό παθογόνο βακτήριο που εκμεταλλεύεται του μηχανισμούς του κυττάρου και μεταφέρεται μέσω του κυκλοφορικού συστήματος μόλις περάσει από την γαστρεντερική οδό. Τα συμπτώματα μπορεί να εκδηλωθούν σε διάστημα ημερών μέχρι και εβδομάδων και είναι πυρετός, δύσκαμπτος αυχένας, σύγχυση, ατονία, εμετός και καμιά φορά διάρροια. Οι σοβαρότερες εκδηλώσεις λιστερίωσης μπορεί να προκαλέσουν μηνιγγίτιδα, σηψαιμία, γαστρεντερίτιδα κ.ά. (Monaghan et al 2010). Η λιστερίωση έχει ποσοστό θνησιμότητας πάνω από 25% για αυτό και είναι απαραίτητος ο έλεγχος των τροφίμων ώστε να υπάρχει απουσία του συγκεκριμένου βακτηρίου. Στην Εικόνα 3.1.4.1 βλέπουμε περιστατικά λιστερίωσης στην Ε.Ε από το 2008-2012.

Country	2012 National data	Report type	Total cases	Confirmed cases	Rate	ASR	2011 Cases	Rate	2010 Cases	Rate	2009 Cases	Rate	2008 Cases	Rate
Austria	Y	C	36	36	0.43	0.42	26	0.31	34	0.41	46	0.55	31	0.37
Belgium	Y	C	83	83	0.75	0.68	70	-	40	0.37	58	-	64	0.60
Bulgaria	Y	A	10	10	0.14	0.14	4	0.05	4	0.05	5	0.07	5	0.07
Cyprus	Y	C	1	1	0.12	0.15	2	0.24	1	0.12	0	0.00	0	0.00
Czech Republic	Y	C	32	32	0.31	0.30	35	0.33	26	0.25	32	0.31	37	0.36
Denmark	Y	C	50	50	0.90	0.87	49	0.88	62	1.12	97	1.76	51	0.93
Estonia	Y	C	3	3	0.23	0.21	3	0.23	5	0.37	3	0.22	8	0.60
Finland	Y	C	62	61	1.13	1.05	43	0.80	71	1.33	34	0.64	40	0.76
France	Y	C	348	348	0.53	0.53	282	0.43	312	0.48	328	0.51	276	0.43
Germany	Y	C	427	412	0.51	0.44	330	0.41	377	0.46	394	0.48	306	0.37
Greece	Y	C	11	11	0.10	0.09	10	0.09	10	0.09	4	0.04	1	0.01
Hungary	Y	C	13	13	0.13	0.13	11	0.11	20	0.20	16	0.16	19	0.19
Ireland	Y	C	11	11	0.24	0.29	7	0.15	10	0.22	10	0.23	13	0.29
Italy	N	C	36	36	-	-	129	0.21	157	0.26	109	0.18	118	0.20
Latvia	Y	C	6	6	0.29	0.28	7	0.34	7	0.33	4	0.19	5	0.23
Lithuania	Y	C	8	8	0.27	0.25	6	0.20	5	0.16	5	0.16	7	0.22
Luxembourg	Y	C	2	2	0.38	0.46	2	0.39	0	0.00	3	0.61	1	0.21
Malta	Y	C	1	1	0.24	0.22	2	0.48	1	0.24	0	0.00	0	0.00
Netherlands	Y	C	73	73	0.44	0.44	87	0.52	72	0.43	44	0.27	45	0.27
Poland	Y	C	54	54	0.14	0.14	62	0.16	59	0.16	32	0.08	33	0.09
Portugal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Romania	Y	C	11	11	0.06	0.05	1	0.01	6	0.03	6	0.03	0	0.00
Slovakia	Y	C	11	11	0.20	0.22	31	0.58	5	0.09	10	0.19	8	0.15
Slovenia	Y	C	7	7	0.34	0.33	5	0.24	11	0.54	6	0.30	3	0.15
Spain	N	C	107	107	-	-	91	-	129	-	121	-	88	-
Sweden	Y	C	72	72	0.76	0.70	56	0.60	63	0.67	73	0.79	60	0.65
United Kingdom	Y	C	183	183	0.29	0.29	164	0.26	176	0.28	235	0.38	206	0.34
EU Total	-	-	1 658	1 642	0.39	0.37	1 515	0.31	1 663	0.35	1 675	0.35	1 425	0.30
Iceland	Y	C	4	4	1.25	1.65	2	0.63	1	0.32	0	0.00	0	0.00
Liechtenstein	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0.00
Norway	Y	C	30	30	0.60	0.63	21	0.43	22	0.45	31	0.65	34	0.72
EU/EEA Total	-	-	1 692	1 676	0.39	0.38	1 538	0.31	1 686	0.35	1 706	0.35	1 459	0.31

Εικόνα 3.1.4.1 Αριθμοί και λόγοι επιβεβαιωμένων περιστατικών λιστερίωσης, EU/EEA, 2008-2012. Πηγή: European Centre of Disease Prevention and Control. Annual epidemiological report 2014-food and waterborne diseases and zoonoses 2014

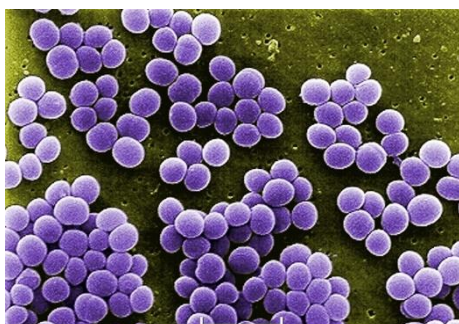
3.1.4.2 Προστασία

Για την προστασία των καταναλωτών από την *Listeria*, όπως και για άλλους μικροοργανισμούς ακολουθούνται κάποιες οδηγίες. Λόγω των σοβαρών προβλημάτων που μπορεί να προκαλέσει στην υγεία του ανθρώπου βάση οδηγιών είναι απαραίτητη η απουσία της από το τρόφιμο ώστε να βγει στην εμπόριο. Η *Listeria* έχει την ικανότητα να αναπτύσσεται και σε ιδιαίτερα χαμηλές θερμοκρασίες. Με αυτό τον τρόπο το βακτήριο μπορεί να αναπτυχθεί και να μολύνει τρόφιμα που αποθηκεύονται σε ψυγεία. Δεν αποτελεί έκπληξη το γεγονός ότι η λιστερίωση συνήθως συσχετίζεται με την κατάποση γάλατος,

κρέατος ή λαχανικών που διατηρούνται για μεγάλα χρονικά διαστήματα σε χαμηλές θερμοκρασίες ψυγείου (Todar,2012). Για την καταστροφή της *Listeria* ακολουθούνται διεργασίες παστερίωσης και θέρμανσης (καλό μαγείρεμα). Εταιρείες με εγκαταστάσεις επεξεργασίας κρέατος που παράγουν έτοιμα φαγητά όπως hot dog, αλλαντικά κ.ά. θα πρέπει να ακολουθούν εκτενείς πολιτικές αποστείρωσης και διαδικασίες αποφυγής της μόλυνσης από *Listeria*. Στην καθημερινότητα ο καταναλωτής για την αποφυγή πιθανής μόλυνσης θα πρέπει να αποφεύγει την κατανάλωση μη παστεριωμένου γάλατος ή προϊόντων που μπορεί να περιέχουν μη παστεριωμένο γάλα, να πλένει καλά τα μαγειρικά σκεύη και τα χέρια του μετά την επαφή και επεξεργασία μη μαγειρεμένου φαγητού, να ξεπλένει πολύ καλά με νερό ωμά υλικά, να φυλάσσουν μη μαγειρεμένες τροφές όπως κρέας, πουλερικά και θαλασσινά μακριά από φρούτα, λαχανικά και μαγειρεμένα φαγητά και άτομα που ανήκουν στις ομάδες υψηλού κινδύνου (άτομα σε ανοσοκαταστολή, εγκυμονούσες κ.ά.) θα πρέπει να ζεσταίνουν τρόφιμα όπως hot dog, αλλαντικά κ.ά. πριν την κατανάλωση τους (www.foodsafety.gov).

3.1.5 *Staphylococcus* sp.

Οι σταφυλόκοκκοι είναι σφαιρικά Gram θετικά βακτήρια που βρίσκονται ακίνητα και σχηματίζουν συμπλέγματα που μοιάζουν με σταφύλια (βλ. Εικόνα 3.1.5). Σχηματίζουν δέσμες επειδή διαχωρίζονται σε δύο επίπεδα, σε αντίθεση με τους συγγενικούς στρεπτόκοκκους οι οποίοι ενώ έχουν το ίδιο σχήμα σχηματίζουν αλυσίδες επειδή χωρίζονται σε ένα επίπεδο. Οι σταφυλόκοκκοι είναι προαιρετικά αναερόβιοι μικροοργανισμοί. Κυρίως αναπτύσσονται σε αερόβιες συνθήκες ή με ζύμωση παράγοντας γαλακτικό οξύ. Υπάρχουν δύο είδη αποικιών που σχηματίζονται. Αυτές που σχηματίζονται



Εικόνα 3.1.5 Μορφή Σταφυλόκοκκου
Πηγή: www.bacteriainphotos.com

από τον *S.aureus* που είναι κίτρινες και σε πλούσιο θρεπτικό μέσο γίνονται σχετικά μεγάλες και σε αυτές που σχηματίζονται από τον *S.epidermidis* που είναι άσπρες και σε πλούσιο θρεπτικό υλικό παραμένουν σχετικά μικρές (www.microbewiki.com).

Ο μικροοργανισμός μπορεί να αναπτυχθεί σε θερμοκρασίες 7-45 °C με βέλτιστη τιμή τους 37°C, pH από 4.2-9.3, σε συγκεντρώσεις χλωριούχου νατρίου σε επίπεδα μέχρι και 25% και σε $a_w > 0,85$. Οι σταφυλόκοκκοι υπάρχουν στον αέρα, στην σκόνη, τα λύματα, το νερό, το γάλα, σε τρόφιμα και εξοπλισμό επεξεργασίας τροφίμων, στους ανθρώπους και στα ζώα. Οι κύριες πηγές σταφυλόκοκκου είναι οι άνθρωποι και τα ζώα. Ζώα και πουλερικά είναι φορείς του *S.aureus* και μπορεί να οδηγήσουν σε λοιμώξεις. Άλλες γνωστές πηγές είναι οι μαστοί και θηλές της αγελάδας, οι αμυγδαλές και το δέρμα των χοίρων και το δέρμα κοτόπουλων και γαλοπουλών. Σταφυλόκοκκοι εντοπίζονται στην

ρινική και αναπνευστική δίοδο καθώς και στα μαλλιά και το δέρμα σε ποσοστό μεγαλύτερο από 50% σε υγιή άτομα.

3.1.5.1 Παθογένεια

Η τροφική δηλητηρίαση από σταφυλόκοκκο μπορεί να προκληθεί από την κατανάλωση μολυσμένων τροφίμων με τοξίνες που έχουν παραχθεί από τον *S.aureus*. Ο πιο κοινός τρόπος μόλυνσης των τροφίμων με σταφυλόκοκκο είναι μέσω της επαφής με τους εργάτες των βιομηχανιών τροφίμων που είναι φορείς του μικροβίου. Ο σταφυλόκοκκος είναι αρκετά ανθεκτικός σε υψηλές συγκεντρώσεις αλατιού με αποτέλεσμα να μπορεί να αναπτυχθεί σε αλμυρά τρόφιμα, όπως τα αλλαντικά. Όσο ο μικροοργανισμός αναπτύσσεται παράγει τοξίνες που μπορούν να πυροδοτήσουν κάποια νόσο (CDC). Ο κυριότερος αντιπρόσωπος των σταφυλόκοκκων σε περιπτώσεις λοιμώξεων είναι ο *S.aureus*. Ο *S.aureus* εκφράζει πολλούς ιογενείς παράγοντες όπως:

1. Επιφανειακές πρωτεΐνες που προάγουν τον αποικισμό στον ιστό των ξενιστών
2. Παράγοντες που προάγουν την βακτηριακή εξάπλωση στους ιστούς
3. Επιφανειακούς παράγοντες που αναστέλλουν την φαγοκυτταρική περικύκλωση
4. Βιοχημικούς παράγοντες που ενισχύουν την επιβίωση τους κατά των φαγοκυττάρων
5. Ανοσολογικές μεταμφιέσεις
6. Τοξίνες που καταστρέφουν την κυτταρική μεμβράνη των ευκαρυωτικών κυττάρων
7. Εξωτοξίνες που βλάπτουν τους ιστούς του ξενιστή ή διαφορετικά προκαλούν συμπτώματα ασθένειας
8. Κληρονομούν και αναπτύσσουν αντοχή σε αντιμικροβιακούς παράγοντες.

Για την πλειονότητα των νόσων που προκαλούνται από τον *S.aureus*, η παθογένεια οφείλεται σε πολλούς παράγοντες οπότε είναι δύσκολη η ακριβής κατανόηση του ρόλου που παίζει ο κάθε παράγοντας (Todar,2012). Η εμφάνιση των συμπτωμάτων τροφικής δηλητηρίασης από σταφυλόκοκκο γίνεται αμέσως σε διάστημα 30 λεπτών έως και 8 ώρες από την έκθεση, αυτό εξαρτάται από την ατομική ευαισθησία του κάθε οργανισμού, από την ποσότητα μολυσμένου φαγητού που καταναλώθηκε, την ποσότητα της τοξίνης που υπήρχε στο τρόφιμο που καταναλώθηκε και γενικά στην κατάσταση της υγείας του ατόμου. Τα συμπτώματα που εμφανίζονται είναι ναυτία, εμετός, τάση για εμετό, κοιλιακές κράμπες, ατονία και διάρροια. Κάποια άτομα μπορεί και να μην εμφανίσουν όλα τα παραπάνω συμπτώματα της ασθένειας. Τα συμπτώματα συνήθως διαρκούν από 24-48 ώρες (Overview of Food Microbiology,USDA.2011).

3.1.5.2 Προστασία

Ο *S.aureus* είναι αρκετά ευάλωτος στην καταστροφή από διεργασίες θέρμανσης και γενικά από όλες τις μεθόδους απολύμανσης αν εφαρμοστούν σωστά. Ενώ οι διεργασίες θέρμανσης (π.χ. παστερίωση) και φυσιολογικές θερμοκρασίες μαγειρέματος είναι ικανές να καταστρέψουν τον παθογόνο οργανισμό, οι εγκαταστάσεις τροφίμων πρέπει να είναι σε συνεχή επαγρύπνηση καθώς η εντεροτοξίνη που παράγεται είναι εξαιρετικά ανθεκτική στην θερμότητα και δεν αδρανοποιείται. Υπάρχουν οδηγίες για τις βιομηχανίες που εξασφαλίζει ότι σε κάθε βήμα κατά την επεξεργασία υπάρχουν επαρκή μέθοδοι ασφάλειας του τροφίμου. Η ανθεκτικότητα στην αύξηση της θερμοκρασίας αυξάνεται σε τρόφιμα αποξηραμένα, με πολλά λιπαρά και με πολύ αλάτι και επιβιώνει σε συνθήκες κατάψυξης. Ως εκ τούτου, η παρουσία του βακτηρίου ή της εντεροτοξίνης σε επεξεργασμένα τρόφιμα ή στο εξοπλισμό επεξεργασίας τροφίμων (σε σημεία που είναι δύσκολο να καθαριστούν) είναι γενικά ένδειξη χαμηλών επιπέδων απολύμανσης και πρακτικών επεξεργασίας. Τρόφιμα τα οποία εμφανίζουν το μεγαλύτερο κίνδυνο είναι τρόφιμα που έχουν υποστεί θερμική επεξεργασία (π.χ. μαγείρεμα) ή εφαρμογές ανασταλτικών παραγόντων (π.χ. παστά κρέατα) (Overview of Food Microbiology, USDA,2011). Στην καθημερινότητα ο άνθρωπος μπορεί να προφυλαχτεί με την υιοθέτηση κάποιων κανόνων υγιεινής. Η πλύση των χεριών και κάτω από τα νύχια πριν την επαφή με το φαγητό για την προετοιμασία του, η αποφυγή προετοιμασίας φαγητού σε περίπτωση που το άτομο πάσχει από κάποια ρινική ή οφθαλμική λοίμωξη. Τέλος η σωστή αποστείρωση της κουζίνας και η διατήρηση των ζεστών φαγητών σε θερμοκρασία 60°C και των κρύων φαγητών σε θερμοκρασία 4°C ή λιγότερο παίζει σημαντικό ρόλο (www.foodsafety.gov).

3.1.6 *Pseudomonas* sp.

Η *Pseudomonas* είναι ένα Gram αρνητικό βακτήριο, με ραβδοειδές σχήμα, αερόβιο και μη σπορογόνο (βλ. Εικόνα 3.1.6). Βακτήρια *Pseudomonas* μπορούν να βρεθούν τόσο



Εικόνα 3.1.6 *Pseudomonas* Πηγή:
www.textofmicrobiology.com

στο χόμα όσο και στο νερό, στα φυτά και στον ανθρώπινο ιστό. Πολλά διαφορετικά στελέχη του συγκεκριμένου μικροοργανισμού είναι ευκαιριακά παθογόνα και επηρεάζουν την υγεία του ανθρώπου, των ζώων και των φυτών. Η *Pseudomonas aeruginosa* χαρακτηρίζεται ως η επιτομή των ευκαιριακά παθογόνων, σχεδόν ποτέ δεν μολύνει μη εκτεθειμένο ιστό, όμως μπορεί να μολύνει οποιονδήποτε τύπο ιστού αν αυτός έχει μειωμένες άμυνες (www.microbewiki.com). Αναπτύσσεται σε

θερμοκρασίες από -7-43°C με βέλτιστη θερμοκρασία από 20-30°C, σε τιμές pH από 5.6-8 και σε τιμές $a_w > 0.94$. Η ανάπτυξη της σε τόσο χαμηλές θερμοκρασίες οφείλεται στο ότι ανήκει στην οικογένεια των ψυχρότροφων βακτηρίων.

3.1.6.1 Παθογένεια

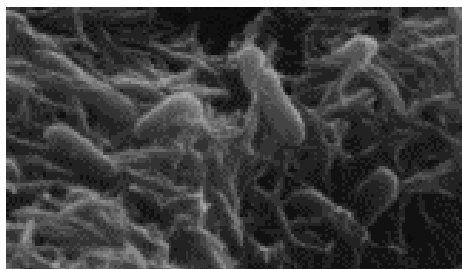
Ως αποτέλεσμα των μεταβολικών διαφοροποιήσεων και την ικανότητα να αναπτύσσεται σε χαμηλές θερμοκρασίες η *Pseudomonas* είναι πολλές φορές υπεύθυνη για την αλλοίωση τροφίμων. Αξιοσημείωτες είναι οι αλλοιώσεις που προκαλούνται σε γαλακτοκομικά προϊόντα, στο κρέας και στα ψάρια. Συγκεκριμένα η *P. aeruginosa* είναι πολύ συχνή σε ασθενείς με εξασθενημένο ανοσοποιητικό σύστημα και είναι το πιο συχνό παθογόνο που απομονώνεται από ασθενείς που νοσηλεύονται για πάνω από μία εβδομάδα. Είναι πολύ συνηθισμένο για αυτό το βακτήριο να προκαλέσει νοσοκομειακές λοιμώξεις όπως πνευμονία, λοίμωξη του ουροποιητικού, αναπνευστικές λοιμώξεις κ.ά. Η μόλυνση από *P. aeruginosa* είναι ένα σοβαρό πρόβλημα σε ασθενής που νοσηλεύονται με καρκίνο, κυστική ίνωση και εγκαύματα. Το ποσοστό θνησιμότητας σε τέτοιους ασθενείς πλησιάζει το 50%.

3.1.6.2 Προστασία

Λόγω της μεγάλης ανθεκτικότητας της *Pseudomonas* σε εξαιρετικά χαμηλές θερμοκρασίες γίνεται κατανοητό ότι μπορεί να πραγματοποιηθεί ανάπτυξη του μικροοργανισμού και μετάδοση του μέσα στους χώρους ψύξης των τροφίμων. Κρίνεται αναγκαίο από τις βιομηχανίες τροφίμων ο συνεχής έλεγχος των τροφίμων και η απόσυρση τους σε περίπτωση εύρεσης μόλυνσης από το βακτήριο. Η παρουσία του βακτηρίου μπορεί να σηματοδοτεί και τη χαμηλή ποιότητα διεργασιών απολύμανσης στην βιομηχανία επεξεργασίας.

3.1.7 *Shewanella* sp.

Η *Shewanella* είναι ένας Gram αρνητικός, κινητικός βάκιλος (βλ. Εικόνα 3.1.7), ο οποίος δεν πραγματοποιεί διεργασία ζύμωσης αν και έχει παρατηρηθεί σε κάποια στελέχη



Εικόνα 3.1.7 *Shewanella* sp. Πηγή:
www.wikipedia.com

η ικανότητα ζύμωσης γλυκόζης. Τα στελέχη της *Shewanella* παράγουν H_2S από οργανικές αλλά και από ανόργανες πηγές. Ο μικροοργανισμός είναι ικανός να αναπτύσσεται και σε αναερόβιες συνθήκες χρησιμοποιώντας διάφορους δέκτες ηλεκτρονίων και τα περισσότερα στελέχη ελαττώνουν το οξειδίο τριμεθυλαμίνης-N (TMAO). Η *Shewanella* ανήκει στην χλωρίδα της επιφάνειας των ψαριών και για αυτό εξετάζεται κυρίως στα ιχθυρά. Τα στελέχη της *Shewanella* μπορούν να απομονωθούν από ένα μεγάλο εύρος ενδιαιτημάτων. Τα στελέχη μπορεί να είναι μεσόφιλα ή ψυχρόφιλα. Το στέλεχος *Shewanella putrefaciens* κατέχει σημαντικό ρόλο στην αλλοίωση των ιχθυρών και άλλων προϊόντων τροφίμων. Η ψυχρότροφη φύση της *S. putrefaciens* και η ικανότητα να μειώνει το TMAO σε τριμεθυλαμίνη (TMA) εξηγεί την σημαντικότητα της στην αλλοίωση των ιχθυρών σε χαμηλές θερμοκρασίες συντήρησης, όπου η δυσάρεστη οσμή από την αλλοίωση των ψαρικών οφείλεται στην παραγωγή TMA. Το βακτήριο επίσης ανοικοδομεί θειούχα αμινοξέα και παράγει πτητικά σουλφίδια συμπεριλαμβανομένου και του H_2S . Το γένος *S. putrefaciens* έχει συσχετιστεί επίσης και με την αλλοίωση σε κατεψυγμένες γαρίδες, υψηλής οξύτητας βοδινό, σε κοτόπουλα και απομονώθηκαν επίσης σε μεγάλο αριθμό από μοσχαρίσιο κιμά. Βακτήρια που παράγουν H_2S αποτελούν μόνο ένα μικρό κλάσμα της αρχικής μικροχλωρίδας σε νέα αλιευμένα ψάρια, αλλά τα Gram αρνητικά ψυχρότροφα είδη αποκτούν κυρίαρχη θέση κατά την διάρκεια αποθήκευσης σε θερμοκρασίες ψύξης. Ο χρόνος που μπορούν να παραμείνουν τα κατεψυγμένα προϊόντα ψαριών στα ράφια των καταστημάτων μπορεί να καθοριστεί από την ποσότητα των βακτηρίων που είναι ικανά να παράγουν TMAO και H_2S (www.ncbi.nlm.nih.gov, Fonnesbech Vogel et al 2005).

3.1.7.1 Παθογένεια

Η *Shewanella* είναι ασυνήθιστη αιτία ασθένειας στον άνθρωπο, ωστόσο τα τελευταία χρόνια έχουν αυξηθεί τα κρούσματα μόλυνσης από *Shewanella*. Η *Shewanella* είναι ένας οργανισμός που βρίσκεται σχεδόν παντού και έχει απομονωθεί από τρόφιμα, λύματα και από γλυκά αλλά και αλμυρά νερά. Υπάρχουν διάφορες καταγραφές ότι αυτός ο μικροοργανισμός προκαλεί λοιμώξεις στον άνθρωπο όπως αποστήματα, βακτηριαμία, μόλυνση πληγών, λοιμώξεις του δέρματος και των μαλακών ιστών, ρευματικές και καρδιακές παθήσεις κ.ά. Σημαντική είναι η αναφορά ότι οι ασθενείς που εξετάστηκαν σε έρευνα που έγινε είχαν προδιαθεσικούς παράγοντες όπως κακοήθεια, ηπατοχολική νόσο, ουδετεροπενία ή προωρότητα (www.ncbi.nlm.nih.gov, Sharma et al 2010).

3.1.7.2 Προστασία

Όπως οι περισσότεροι μικροοργανισμοί που βρίσκονται στα τρόφιμα άλλες φορές σε μικρές και άλλες φορές σε μεγάλες συγκεντρώσεις, μπορούν να προκαλέσουν λοιμώξεις στον ανθρώπινο οργανισμό με δυσάρεστες επιπτώσεις στην υγεία. Μέσα στα χρόνια η προστασία από αυτούς τους μικροοργανισμούς έχει γίνει αναγκαία και για αυτό το λόγο έχει αναπτυχθεί μία πληθώρα τεχνικών για την καταστολή ή καταστροφή τους. Για την προστασία από την *Shewanella* πρέπει να τηρούνται οι σωστές τεχνικές επεξεργασίας χωρίς αυτό να σημαίνει την καταστροφή του μικροοργανισμού. Το συγκεκριμένο βακτήριο είναι ιδιαίτερα ανθεκτικό σε χαμηλές θερμοκρασίες οπότε γίνεται αντιληπτό ότι μπορεί να αναπτυχθεί σε θερμοκρασίες συντήρησης σε χώρους ψύξης-κατάψυξης. Ο μικροοργανισμός μπορεί να αδρανοποιηθεί για κάποιο διάστημα, για αυτό το λόγο η κατανάλωση κυρίων αλιευμάτων θα πρέπει να γίνεται στον χρόνο που ορίζεται από τον παράγωγο και όχι μετέπειτα. Στην καθημερινότητα οι πολίτες μπορούν να προφυλαχθούν ακολουθώντας τους σωστούς κανόνες υγιεινής και με πολύ καλή πλύση και καθαρισμό των ψαριών που προορίζονται για κατανάλωση, καθώς η *Shewanella* βρίσκεται κυρίως στην επιφάνεια των ψαριών.

Κεφάλαιο 4: Σκοπός

Σκοπός της παρούσης διπλωματικής εργασίας είναι ο έλεγχος της μικροβιολογικής ποιότητας επιλεγμένων τροφίμων σύμφωνα με την ισχύουσα νομοθεσία καθώς και η ανάλυση ενός συστήματος ελέγχου ποιότητας HACCP. Συγκεκριμένα τα τρόφιμα που ελέγχθηκαν είναι κοτόπουλο, αυγά, έτοιμες σαλάτες, μυζήθρα και ψάρια. Ο κύριος σκοπός του ελέγχου αυτού είναι η εύρεση συγκεκριμένων μικροοργανισμών-δεικτών σε κάθε κατηγορία τροφίμου και ο έλεγχος καταλληλότητας των τροφίμων για την προστασία της δημόσιας υγείας.

Ο έλεγχος πραγματοποιήθηκε με καλλιεργητικές μεθόδους και τη χρήση εκλεκτικών θρεπτικών υλικών. Παράλληλα, έγινε προσπάθεια ανίχνευσης συγκεκριμένων βακτηριακών δεικτών με εφαρμογή της μεθόδου Polymerase Chain Reaction (PCR).

Οι δείκτες που ελέγχθηκαν για κάθε τρόφιμο είναι:

Πίνακας 4: Μικροβιακοί δείκτες τροφίμων

Δείκτες	Κατηγορίες τροφίμων				
	Κοτόπουλο	Αυγά	Σαλάτες	Μυζήθρα	Ψάρια
Ολική μικροβιακή χλωρίδα (OMX)	√	√	√		√
<i>E. coli</i>	√	√	√	√	√
<i>Enterococcus sp.</i>	√	√	√		
<i>Staphylococcus sp.</i>	√	√	√	√	√
<i>Salmonella sp.</i>	√	√		√	
<i>Listeria sp.</i>				√	
<i>Pseudomonas sp.</i>					√
<i>Shewanella sp.</i>					√

Επιγραμματικά οι στόχοι της διπλωματικής εργασίας είναι:

- 1) Η ανίχνευση και απομόνωση των παραπάνω δεικτών από το εκάστοτε τρόφιμο αν υπάρχουν με καλλιεργητικές μεθόδους
- 2) Η ταυτοποίηση των μικροοργανισμών που βρέθηκαν από τις καλλιέργειες
- 3) Η καταλληλότητα των θρεπτικών υλικών ως προς την ακρίβεια των αποτελεσμάτων
- 4) Η ταυτοποίηση των μικροοργανισμών και με την μοριακή μέθοδο PCR για σύγκριση των αποτελεσμάτων
- 5) Η ανάλυση ενός προγράμματος ελέγχου ποιότητας HACCP για την πιθανή ανίχνευση σημείων μόλυνσης κατά την παραγωγική διαδικασία και η προσπάθεια εύρεσης λύσης

Κεφάλαιο 5: Πειραματικό μέρος

5.1 Υλικά

Εργαστηριακά υλικά

- Αποστειρωμένα τριβλία petri διαμέτρου 9cm
- Ταινίες οξειδάσης Bactident Oxidase (Merck)
- Διάλυμα Φαινόλη/Χλωροφόρμιο/Ισοαμυλική αλκοόλη (25:24:1) (Sigma-Aldrich)
- Λυσοζύμη-Lysozyme molecular biology grade (Applichem)
- Δοχεία ζέσεως
- Κρίκοι εμβολιασμού
- Falcon
- API tests (Biomerieux)
- Stomacher bags (Interscience)

Συσκευές και όργανα

- Θάλαμος επώασης (Thermo Scientific Heraeus)
- Κλίβανος υγρής αποστείρωσης (TRADE Raypa)
- Ζυγός ακριβείας (Adventurer OHAUS Balance)
- Φυγόκεντρος Centrifuge 5418R (Eppendorf)
- Μετρητής αποικιών (Stuart)
- Λύχνος Bunsen
- Ζυγός (Kern)
- Thermal cycler (Peqlab)
- Stomacher (interscience)
- Block heater
- Vortex
- StepOne Plus system (Applied Biosystems Inc.)

Θρεπτικά υλικά και συμπληρώματα

- Plate count agar (Lab M)
- HiCrome (Lab M)
- Slanetz & Bartley Medium (HiMedia Laboratories)
- Mannitol Salt Agar (Lab M)
- Baird-Parker agar (Lab M)
- XLD agar (HiMedia Laboratories)
- Listeria Selective Agar Base (Lab M)
- Listeria Selective Supplement (Lab M)

- Selenite broth (HiMedia Laboratories)
- Rappaport-Vassiliadis Soya Peptone(RVS) Broth (HiMedia Laboratories)
- Triple Sugar Iron agar (Lab M)
- Pseudomonas agar base (Lab M)
- Nutrient agar (Lab M)
- Nutrient Broth (Lab M)
- Egg Yolk (Lab M)
- Peptone (HiMedia Laboratories)
- Half-Fraser Broth (Lab M)
- Fraser Broth Enrichment Supplement (Lab M)

Διαλύματα απομόνωσης γενετικού υλικού

- Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-EDTA (TE), συγκέντρωσης 50mM Tris, 50mM EDTA, pH 8.0 αποστειρωμένο στους 121°C για 15 min.
- Ρυθμιστικό διάλυμα Lysozyme lysis buffer συγκέντρωσης 100mM NaCl, 500mM Tris με pH 8.0, lysozyme 30 mg/mL
- CTAB-NaCl συγκέντρωσης 4.1g NaCl, 10g CTAB, 100mL dd H₂O αποστειρωμένο στους 121°C για 15 min.
- Διάλυμα SDS 10% w/v
- Διάλυμα πρωτεΐνάσης K 20mg/mL
- Ισοπροπανόλη

Υλικά για την μέθοδο της PCR

- Primer Efs130F(forward) 0,5μM
- Primer Efs490R(reverse) 0,5μM
- Primer gadrt-1 0,5μM
- Primer gadrt-2 0,5μM
- Buffer 1X
- MgCl₂ 1,5mM
- dNTPs 0,25mM
- Taq 1M
- Master Mix 2X

Πίνακας 5.1(a): Περιεχόμενα αντίδρασης PCR (όγκος 40μL)

PCR mixture	Συγκεντρώσεις
Buffer	1X
MgCl ₂	2,5mM
dNTPs	0,25mM
Primer	0,5μM
Taq	2U
DNA	2μL

Πίνακας 5.1(b): Κύκλοι αντίδρασης PCR

95°C	1 min.	40 cycles
95°C	1 min.	
57°C	1 min.	
72°C	45 sec.	
72°C	10 min.	

Πίνακας 5.1(c): Περιεχόμενα αντίδρασης real-time PCR (όγκος 20μL)

Real-time PCR mixture	Ποσότητες(μL)
Master Mix(2.0X)	10
Forward Primer	1
Reverse primer	1
DNA	2
H ₂ O	6

Πίνακας 5.1(d): Κύκλοι αντίδρασης real-time PCR

95°C	10 min.	40 cycles
95°C	30 sec.	
57°C	1 min.	
72°C	30 sec.	
95°C	15 sec.	
59°C	1 min.	
95°C	15 sec.	

5.2 Δειγματοληψία

Για τον έλεγχο των κατηγοριών τροφίμων που αναφέρθηκαν παραπάνω, πραγματοποιήθηκε μία σειρά δειγματοληψιών. Τα τρόφιμα προς εξέταση αγοράστηκαν από αλυσίδες σούπερ μάρκετ, ώστε το προϊόν που αγοράστηκε να έχει υποστεί της απαραίτητες επεξεργασίες που ορίζονται από τον παρόν νόμο και προϋποθέσεις για να βρίσκεται στην αγορά (εξαίρεση αποτελούν τα ψάρια που αγοράστηκαν από ιχθυοπωλείο). Τα δείγματα εξετάζοντουσαν την ίδια μέρα που αγοραζόντουσαν για να μην υπάρχει περιθώριο αλλοίωσης του τροφίμου και επηρεαστούν τα αποτελέσματα. Παρακάτω στους Πίνακες 5.2(a), 5.2(b), 5.2(c), 5.2(d), 5.2(e) αναφέρονται αριθμητικά και όχι με την επωνυμία της εταιρίας παραγωγής τα δείγματα που εξετάστηκαν κατά την εκπόνηση του πειραματικού μέρους.

Πίνακας 5.2(a)

Κοτόπουλο	
Δείγματα	Τύπος δείγματος
Δείγμα 1	Μπούτι κοτόπουλου
Δείγμα 2	Μπούτι κοτόπουλου
Δείγμα 3	Μπούτι κοτόπουλου
Δείγμα 4	Στήθος κοτόπουλου
Δείγμα 5	Μπούτι κοτόπουλου

Πίνακας 5.2(b)

Αυγό	
Δείγματα	Τύπος δείγματος
Δείγμα 1	Αυγό
Δείγμα 2	Αυγό
Δείγμα 3	Αυγό
Δείγμα 4	Αυγό
Δείγμα 5	Αυγό
Δείγμα 6	Αυγό
Δείγμα 7	Αυγό
Δείγμα 8	Αυγό

Πίνακας 5.2(c)

Σαλάτα	
Δείγματα	Τύπος δείγματος
Δείγμα 1	Ανάμεικτη
Δείγμα 2	Ανάμεικτη, χωρίς φυτοφάρμακα
Δείγμα 3	Μαρούλι βιολογικό
Δείγμα 4	Λόλα πράσινη
Δείγμα 5	Ρόκα

Πίνακας 5.2(d)

Μυζήθρα	
Δείγματα	Τύπος δείγματος
Δείγμα 1	Μυζήθρα
Δείγμα 2	Μυζήθρα
Δείγμα 3	Ξινομυζήθρα
Δείγμα 4	Μυζήθρα
Δείγμα 5	Σουρωτή μυζήθρα
Δείγμα 6	Πηχτόγαλο
Δείγμα 7	Πηχτόγαλο

Πίνακας 5.2(e)

Ψάρια	
Δείγματα	Τύπος δείγματος
Δείγμα 1	Γόπα
Δείγμα 2	Μελανούρι
Δείγμα 3	Λυθρίνι
Δείγμα 4	Γόπα
Δείγμα 5	Σαρδέλα

Όλες οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν κάτω από αντισηπτικές συνθήκες για την αποτροπή επιμόλυνσης του δείγματος και σύμφωνα με οδηγίες από πρωτόκολλα.

5.3 Ανίχνευση μικροοργανισμών

Τα δείγματα όπως αναφέρονται παραπάνω ελέγχθηκαν για την παρουσία κάποιων μικροοργανισμών των οποίων η παρουσία ή μεγάλη συγκέντρωση τους στο τρόφιμο, σηματοδοτεί την μη καταλληλότητα του τροφίμου για κατανάλωση. Τα βακτήρια για τα οποία ελέγχθηκαν τα τρόφιμα είναι τα βακτήρια που ανήκουν στο γένος *Staphylococcus* sp., *Enterococcus* sp., *E. coli*, *Salmonella* sp., *Listeria* sp., *Pseudomonas* sp. και *Shewanella* sp. καθώς και η ολική μικροβιακή χλωρίδα(OMX) του τροφίμου.

Δεν εξετάστηκαν όλοι οι παραπάνω δείκτες για όλα τα τρόφιμα. Στον Πίνακα 5.3(a) αναγράφονται οι δείκτες που εξετάστηκαν σε κάθε τρόφιμο.

Βακτηριακοί δείκτες									
Τ Ρ Ο Φ Ι Μ Α		OMX	<i>Staphylococcus</i> sp.	<i>Enterococcus</i> sp.	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i> sp.	<i>Listeria</i> sp.	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Shewanella</i> sp.
	Κοτόπουλο	√	√	√	√	√			
	Αυγό	√	√	√	√	√			
	Σαλάτα	√	√	√	√				
	Μυζήθρα		√		√	√	√		
	Ψάρια		√		√			√	√

Πίνακας 5.3(a) Βακτηριακοί δείκτες που ελέγχθηκαν στα τρόφιμα

Θρεπτικό υλικό	Μικροοργανισμός
Plate Count Agar	OMX
HiCrome	<i>E. coli</i>
Slanetz & Bartley Medium	<i>Enterococcus</i> sp.
Mannitol Salt Agar & Baird-Parker Agar	<i>Staphylococcus</i> sp.
XLD Agar	<i>Salmonella</i> sp.
Listeria Selective Agar	<i>Listeria</i> sp.
Pseudomonas Agar Base	<i>Pseudomonas</i> sp.
Triple Sugar Iron Agar(TSA)	<i>Shewanella</i> sp.

Πίνακας 5.3(b) Θρεπτικά υλικά και μικροοργανισμοί

Αφού έγινε ο καθορισμός των μικροβιακών δεικτών για κάθε τρόφιμο, επιλέχθηκαν τα θρεπτικά υλικά στα οποία έγινε και η καλλιέργεια του εκάστοτε δείγματος. Τα θρεπτικά υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση του κάθε μικροβίου φαίνονται στον Πίνακα 5.3(b). Η καλλιέργεια του δείγματος έγινε βάση των οδηγιών που δίνονται από πρωτόκολλα για την καλλιέργεια και ανίχνευση του κάθε βακτηρίου. Τα πρωτόκολλα που ακολουθήθηκαν για την ανίχνευση των βακτηρίων-δεικτών αναλυτικά κατά βήμα είναι:

- **Ανίχνευση Ολικής Μικροβιακής Χλωρίδας**
 - Τοποθέτηση 10g δείγματος τροφίμου σε 100mL Peptone water
 - Ομογενοποίηση του δείγματος σε Stomacher
 - Εμβολιασμός 2mL ομογενοποιημένου σε Plate Count Agar
 - Επώαση στους 30°C για 48h
 - Μέτρηση του συνολικού αριθμού των αποικιών

- **Ανίχνευση *E. coli***
 - Τοποθέτηση 10g δείγματος τροφίμου σε 100mL Peptone water
 - Ομογενοποίηση του δείγματος σε Stomacher
 - Εμβολιασμός 300μL ομογενοποιημένου σε HiCrome
 - Επώαση στους 37°C για 24h
 - Μέτρηση του συνολικού αριθμού αποικιών

- **Ανίχνευση *Enterococcus* sp.**
 - Τοποθέτηση 10g δείγματος τροφίμου σε 100mL Peptone water
 - Ομογενοποίηση του δείγματος σε Stomacher
 - Εμβολιασμός 300μL ομογενοποιημένου σε Slanetz & Barkley Medium
 - Επώαση στους 37°C για 24h
 - Μέτρηση του συνολικού αριθμού αποικιών

- **Ανίχνευση *Staphylococcus* sp.**
 - Τοποθέτηση 10g δείγματος τροφίμου σε 100mL Peptone water
 - Ομογενοποίηση του δείγματος σε Stomacher
 - Εμβολιασμός 300μL ομογενοποιημένου σε Mannitol Salt Agar και σε Baird-Parker Agar
 - Επώαση στους 37°C για 24h
 - Μέτρηση του συνολικού αριθμού αποικιών

- **Ανίχνευση *Salmonella* sp.**

- Τοποθέτηση 25g δείγματος τροφίμου σε 225mL Buffered Peptone water
- Ομογενοποίηση του δείγματος σε Stomacher
- Επώαση του ομογενοποιημένου στους 37°C για 24h
- Προσθήκη 1mL ομογενοποιημένου σε 9mL Selenite και 0.1mL ομογενοποιημένου σε 10mL RVS
- Επώαση του Selenite στους 37°C για 48h και του RVS στους 37°C για 24h
- Εμβολιασμός 300μL σε XLD agar
- Επώαση στους 37°C για 24h
- Μέτρηση του συνολικού αριθμού των αποικιών

- **Ανίχνευση *Listeria* sp.**

- Τοποθέτηση 25g δείγματος τροφίμου σε 225mL Half-Fraser Broth
- Ομογενοποίηση του δείγματος σε Stomacher
- Επώαση του ομογενοποιημένου στους 30°C για 7 ημέρες
- Εμβολιασμός και ανακαλλιέργεια του ομογενοποιημένου σε Listeria Selective Agar μετά από 1, 2 και 7 ημέρες
- Επώαση στους 30°C για 24h (η επώαση μπορεί να συνεχιστεί για επιπλέον 24h για ανίχνευση των αργά αναπτυσσόμενων στελεχών)
- Μέτρηση του συνολικού αριθμού αποικιών

- **Ανίχνευση *Pseudomonas* sp.**

- Τοποθέτηση 25g δείγματος τροφίμου σε 225mL Peptone water
- Ομογενοποίηση του δείγματος σε Stomacher
- Εμβολιασμός 300μL ομογενοποιημένου σε Pseudomonas Agar Base
- Επώαση στους 37°C για 24h
- Μέτρηση του συνολικού αριθμού αποικιών

- **Ανίχνευση *Shewanella* sp.**

- Τοποθέτηση 25g δείγματος τροφίμου σε 225mL Peptone water
- Ομογενοποίηση του δείγματος σε Stomacher
- Εμβολιασμός 300μL ομογενοποιημένου σε Triple Sugar Agar
- Επώαση στους 37°C για 24h
- Μέτρηση του συνολικού αριθμού αποικιών

Τέλος, έγινε απομόνωση των πλέον ανεπτυγμένων αποικιών και ανακαλλιέργεια τους σε μη εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα Nutrient Agar Base. Οι συνθήκες ανακαλλιέργειας (θερμοκρασία και χρόνος επώασης), ήταν ίδιες με τις συνθήκες των αντίστοιχων καλλιεργειών.

Σημείωση: Σε κάποιες περιπτώσεις καλλιεργειών χρειάστηκε να γίνει αραίωση στο αρχικό ομογενοποίηση με Peptone water λόγω του μεγάλου αριθμού αποικιών, καθώς ήταν μη μετρήσιμο.

5.4 Ταυτοποίηση μικροοργανισμών

Ο χαρακτηρισμός ενός μικροοργανισμού δεν ολοκληρώνεται κατά την ταυτοποίηση του γένους π.χ. *Staphylococcus*, το γένος ενός μικροοργανισμού αποτελείται από πολλά στελέχη αυτού. Για παράδειγμα στο γένος *Staphylococcus* sp. έχουμε τον *Staphylococcus aureus*, *S. haemoliticus*, *S. lentus* κ.ά. Η ταυτοποίηση του γένους των μικροοργανισμών επιτυγχάνεται με την χρήση της μεθόδου της βιοχημικής ταυτοποίησης. Πρόκειται για μία φαινοτυπική μέθοδο, κατά την οποία εκμεταλλευόμαστε συγκεκριμένες ιδιότητες των μικροοργανισμών που σχετίζονται με τον μεταβολισμό τους και με την παραγωγή ενζύμων. Η βιοχημική ταυτοποίηση έγινε βάση του συστήματος API (Analytical Profile Index) και χρησιμοποιήθηκε για την κατάταξη των μικροοργανισμών που ανήκουν στο γένος *Staphylococcus* sp. και για την ταυτοποίηση των μικροοργανισμών από τις αποικίες που αναπτύχθηκαν από το δείγμα Ψάρι 1,2,5 στο θρεπτικό υλικό TSA και από το δείγμα Κοτόπουλο 1 στο θρεπτικό υλικό XLD. Κατά την εφαρμογή της μεθόδου, τα εξεταζόμενα στελέχη υπόκεινται αρχικά σε δοκιμή οξειδάσης. Η οξειδάση είναι ένα ένζυμο που καταλύει την μεταφορά ηλεκτρονίων από χημικές ουσίες στην χρωστική tetramethyl-p-phenylenediamine, η οποία είναι δέκτης ηλεκτρονίων και η αναγωγή της συνοδεύεται με την ανάπτυξη ιώδους χρώματος. Τα θετικά κατά οξειδάση στην δοκιμή βακτήρια διαθέτουν το ένζυμο cytochrome c oxidase και απαιτείται βιοχημική ταυτοποίηση με το σύστημα API 20NE (Εικόνα 5.4(a)). Σε περίπτωση αρνητικής αντίδρασης οξειδάσης, χρησιμοποιείται το σύστημα API 20E (Εικόνα 5.4(b)). Για τον χαρακτηρισμό των σταφυλόκοκκων ως προς το γένος τους χρησιμοποιείται το API Staph (Εικόνα 5.4(c)).



Εικόνα 5.4(a) API 20NE



Εικόνα 5.4(b) API 20E



Εικόνα 5.4(c) API Staph

Παρατηρώντας την Εικόνα 5.4(b) αλλά και 5.4(c) βλέπουμε ότι υπάρχουν διαφορές στα χρώματα των δεικτών από δείγμα σε δείγμα σε κάποιες περιπτώσεις. Το χρώμα που έχει ο δείκτης σε κάθε κυψέλη συγκρίνεται με τις οδηγίες του κατασκευαστή και υποδεικνύει αν ο μικροοργανισμός που εξετάστηκε είναι θετικός ή αρνητικός στον δείκτη αυτόν. Στην περίπτωση που είναι θετικός σημειώνουμε ένα συν (+) στην καρτέλα, ενώ αν είναι αρνητικό ένα πλην (-) (βλ. Εικόνα 5.4(d)).

API® Staph

REF: 07222 B

Origine / Source / Herkunft /
Origen / Origen / Προέλευση /
Ursprung / Oprindelse / Pochodzenie :

BIOMERIEUX

1 (+) 2 (+) 4 (+) 1 (+) 2 (+) 4 (-) 1 (+) 2 (+) 4 (-) 1 (-) 2 (+) 4 (+) 1 (+) 2 (+) 4 (+)

0 GLU FRU MNE MAL LAC TRE MAN XLT MEL NIT PAL VP RAF XYL SAC MDG NAG ADH URE LSTR

Autres tests / Other tests / Andere Tests /
Otras pruebas / Altri test / Outros testes /
Άλλες εξετάσεις / Andra tester /
Andre tests / Inne testy :

Ident. / Ταυτοποίηση :
xylosus 99,9

Εικόνα 5.4(d) Καρτέλα από τεστ API 20E

Αν το χρώμα του δείκτη σηματοδοτεί ότι το βακτήριο είναι θετικό, προσθέτουμε τον αριθμό που υπάρχει από κάτω ενώ αν είναι αρνητικό (-) δεν το υπολογίζουμε. Οι αριθμοί που προκύπτουν εισάγονται στην διαδικτυακή πλατφόρμα (<https://apiweb.biomerieux.com/servlet/Authenticate?action=prepareLogin>) και εμφανίζεται σαν αποτέλεσμα το γένος και το στέλεχος του.

5.5 Απομόνωση γενετικού υλικού

1. Λήψη 1mL ομογενοποιημάτων και εισαγωγή σε Eppendorf χωρητικότητας 1,5mL
2. Φυγοκέντρηση στις 14.000rpm για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
3. Απομάκρυνση της υγρής φάσης και διατήρησης του ιζήματος
4. Προσθήκη 1mL φυσιολογικού ορού (NaCl 0.9%) και επαναδιάλυση του ιζήματος με πιπέττα
5. Εκ νέου φυγοκέντρηση στις 14.000rpm για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
6. Επανάληψη των τριών τελευταίων βημάτων
7. Απομάκρυνση της υγρής φάσης και διάλυση του ιζήματος προσθέτοντας 467μL TE
8. Προσθήκη 30μL SDS συγκέντρωσης 10 w/v
9. Προσθήκη 3μL διαλύματος ενζύμου πρωτεϊνάση-K συγκέντρωσης 20mg/mL και 100μL διαλύματος Lysozyme lysis buffer. Ανάδευση με πιπέττα
10. Επώαση στους 65°C για μία ώρα. Η επώαση γίνεται σε Block Heater
11. Προσθήκη 80μL CTAB που περιέχει 0.7% χλωριούχο νάτριο
12. Επώαση στους 65°C για 10 λεπτά

13. Προσθήκη 750μL διαλύματος Φαινόλη/Χλωροφόρμιο/Ισοαμυλική αλκοόλη (25:24:1)
14. Έντονη ανάδευση με τη χρήση μηχανικού αναδευτήρα Vortex
15. Φυγοκέντρωση στα 14.000rpm για 10 λεπτά
16. Λήψη της υδατικής φάσης και μεταφορά της σε νέο eppendorf
17. Προσθήκη 500μL ισοπροπανόλης και ανάδευση με πιπέττα
18. Παραμονή στους -20°C κατά τη διάρκεια της νύχτας
19. Φυγοκέντρωση στα 14.000rpm και στους 4°C για 20 λεπτά
20. Απόρριψη του υπερκείμενου και λήψη του ιζήματος (DNA)
21. Καθαρισμός του γενετικού υλικού προσθέτοντας 500μL αιθανόλης συγκέντρωσης 70% και αναδεύοντας με πιπέττα
22. Φυγοκέντρωση στα 10.000rpm και στους 4°C
23. Απόρριψη της αιθανόλης, λήψη του ιζήματος και επανάληψη της διαδικασίας καθαρισμού του γενετικού υλικού με προσθήκη αιθανόλης συγκέντρωσης 70% και εκ νέου φυγοκέντρωση στα 10.000rpm και στους 4°C για 10 λεπτά
24. Λήψη του ιζήματος και τοποθέτηση του eppendorf στους 37°C στο Block heater προκειμένου να εξατμιστεί η αιθανόλη
25. Επαναδιάλυση του γενετικού υλικού σε 50μL TE
26. Φύλαξη του απομονωμένου γενετικού υλικού στους -20°C

5.6 Έλεγχος ποσότητας και καθαρότητας γενετικού υλικού

Μετά την ολοκλήρωση της απομόνωσης του DNA είναι απαραίτητος ο προσδιορισμός της ποσότητας και της καθαρότητας των δειγμάτων. Και οι δύο αυτές παράμετροι μπορούν να προσδιοριστούν μέσω της μέτρησης της οπτικής απορρόφησης σε συγκεκριμένο μήκος κύματος. Έτσι, η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της ποσότητας και τον έλεγχο της καθαρότητας του DNA είναι η φωτομέτρηση σε φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης ορατού-υπεριώδους.

Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε φωτομέτρηση του δείγματος DNA σε μήκη κύματος 260 nm και 280 nm. Η οπτική απορρόφηση στα 260 nm επιτρέπει τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του γενετικού υλικού. Οπτική απορρόφηση της τάξης της μίας μονάδας αντιστοιχεί σε 50 μg/mL δίκλωνου DNA, 40 μg/mL μονόκλωνου DNA και RNA και σε περίπου 20 μg/mL μονόκλωνων ολιγονουκλεοτιδίων.

$$1 OD_{260} \text{ unit} = 50 \mu\text{g DNA/ml}$$

Ο προσδιορισμός της καθαρότητας του νουκλεϊκού οξέος μπορεί να προσδιοριστεί μέσω της αναλογίας των οπτικών απορροφήσεων στα δύο μήκη κύματος:

$$\text{Καθαρότητα DNA} = \frac{OD_{260}}{OD_{280}}$$

Η τιμή της αναλογίας για υψηλής καθαρότητας DNA είναι **1.8**. Στην περίπτωση που υπάρχει επιμόλυνση πρωτεϊνών ή φαινόλης η τιμή αυτή είναι σημαντικά μικρότερη με αποτέλεσμα να καθίσταται αδύνατος ο ακριβής προσδιορισμός της ποσότητας του απομονωμένου γενετικού υλικού.

Για τον προσδιορισμό της ποσότητας του DNA χρησιμοποιείται ο ακόλουθος τύπος:

$$C_{DNA} = OD_{260} * 50 \mu g/ml * \text{συντελεστής αραίωσης}$$

5.7 Ανίχνευση μικροοργανισμών με την μέθοδο της PCR

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) είναι μία μέθοδος βιοχημείας και μοριακής βιολογίας για την απομόνωση και πολλαπλασιασμό μίας αλληλουχίας DNA, μέσω της ενζυμικής αναπαραγωγής χωρίς την χρήση ζωντανών μικροοργανισμών. Με την PCR μπορεί να πολλαπλασιαστεί μία περιοχή του γονιδιώματος μέχρι και δισεκατομμύρια φορές, αρκεί να είναι γνωστή η νουκλεοτιδική αλληλουχία. Με τον τρόπο αυτό γνωρίζοντας χαρακτηριστικές νουκλεοτιδικές αλληλουχίες στο γονιδίωμα των μικροοργανισμών μπορεί να γίνει η ανίχνευση τους με την μέθοδο της PCR. Η μέθοδος της PCR βασίζεται σε διαδοχικούς κύκλους αντιγραφής του γνωστού τμήματος του DNA. Κάθε κύκλος αποτελείται από τρία (3) στάδια:

1. Αποδιάταξη του DNA
2. Προσαρμογή των εκκινητών στο DNA εκμαγείο
3. Επιμήκυνση των εκκινητών

Οι primers που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και η αλληλουχία τους αλλά και το μέγεθος προϊόντος (bp) φαίνονται στον πίνακα 5.7.

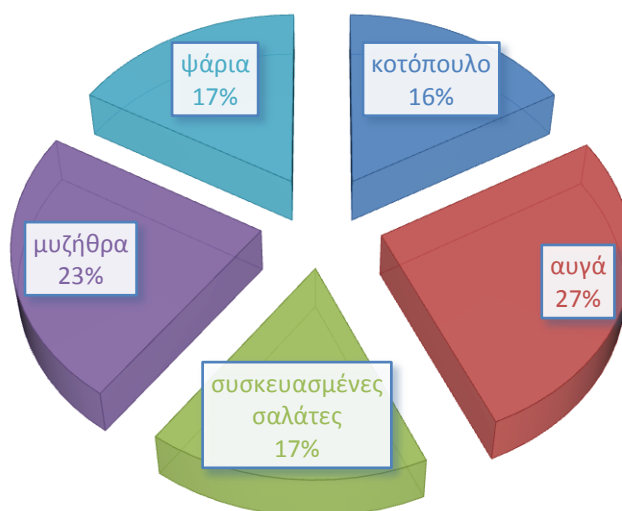
Πίνακας 5.7 Primers που χρησιμοποιήθηκαν για την διεξαγωγή της PCR

Primers	Αλληλουχία primer (5'→3')	Μέγεθος προϊόντος PCR (bp)	Βιβλιογραφική αναφορά
Efs130F	-AACCTACCCATCAGAGGG-	360	Bartosch et al. 2004
Efs490R	-GACG TTCAGTTACTAACG-		
gadrt-1	- GCGTTGCGTAAATATGGTTGCCGA-	305	Chen et al. 2006
gadrt-2	-CGTCACAGGCTTCAATCATGCGTT-		

Κεφάλαιο 6: Αποτελέσματα

Για την εκπόνηση της διπλωματικής εργασίας πραγματοποιήθηκε μία σειρά από δειγματοληψίες σε πέντε (5) κατηγορίες τροφίμων με τις οποίες ο καταναλωτής έχει την μεγαλύτερη επαφή. Στόχος των αναλύσεων των δειγμάτων ήταν η εύρεση του μικροβιακού φορτίου που υπήρχε στο τρόφιμο. Σύμφωνα με τον κανονισμό ΕΚ 2073/2005 της ΕΕ, έχουν θεσμοθετηθεί κάποια μικροβιακά όρια τα οποία πρέπει να πληρούνται από τις βιομηχανίες τροφίμων για να διατεθεί το προϊόν στην λιανική αγορά. Σε περίπτωση μη συμμόρφωσής του προϊόντος με τα επιτρεπτά όρια ο παραγωγός είναι υποχρεωμένος να αποσύρει το συγκεκριμένο προϊόν, για την αποφυγή αρνητικών επιδράσεων στον καταναλωτή. Μη απόσυρση του προϊόντος μπορεί να επιφέρει ποινικές κυρώσεις στην επιχείρηση.

Συνολικά εξετάστηκαν τριάντα (30) δείγματα τροφίμων, εκ των οποίων υπήρξαν 5 δείγματα κοτόπουλου, 8 δείγματα αυγών, 5 δείγματα συσκευασμένης σαλάτας, 7 δείγματα προϊόντων τυρογάλακτος (μυζήθρα, πηχτόγαλα) και 5 δείγματα ψαριού.



Εικόνα 6: Τρόφιμα που χρησιμοποιήθηκαν κατά την διάρκεια της διπλωματικής

6.1 Δείγματα κοτόπουλου

Πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις σε πέντε δείγματα κοτόπουλου που προερχόντουσαν από πέντε διαφορετικές εταιρείες. Η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε κάτω από στείρες συνθήκες για την αποφυγή τυχόν επιμόλυνσης του δείγματος και η προετοιμασία του δείγματος καθώς και η διαδικασία καλλιέργειας γινόταν την ίδια μέρα με την αγορά για την αποφυγή αλλοίωσης του

τροφίμου συνεπώς και τον αποτελεσμάτων. Τα δείγματα παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 6.1(a): Δείγματα κοτόπουλου

Κοτόπουλο	
Δείγματα	Τύπος δείγματος
Δείγμα 1	Μπούτι κοτόπουλου
Δείγμα 2	Μπούτι κοτόπουλου
Δείγμα 3	Μπούτι κοτόπουλου
Δείγμα 4	Στήθος κοτόπουλου
Δείγμα 5	Μπούτι κοτόπουλου

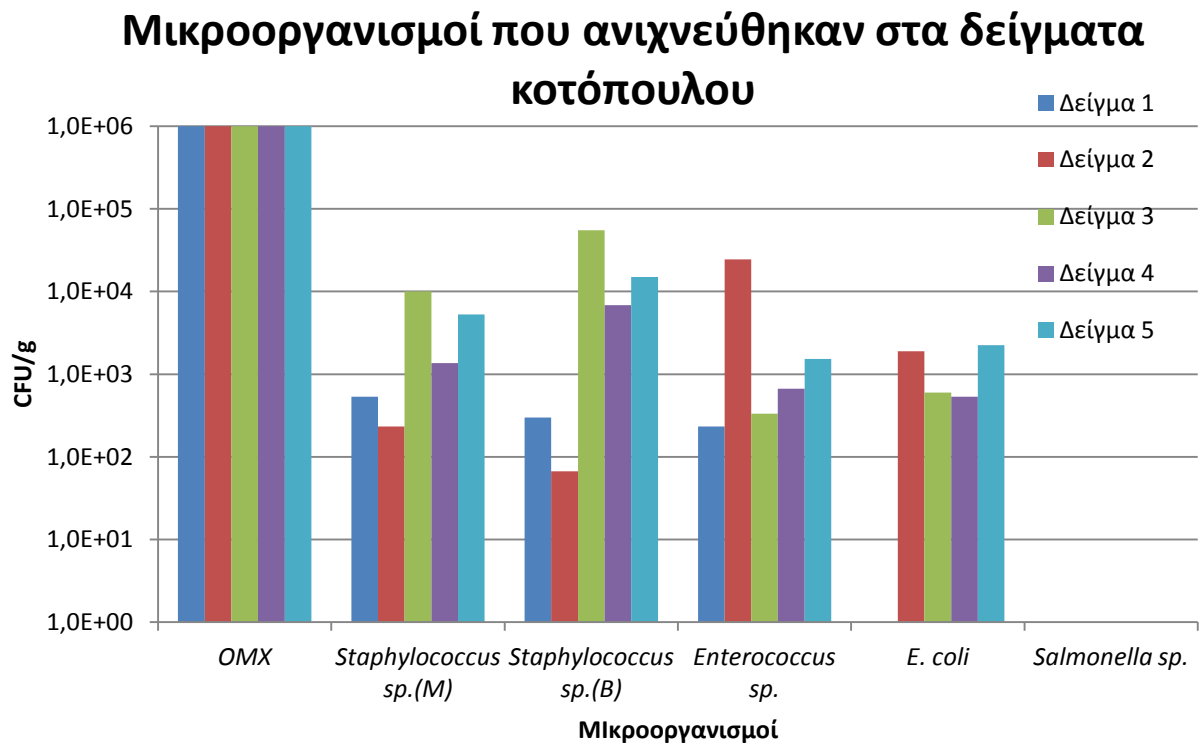
Τα δείγματα εξετάστηκαν για την παρουσία κάποιων μικροβιακών δεικτών πάνω στους οποίους έχουν θεσπιστεί νομοθετικά όρια τα οποία κρίνουν αν το προϊόν είναι κατάλληλο για την διάθεση σε σημεία λιανικής πώλησης. Στον πίνακα 6.1(b) φαίνονται οι μικροβιακοί δείκτες καθώς και τα όρια τους.

Πίνακας 6.1(b): Μικροβιολογικά επιτρεπτά όρια

Μικροβιακοί δείκτες	Νομοθετικά όρια (CFU/g)
OMX	<50.000/g
<i>E.coli</i>	<100/g
<i>Staphylococcus</i>	<5.000/g
<i>Enterococcus</i> sp.	<100/g
<i>Salmonella</i> sp.	Απουσία στα 25g

Για την μέτρηση των παραπάνω μικροβιακών δεικτών χρησιμοποιήθηκαν εκλεκτικά θρεπτικά υλικά για την ανίχνευσή τους και ακολουθήθηκαν συγκεκριμένα πρωτόκολλα καλλιέργειας (βλ. παράγραφο 5.3). Αφού λήφθηκαν τα τριβλία των καλλιιεργειών, μετρήθηκαν οι αποικίες και στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε αναγωγή των αποικιών σε μονάδες CFU/g δείγματος για να δούμε αν πληρούνται οι προδιαγραφές. Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν βλέπουμε ότι κανένα από τα δείγματα δεν ήταν απαλλαγμένο από κάποιον μικροβιακό δείκτη πέρα από την *Salmonella* sp. όπως φαίνεται στο διάγραμμα 6.1 που παρατίθεται. Αντίθετα βλέπουμε έναν σημαντικό αριθμό μικροβίων να είναι παρών στα δείγματα μας. Αυτό βέβαια δεν σημαίνει και ότι τα δείγματα είναι ακατάλληλα για κατανάλωση. Στο διάγραμμα 6.1(a) υπάρχουν δύο στήλες για τον *Staphylococcus* sp., επειδή χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικά θρεπτικά υλικά για την ανίχνευση του. Να σημειωθεί εδώ ότι στο Δείγμα 1 βρέθηκε μία ύποπτη αποικία για *Salmonella* sp. αλλά με την πραγματοποίηση API βρέθηκε ότι τελικά ήταν *Citrobacter*.

Διάγραμμα 6.1(a) Αποτελέσματα δειγματοληψιών



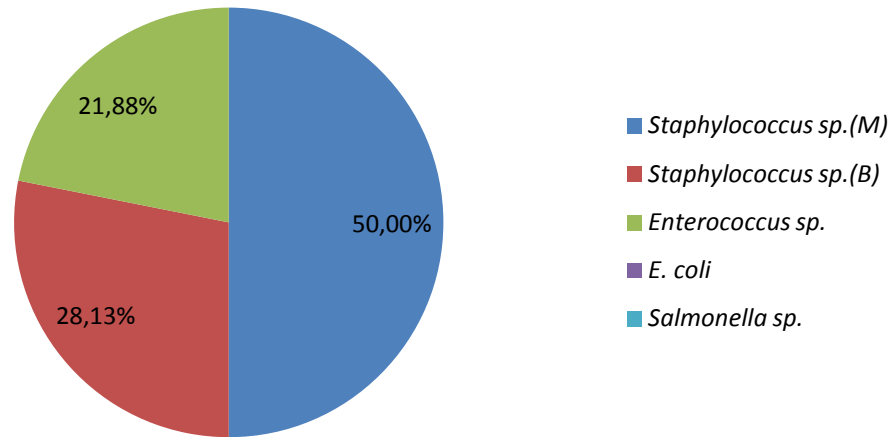
Επιπλέον API πραγματοποιήθηκαν στις αποικίες του *Staphylococcus* sp. για την ταυτοποίηση του γένους για να δούμε την ύπαρξη του *Staphylococcus aureus*. Από τις API που πραγματοποιήθηκαν προέκυψαν οι παρακάτω ταυτοποιήσεις

Πίνακας 6.1(c): Αποτελέσματα API Staph test

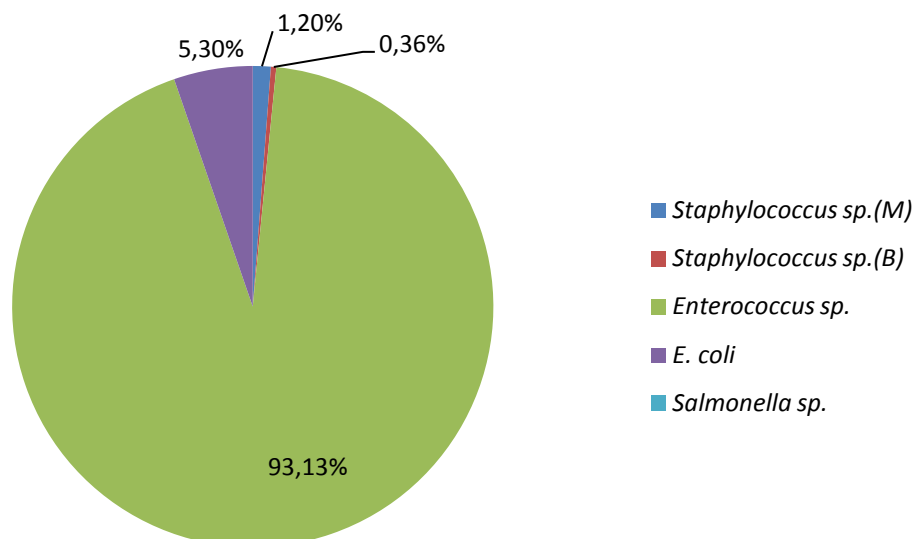
Δείγμα κοτόπουλου	Γένος <i>Staphylococcus</i> sp.
Δείγμα 1	<i>S. xylosus</i>
Δείγμα 2	<i>S. xylosus</i>
Δείγμα 3	<i>S. xylosus</i>
Δείγμα 4	<i>S. aureus</i>
Δείγμα 5	<i>S. xylosus</i>

Το μόνο δείγμα που βρέθηκε θετικό για την παρουσία του *S. aureus* είναι το δείγμα 4. Στην συνέχεια βλέπουμε για κάθε δείγμα που εξετάστηκε το ποσοστό αλληλοκάλυψης των μικροβιακών δεικτών.

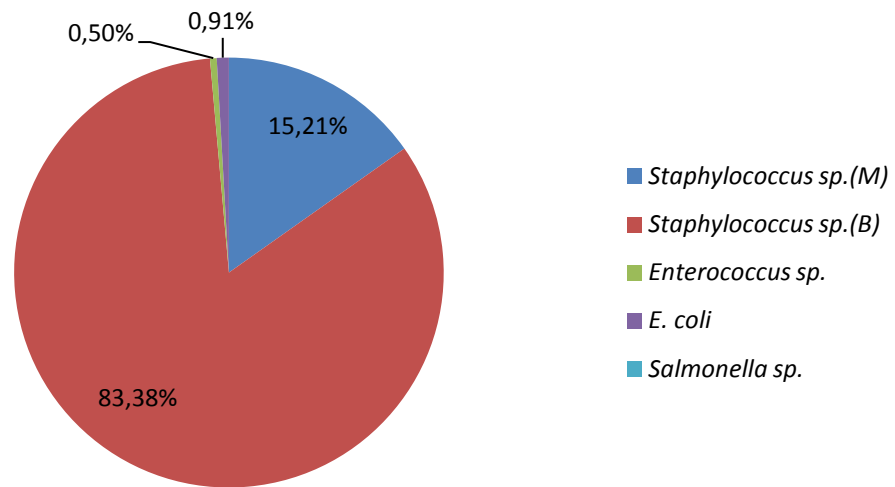
Ποσοστιαία κατανομή μικροοργανισμών Δείγμα 1



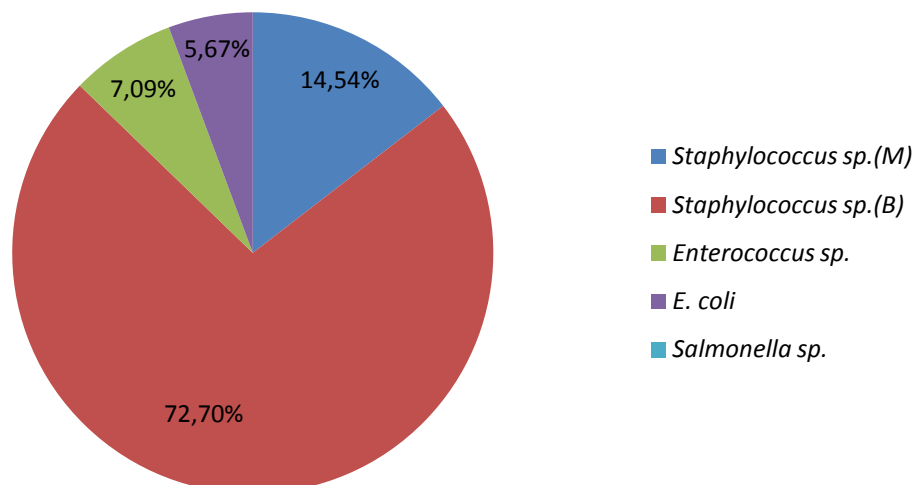
Δείγμα 2



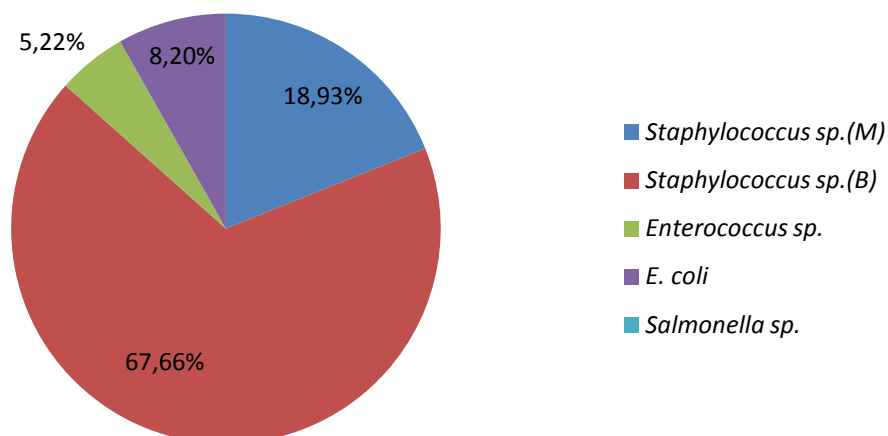
Ποσοστιαία κατανομή μικροοργανισμών στο Δείγμα 3



Δείγμα 4



Ποσοστιαία κατανομή μικροοργανισμών στο Δείγμα 5

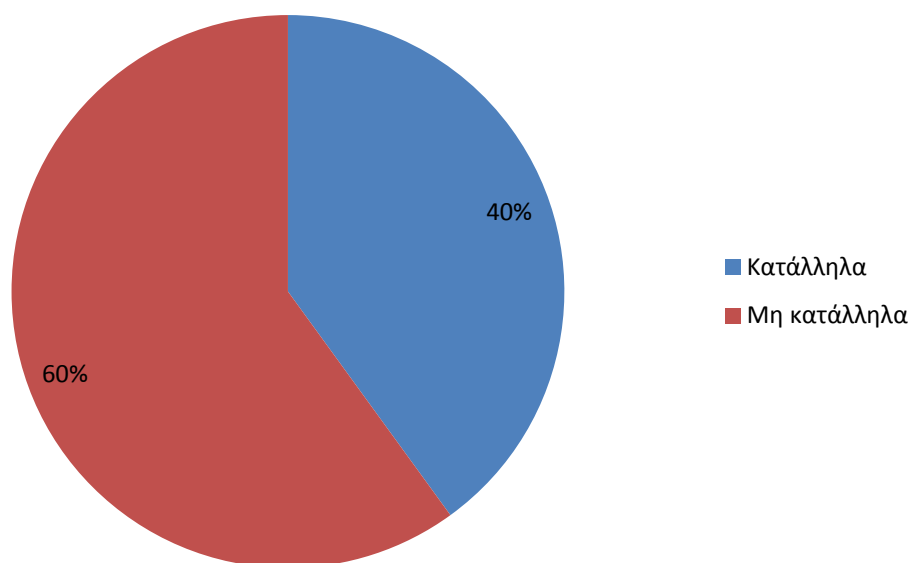


Οι τιμές που έχουνε προκύψει από την μετατροπή των αποικιών σε μονάδες CFU/g συγκρίθηκαν με τα επιτρεπτά νομοθετικά όρια για τον χαρακτηρισμό του τροφίμου ως κατάλληλο ή μη κατάλληλο.

Πίνακας 6.1(d): Σύγκριση αποτελεσμάτων με νομοθετικά όρια

	OMX	<i>Staphylococcus</i> sp.	<i>Staphylococcus</i> sp.	<i>E.coli</i>	<i>Enterococcus</i> sp.	<i>Salmonella</i> sp.
Νομοθετικά όρια	<50.000/g	<1.000/g	<1.000/g	<5.000/g	<100/g	Απουσία στα 25g
Δείγμα 1	T.M.T.C	533,33	300	0	233,33	0
Δείγμα 2	T.M.T.C	233,33	66,66	1.900	24400	0
Δείγμα 3	T.M.T.C	4866,66	51333,33	600	333,33	0
Δείγμα 4	T.M.T.C	1366,66	6833,33	533,33	666,66	0
Δείγμα 5	T.M.T.C	4233,33	15133,33	1833,33	1166,66	0

Παρατηρείται ότι όλα τα δείγματα είναι κατάλληλα ως προς την *Salmonella* sp. και την *E.coli*, ενώ μόνο τα Δείγματα 1 και 2 βρίσκονται εντός ορίων για τον σταφυλόκοκκο και εντερόκοκκο. Στην περίπτωση αυτή τα δείγματα 3, 4 και 5 μπορούν να χαρακτηριστούν ως μη κατάλληλα.



Διάγραμμα 6.1(b) Ποσοστό κατάλληλων και μη δειγμάτων

6.2 Δείγματα αυγών

Πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις σε οχτώ (8) δείγματα αυγών που προερχόντουσαν από οχτώ διαφορετικές εταιρείες. Η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε κάτω από στείρες συνθήκες για την αποφυγή τυχόν επιμόλυνσης του δείγματος και η προετοιμασία του δείγματος καθώς και η διαδικασία καλλιέργειας γινόταν την ίδια μέρα με την αγορά για την αποφυγή αλλοίωσης του τροφίμου συνεπώς και τον αποτελεσμάτων. Για την δειγματοληψία των αυγών ακολουθήθηκε μία διαφορετική μέθοδος σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα. Πραγματοποιήθηκε καλλιέργεια τόσο στο κέλυφος όσο και στον κρόκο με ομογενοποίηση του καθενός αντίστοιχα σε 180mL Peptone water και στην συνέχεια έγινε εμβολιασμός στα θρεπτικά υλικά. Τα δείγματα παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 6.2(a) Δείγματα αυγών

Αυγό	
Δείγματα	Τύπος δείγματος
Δείγμα 1	Αυγό
Δείγμα 2	Αυγό
Δείγμα 3	Αυγό
Δείγμα 4	Αυγό
Δείγμα 5	Αυγό
Δείγμα 6	Αυγό
Δείγμα 7	Αυγό
Δείγμα 8	Αυγό

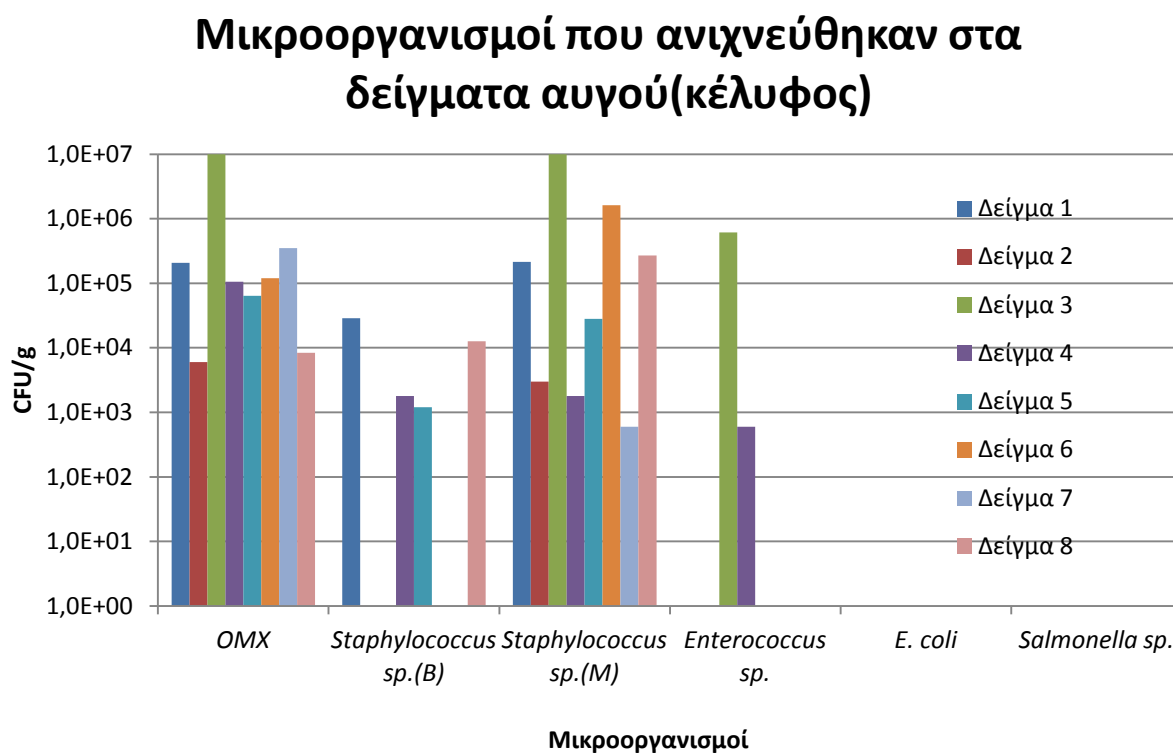
Τα δείγματα εξετάστηκαν για την παρουσία κάποιων μικροβιακών δεικτών πάνω στους οποίους έχουν θεσπιστεί νομοθετικά όρια τα οποία κρίνουν αν το προϊόν είναι κατάλληλο για την διάθεση σε σημεία λιανικής πώλησης. Στον πίνακα 6.2(b) φαίνονται οι μικροβιακοί δείκτες καθώς και τα όρια τους..

Πίνακας 6.2(b): Μικροβιολογικά επιτρεπτά όρια

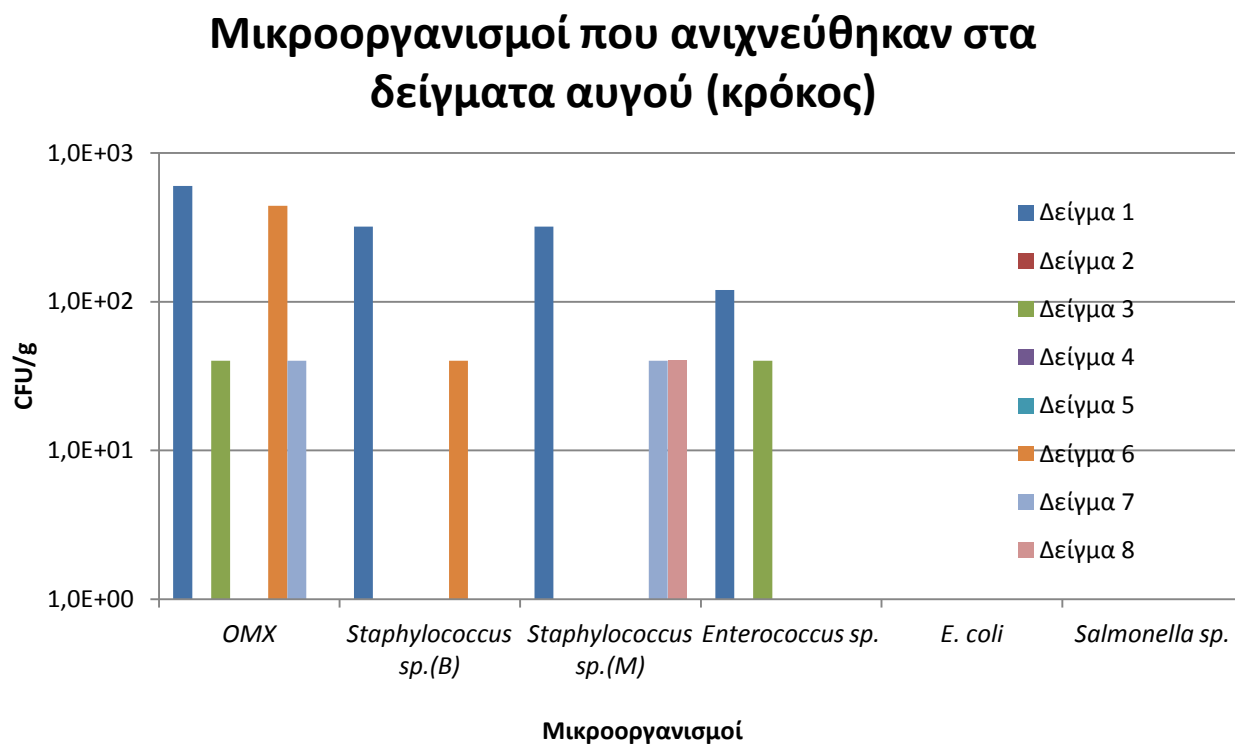
Μικροβιακοί δείκτες	Νομοθετικά όρια (CFU/g)
OMX	<200.000/g
<i>E.coli</i>	<10/g
<i>Staphylococcus</i> sp.	<5/g
<i>Enterococcus</i> sp.	<100/g
<i>Salmonella</i> sp.	Απουσία στα 25g

Για την μέτρηση των παραπάνω μικροβιακών δεικτών χρησιμοποιήθηκαν εκλεκτικά θρεπτικά υλικά για την ανίχνευσή τους και ακολουθήθηκαν συγκεκριμένα πρωτόκολλα καλλιέργειας (βλ. παράγραφο 5.3). Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν βλέπουμε ότι κανένα από τα δείγματα δεν ήταν απαλλαγμένο από κάποιον μικροβιακό δείκτη πέρα από την *Salmonella* sp. και την *E.coli* για τα δείγματα κελύφους, όπως φαίνεται στο διάγραμμα 6.2(a) που παρατίθεται. Ενώ τα δείγματα των κρόκων ήταν σχεδόν απαλλαγμένα από τους περισσότερους μικροβιακούς δείκτες όπως φαίνεται στο διάγραμμα 6.2(b), κάτι το οποίο είναι λογικό αφού δεν έρχεται σε άμεση επαφή με το περιβάλλον. Αυτό βέβαια δεν σημαίνει ότι τα δείγματα είναι ακατάλληλα για κατανάλωση. Στο διάγραμμα 6.2(a),(b) υπάρχουν δύο στήλες για τον *Staphylococcus* sp., επειδή χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικά θρεπτικά υλικά για την ανίχνευση του.

Διάγραμμα 6.2(a) Αποτελέσματα δειγματοληψιών κελύφους



Διάγραμμα 6.2(b) Αποτελέσματα δειγματοληψιών κρόκου

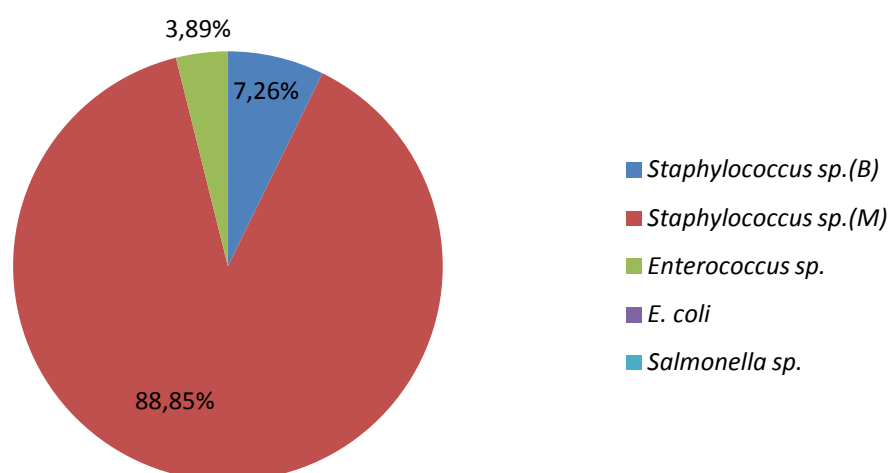


Επιπλέον πραγματοποιήθηκαν σε τρία δείγματα αποικιών σταφυλόκοκκου API test για την ταυτοποίησή τους για να δούμε αν είναι *S. aureus*.

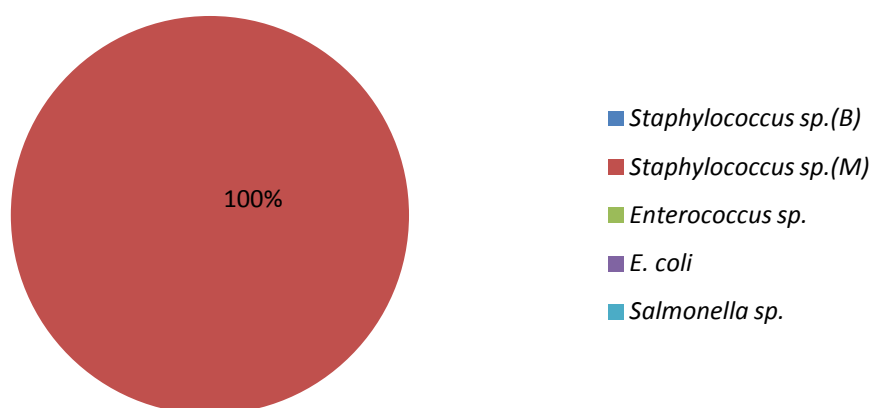
Πίνακας 6.2(c): Αποτελέσματα API Staph test

Δείγμα αυγών	Γένος <i>Staphylococcus</i> sp.
Δείγμα 1 κέλυφος	<i>S. lentus</i>
Δείγμα 1 κρόκος	<i>S. lentus</i>
Δείγμα 2 κέλυφος	<i>S. xylosus</i>

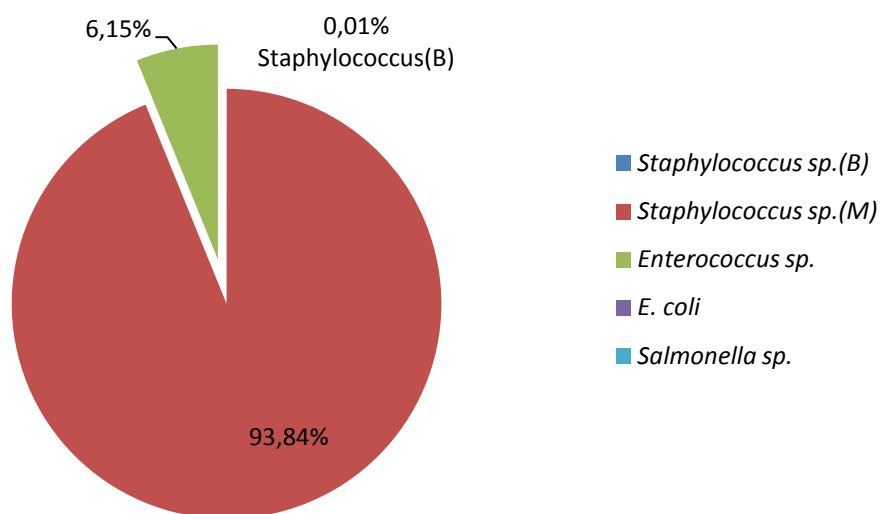
Ποσοστιαία κατανομή των μικροοργανισμών Δείγμα 1 κέλυφος



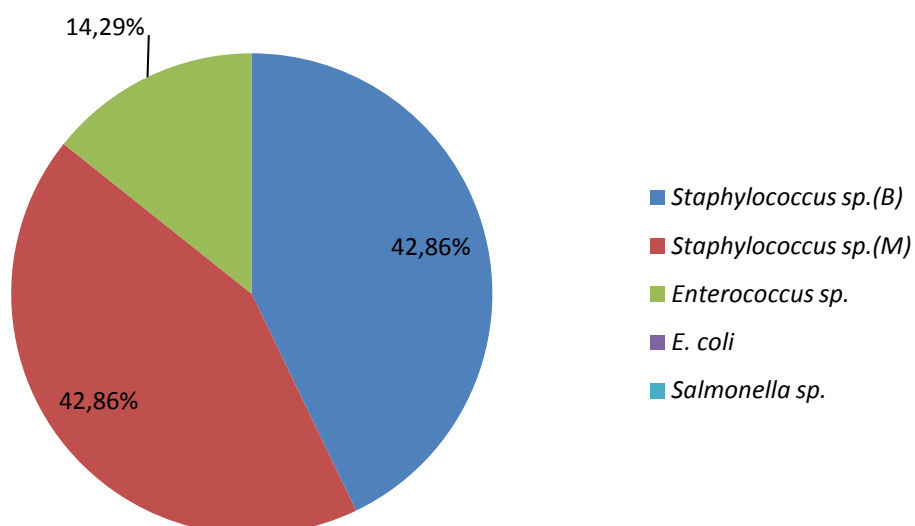
Δείγμα 2 κέλυφος



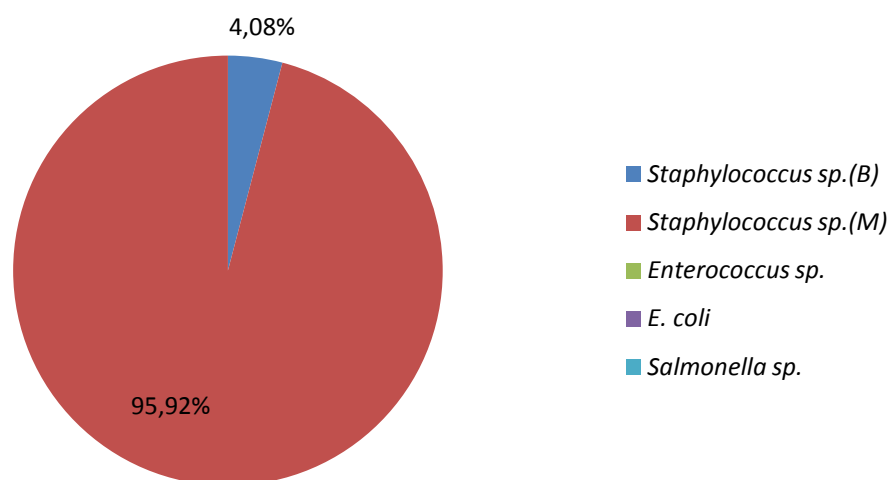
Ποσοστιαία κατανομή των μικροοργανισμών Δείγμα 3 κέλυφος



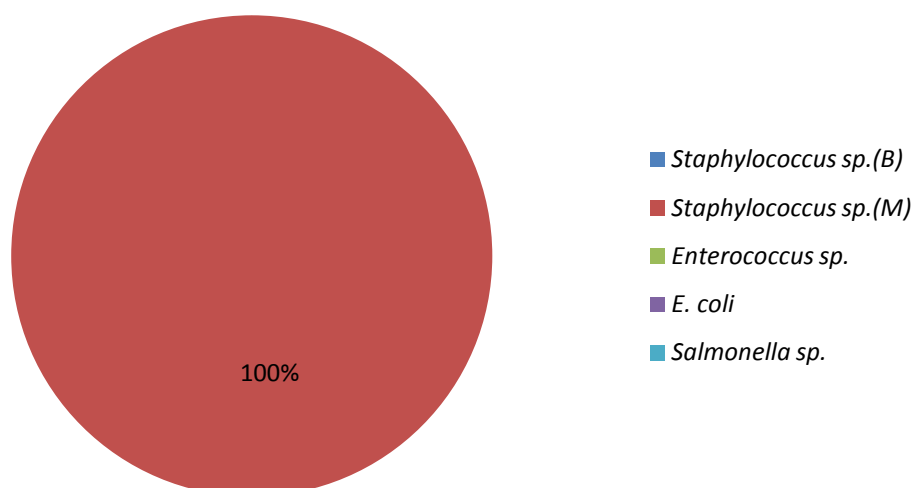
Δείγμα 4 κέλυφος



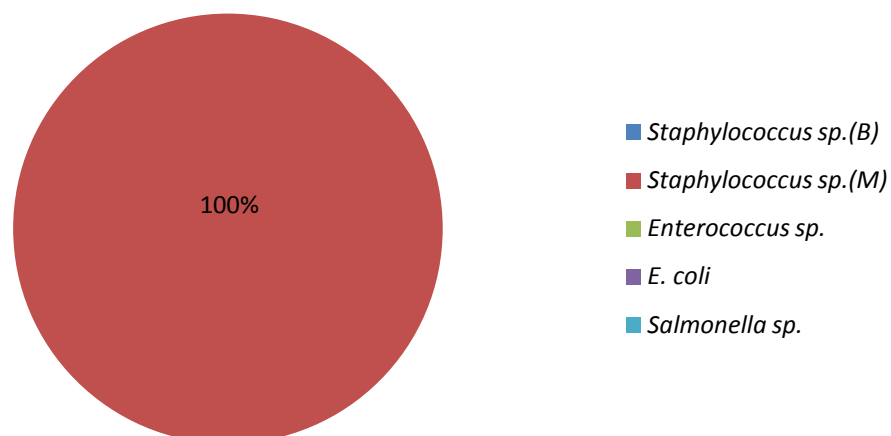
Ποσοστιαία κατανομή των μικροοργανισμών Δείγμα 5 κέλυφος



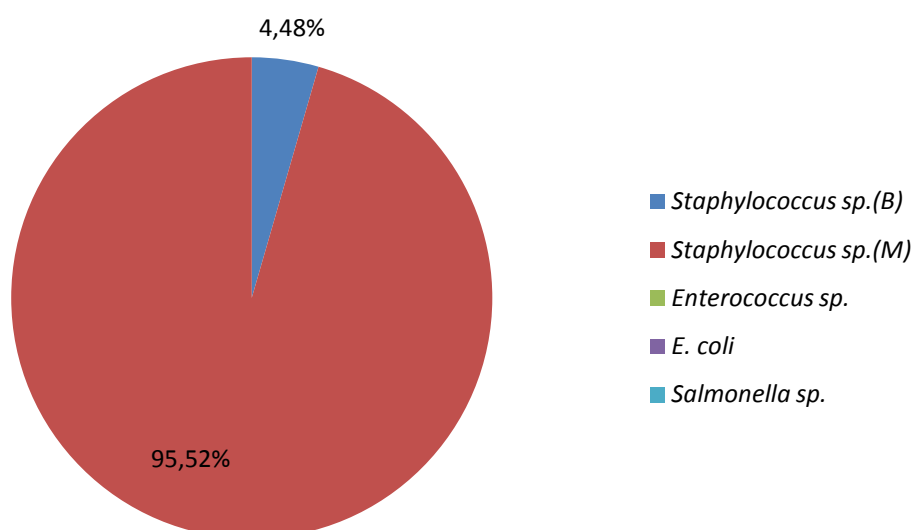
Δείγμα 6 κέλυφος



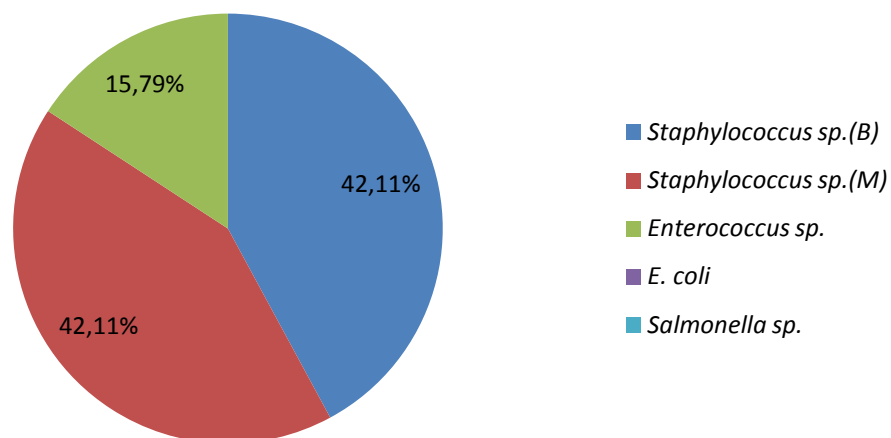
Ποσοστιαία κατανομή των μικροοργανισμών Δείγμα 7 κέλυφος



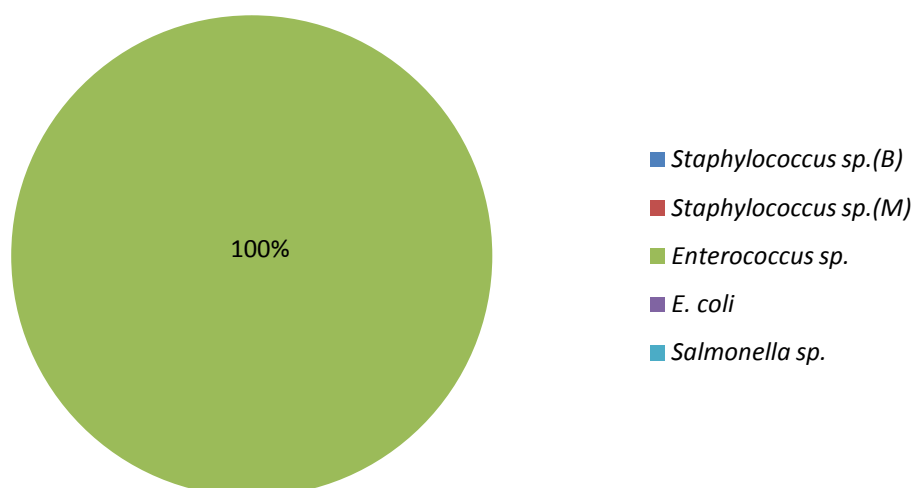
Δείγμα 8 κέλυφος



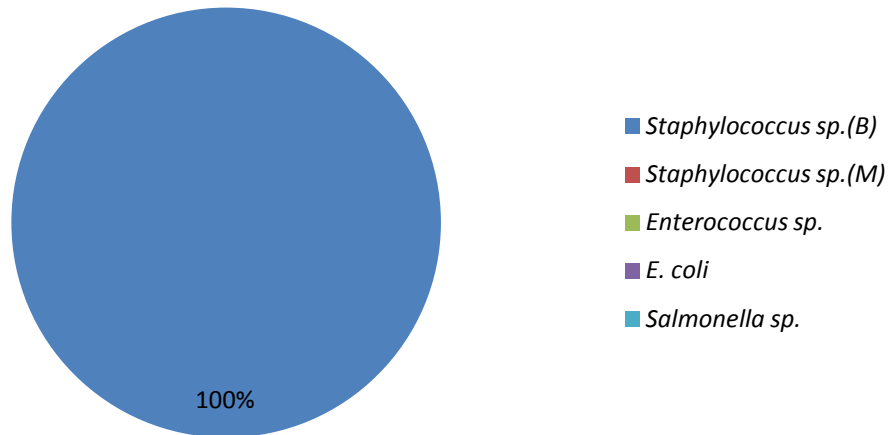
Ποσοστιαία κατανομή των μικροοργανισμών Δείγμα 1 κρόκος



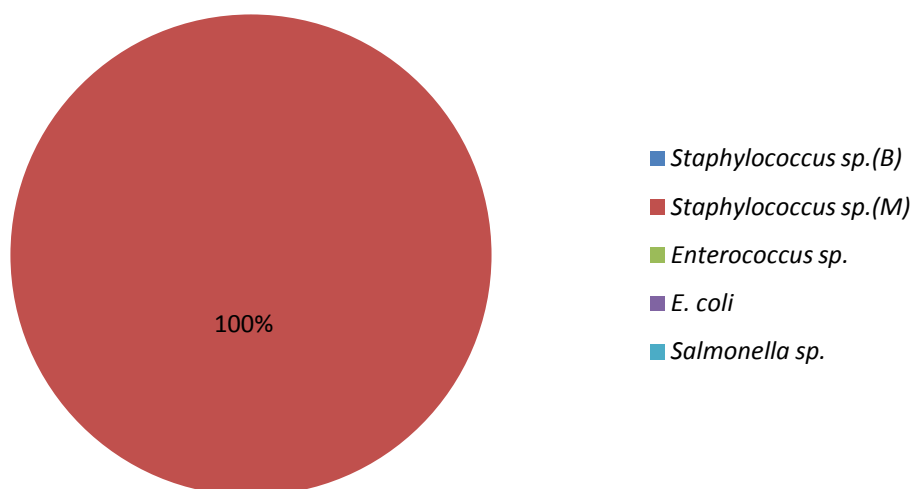
Δείγμα 3 κρόκος



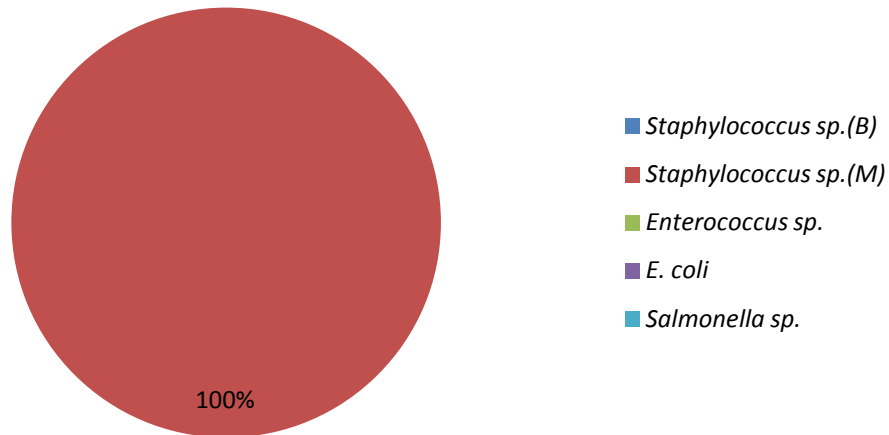
Ποσοστιαία κατανομή των μικροοργανισμών Δείγμα 6 κρόκος



Δείγμα 7 κρόκος



Ποσοστιαία κατανομή των μικροοργανισμών Δείγμα 8 κρόκος



Οι τιμές που έχουσε προκύψει από την μετατροπή των αποικιών σε μονάδες CFU/g συγκρίθηκαν με τα επιτρεπτά νομοθετικά όρια για τον χαρακτηρισμό του τροφίμου ως κατάλληλο ή μη κατάλληλο.

Πίνακας 6.2(d) Σύγκριση τιμών που βρέθηκαν στο κέλυφος των αυγών με τα νομοθετικά όρια

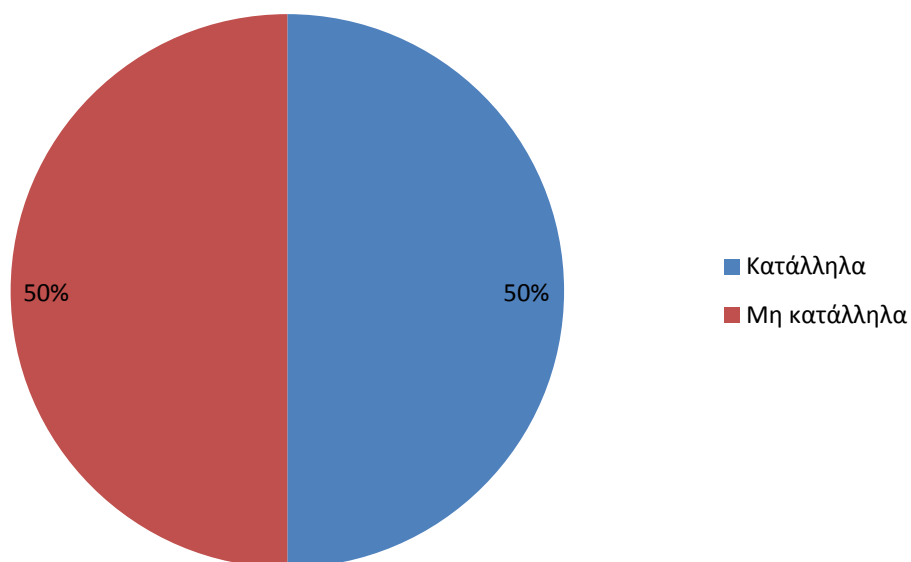
	OMX	<i>Staphylococcus</i> sp.	<i>Staphylococcus</i> sp.	<i>E.coli</i>	<i>Enterococcus</i> sp.	<i>Salmonella</i> sp.
Νομοθετικά όρια	<200.000/g	<5/g	<5/g	<10/g	<100/g	Απουσία στα 25g
Δείγμα 1	208200	28800	301200	0	13200	0
Δείγμα 2	7800	0	5400	0	0	0
Δείγμα 3	T.M.T.C	1200	T.M.T.C	0	655200	0
Δείγμα 4	106200	1800	1800	0	600	0
Δείγμα 5	69600	1200	48000	0	0	0
Δείγμα 6	119400	0	1615200	0	0	0
Δείγμα 7	352000	0	1800	0	0	0
Δείγμα 8	8400	37800	331200	0	0	0

Παρατηρείται ότι όλα τα δείγματα πληρούν τις προϋποθέσεις ως προς την *Salmonella* sp. και την *E.coli* και ένα μεγάλο μέρος των δειγμάτων είναι μέσα στα νομοθετικά όρια και για τον *Enterococcus* sp., ενώ ως προς τους υπόλοιπους δείκτες είναι πολύ πάνω από το όριο που ορίζεται από τον νόμο.

Πίνακας 6.2(ε) Σύγκριση τιμών που βρέθηκαν στον κρόκο των αυγών με τα νομοθετικά όρια

	OMX	<i>Staphylococcus</i> sp.	<i>Staphylococcus</i> sp.	<i>E.coli</i>	<i>Enterococcus</i> sp.	<i>Salmonella</i> sp.
Νομοθετικά όρια	<200.000/g	<5/g	<5/g	<10/g	<100/g	Απουσία στα 25g
Δείγμα 1	600	400	720	0	120	0
Δείγμα 2	0	0	0	0	0	0
Δείγμα 3	40	0	0	0	40	0
Δείγμα 4	0	0	0	0	0	0
Δείγμα 5	0	0	0	0	0	0
Δείγμα 6	440	40	0	0	0	0
Δείγμα 7	40	0	40	0	0	0
Δείγμα 8	0	0	40	0	0	0

Περαιτέρω σύγκριση των νομοθετικών ορίων με τα αποτελέσματα του εσωτερικού του αυγού, που είναι και το κύριο μέρος που μας ενδιαφέρει καθώς αυτό είναι που καταναλώνεται μας δείχνει ότι πληρούνται οι προϋποθέσεις των δεικτών εκτός των δειγμάτων 1,6,7,8. Στα δείγματα αυτά έχουμε παρουσία των σταφυλόκοκκων. Σε συνδυασμό και με τα αποτελέσματα από τις καλλιέργειες από το κέλυφος των αντίστοιχων δειγμάτων θα μπορούσαν να χαρακτηρισθούν ως μη κατάλληλα.



Διάγραμμα 6.2 (ε) Ποσοστό κατάλληλων και μη δειγμάτων

6.3 Δείγματα συσκευασμένης σαλάτας

Πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις σε πέντε δείγματα σαλάτας που προέρχονταν από πέντε διαφορετικές εταιρείες. Η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε κάτω από στείρες συνθήκες για την αποφυγή τυχόν επιμόλυνσης του δείγματος και η προετοιμασία του δείγματος καθώς και η διαδικασία καλλιέργειας γινόταν την ίδια μέρα με την αγορά για την αποφυγή αλλοίωσης του τροφίμου συνεπώς και τον αποτελεσμάτων. Τα δείγματα παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 6.3(a): Δείγματα σαλάτας

Σαλάτα	
Δείγματα	Τύπος δείγματος
Δείγμα 1	Ανάμεικτη
Δείγμα 2	Ανάμεικτη, χωρίς φυτοφάρμακα
Δείγμα 3	Μαρούλι βιολογικό
Δείγμα 4	Λόλα πράσινη
Δείγμα 5	Ρόκα

Τα δείγματα εξετάστηκαν για την παρουσία κάποιων μικροβιακών δεικτών πάνω στους οποίους έχουν θεσπιστεί νομοθετικά όρια τα οποία κρίνουν αν το προϊόν είναι κατάλληλο για την διάθεση σε σημεία λιανικής πώλησης. Στον πίνακα 6.3(b) φαίνονται οι μικροβιακοί δείκτες καθώς και τα όρια τους.

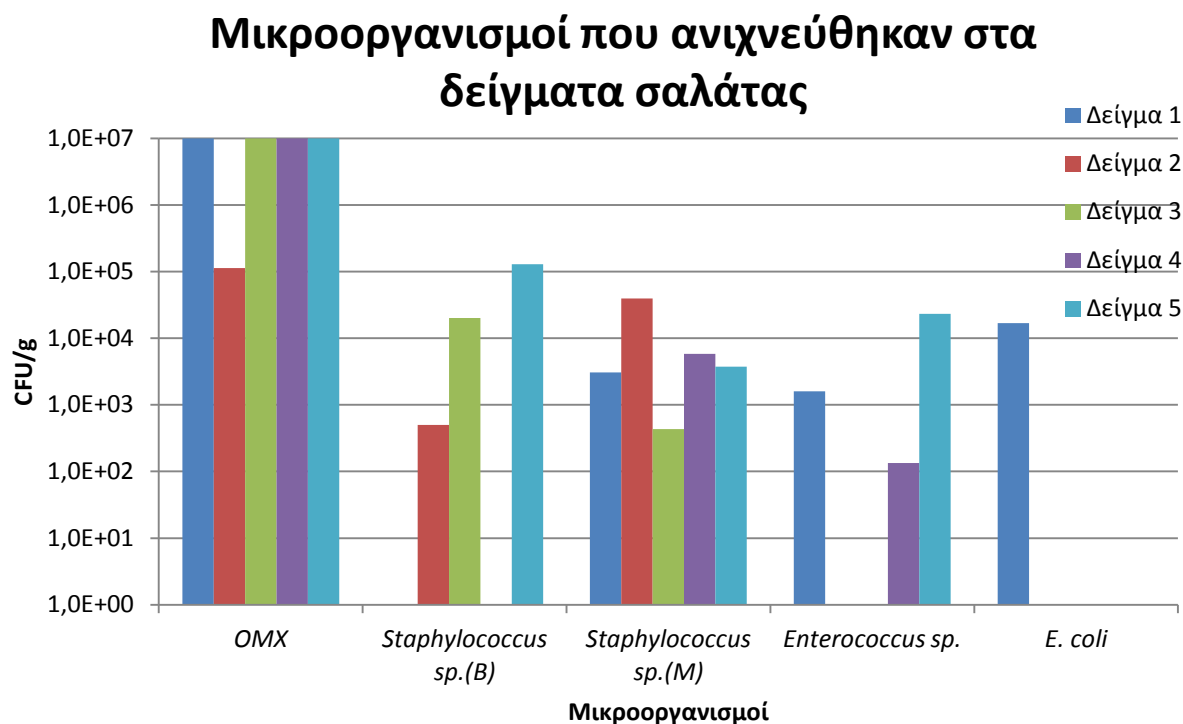
Πίνακας 6.3(b): Μικροβιακά επιτρεπτά όρια

Μικροβιακοί δείκτες	Νομοθετικά όρια(CFU/g)
OMX	<10.000/g
<i>E.coli</i>	<1.000/g
<i>Staphylococcus sp.</i>	
<i>Enterococcus sp.</i>	

Για την μέτρηση των παραπάνω μικροβιακών δεικτών χρησιμοποιήθηκαν εκλεκτικά θρεπτικά υλικά για την ανίχνευσή τους και ακολουθήθηκαν συγκεκριμένα πρωτόκολλα καλλιέργειας (βλ. παράγραφο 5.3). Αφού λήφθηκαν τα τριβλία των καλλιεργειών, μετρήθηκαν οι αποικίες και στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε αναγωγή των αποικιών σε μονάδες CFU/g δείγματος για να δούμε αν πληρούνται οι προδιαγραφές. Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν βλέπουμε ότι κανένα από τα δείγματα δεν ήταν απαλλαγμένο από κάποιον μικροβιακό δείκτη όπως φαίνεται στο διάγραμμα 6.3(a) που παρατίθεται. Αντίθετα βλέπουμε έναν σημαντικό αριθμό μικροβίων να είναι παρών στα δείγματα μας. Αυτό βέβαια δεν σημαίνει και ότι το δείγμα είναι ακατάλληλο για κατανάλωση. Στο διάγραμμα 6.3(a) υπάρχουν δύο

στήλες για τον *Staphylococcus* sp., επειδή χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικά θρεπτικά υλικά για την ανίχνευση του.

Διάγραμμα 6.3(a): Αποτελέσματα δειγματοληψιών

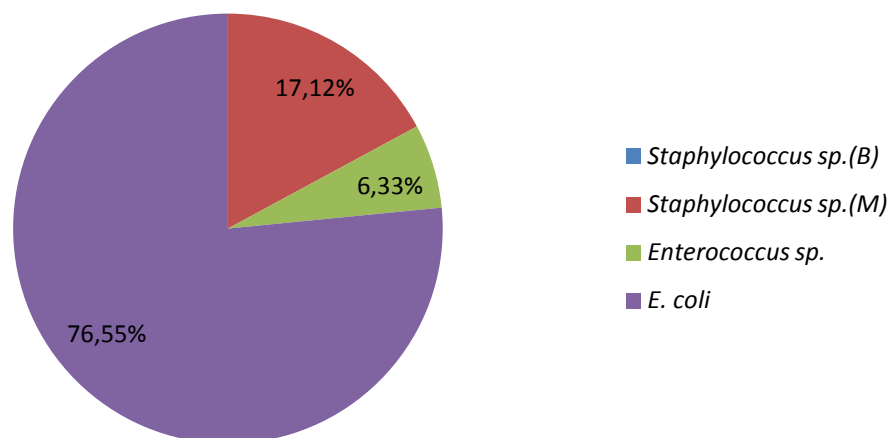


Επιπλέον πραγματοποιήθηκαν σε τρία δείγματα αποικιών σταφυλόκοκκου API test για την ταυτοποίησή τους για να δούμε αν είναι *S. aureus*.

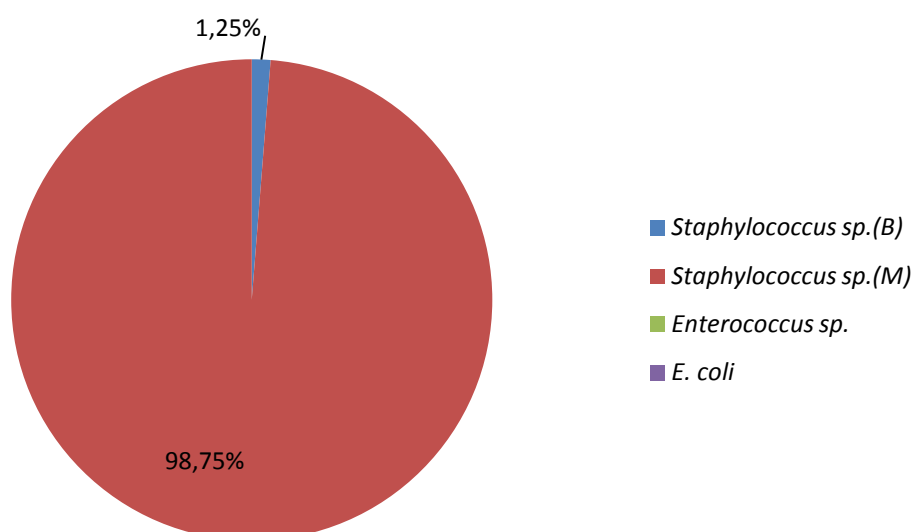
Πίνακας 6.3(c): Αποτελέσματα API Staph test

Δείγμα σαλάτας	Γένος <i>Staphylococcus</i> sp.
Δείγμα 1 (1.1)	<i>S. haemolyticus</i>
Δείγμα 1 (1.3)	<i>S. sciuri</i>
Δείγμα 3	<i>S. sciuri</i>
Δείγμα 5	<i>S. xylosus</i>

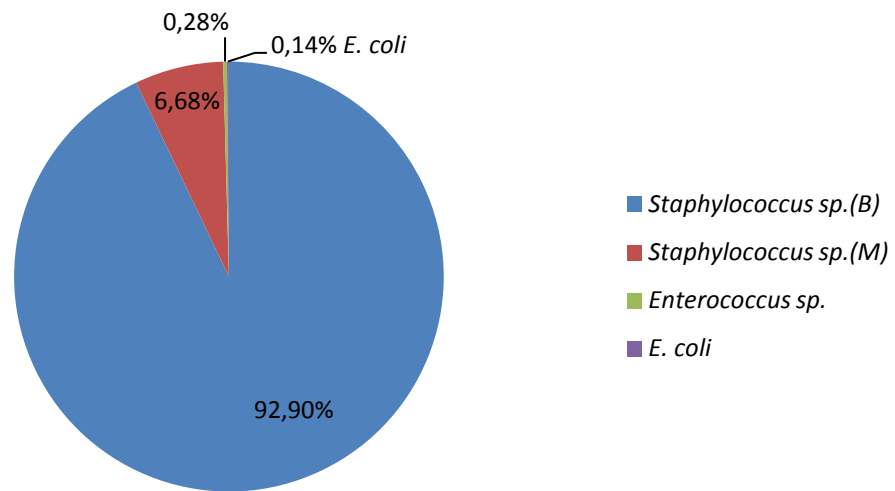
Ποσοστιαία κατανομή μικροοργανισμών Δείγμα 1



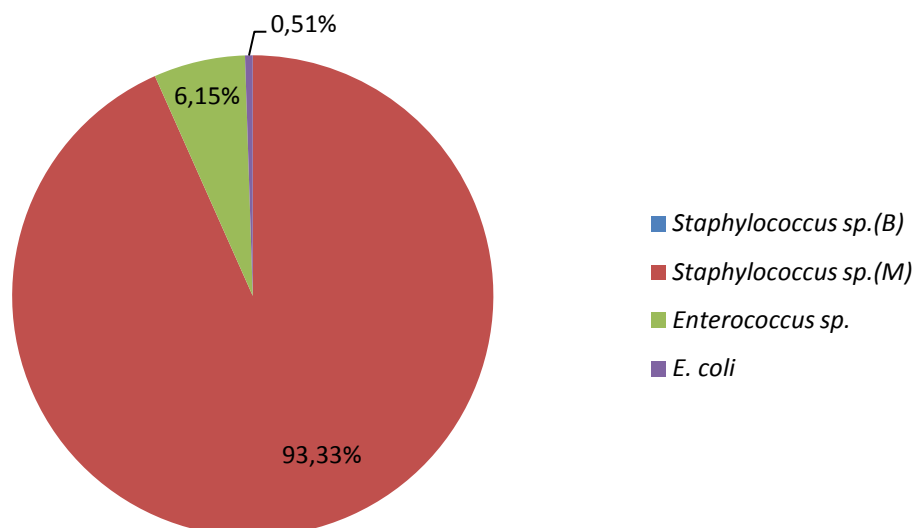
Δείγμα 2



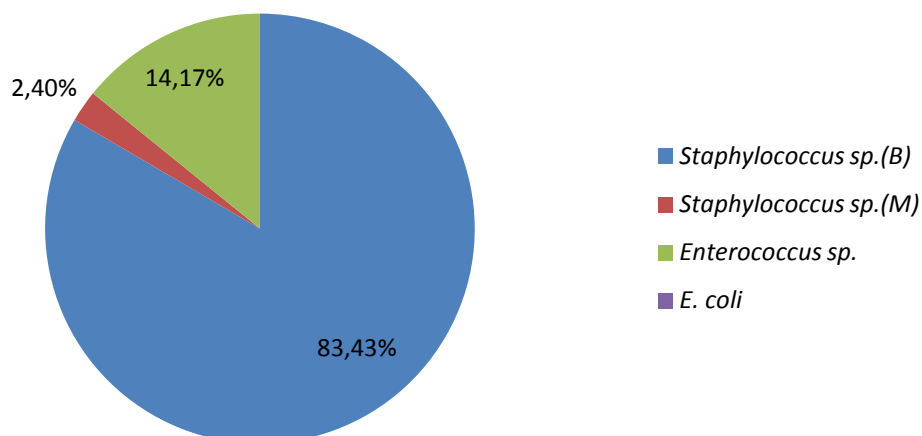
Ποσοστιαία κατανομή μικροοργανισμών Δείγμα 3



Δείγμα 4



Ποσοστιαία κατανομή μικροοργανισμών Δείγμα 5



Οι τιμές που έχουν προκύψει από την μετατροπή των αποικιών σε μονάδες CFU/g συγκρίθηκαν με τα επιτρεπτά νομοθετικά όρια για τον χαρακτηρισμό του τροφίμου ως κατάλληλο ή μη κατάλληλο.

Πίνακας 6.3(d): Σύγκριση αποτελεσμάτων με νομοθετικά όρια

	OMX	<i>Staphylococcus</i> sp.	<i>Staphylococcus</i> sp.	<i>E.coli</i>	<i>Enterococcus</i> sp.
Νομοθετικά όρια	<10.000/g			<1.000/g	
Δείγμα 1	T.M.T.C	0	4866,66	21766,66	1800
Δείγμα 2	113866,66	500	46666,66	0	0
Δείγμα 3	T.M.T.C	21800	1566,66	33,3	66,6
Δείγμα 4	T.M.T.C	0	6066,66	33,3	400
Δείγμα 5	T.M.T.C	134266,66	3866,66	0	22800

Παρατηρώντας τις τιμές που έχουν προκύψει και συγκρίνοντας τις τιμές με τα νομοθετικά όρια, βλέπουμε ότι κανένα δείγμα δεν πληροί τις προϋποθέσεις ως προς την OMX ενώ ως προς την *E. coli* μόνο ότι το δείγμα 1 βρίσκεται πάνω από το επιτρεπτό όριο. Τέλος η παρουσία σταφυλόκοκκων μπορεί να μην σημαίνει και την ακαταλληλότητα της σαλάτας για κατανάλωση καθώς αυτό που μας νοιάζει κυρίως είναι η απουσία της τοξίνης που παράγει ο *S. aureus*. Σε γενικές γραμμές όλα τα δείγματα θα μπορούσαν να χαρακτηριστούν ως ακατάλληλα για κατανάλωση λόγω του μικροβιακού φορτίου.

6.4 Δείγματα προϊόντων τυρογάλακτος

Πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις σε επτά δείγματα τυρογάλακτος που προερχόντουσαν από επτά διαφορετικές εταιρείες. Η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε κάτω από στείρες συνθήκες για την αποφυγή τυχόν επιμόλυνσης του δείγματος και η προετοιμασία του δείγματος καθώς και η διαδικασία καλλιέργειας γινόταν την ίδια μέρα με την αγορά για την αποφυγή αλλοίωσης του τροφίμου συνεπώς και τον αποτελεσμάτων. Τα δείγματα παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 6.4(a): Δείγματα προϊόντων τυρογάλακτος

Σαλάτα	
Δείγματα	Τύπος δείγματος
Δείγμα 1	Μυζήθρα
Δείγμα 2	Μυζήθρα
Δείγμα 3	Ξινομυζήθρα
Δείγμα 4	Μυζήθρα
Δείγμα 5	Μυζήθρα
Δείγμα 6	Πηχτόγαλο
Δείγμα 7	Πηχτόγαλο

Τα δείγματα εξετάστηκαν για την παρουσία κάποιων μικροβιακών δεικτών πάνω στους οποίους έχουν θεσπιστεί νομοθετικά όρια τα οποία κρίνουν αν το προϊόν είναι κατάλληλο για την διάθεση σε σημεία λιανικής πώλησης. Στον πίνακα 6.3(b) φαίνονται οι μικροβιακοί δείκτες καθώς και τα όρια τους.

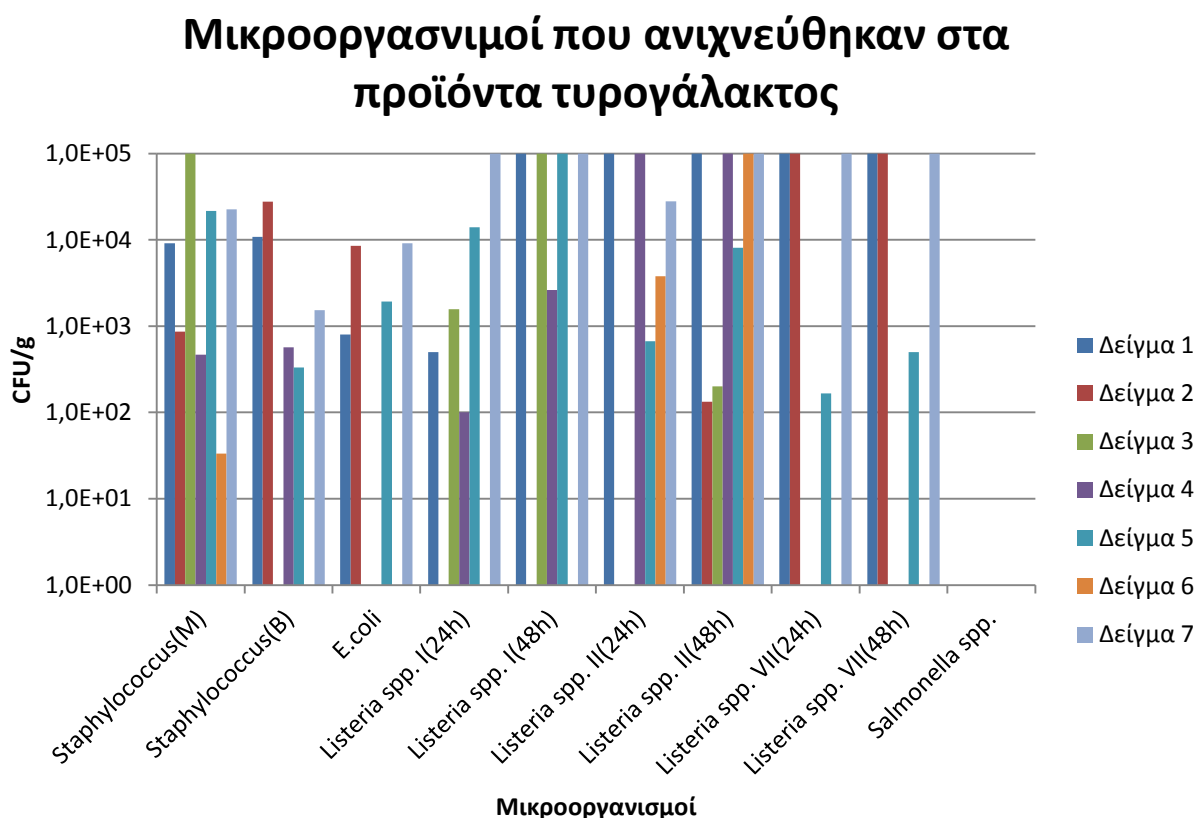
Πίνακας 6.4(b): Μικροβιακά επιτρεπτά όρια

Μικροβιακοί δείκτες	Νομοθετικά όρια (CFU/g)
<i>Staphylococcus</i> sp.	<1.000/g
<i>E. coli</i>	<1.000/g
<i>Listeria</i> sp.	Απουσία στα 25 g
<i>Salmonella</i> sp.	Απουσία στα 25 g

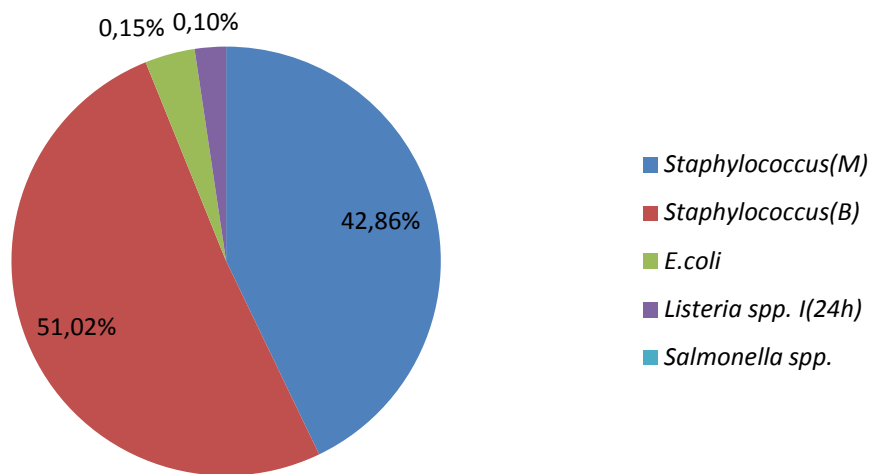
Για την μέτρηση των παραπάνω μικροβιακών δεικτών χρησιμοποιήθηκαν εκλεκτικά θρεπτικά υλικά για την ανίχνευσή τους και ακολουθήθηκαν συγκεκριμένα πρωτόκολλα καλλιέργειας (βλ. παράγραφο 5.3). Αφού λήφθηκαν τα τριβλία των καλλιέργειών, μετρήθηκαν οι αποικίες και στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε αναγωγή των αποικιών σε μονάδες CFU/g δείγματος για να δούμε αν πληρούνται οι προδιαγραφές. Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν βλέπουμε ότι κανένα από τα δείγματα δεν ήταν απαλλαγμένο από κάποιον μικροβιακό δείκτη όπως φαίνεται στο

διάγραμμα 6.4(a) που παρατίθεται. Αντίθετα βλέπουμε έναν σημαντικό αριθμό μικροβίων να είναι παρών στα δείγματα μας. Αυτό βέβαια δεν σημαίνει και ότι το δείγμα είναι ακατάλληλο για κατανάλωση. Στο διάγραμμα 6.4(a) υπάρχουν δύο στήλες για τον *Staphylococcus* sp., επειδή χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικά θρεπτικά υλικά για την ανίχνευση του.

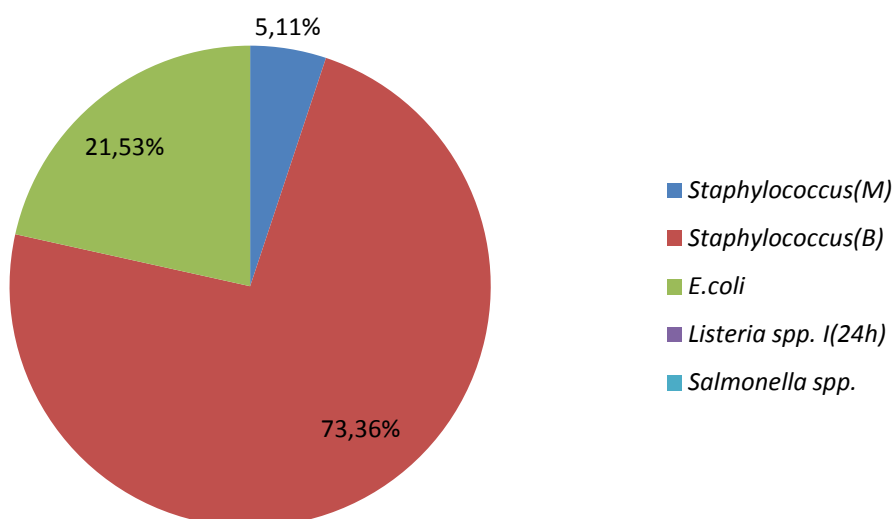
Διάγραμμα 6.4(a): Αποτελέσματα δειγματοληψιών



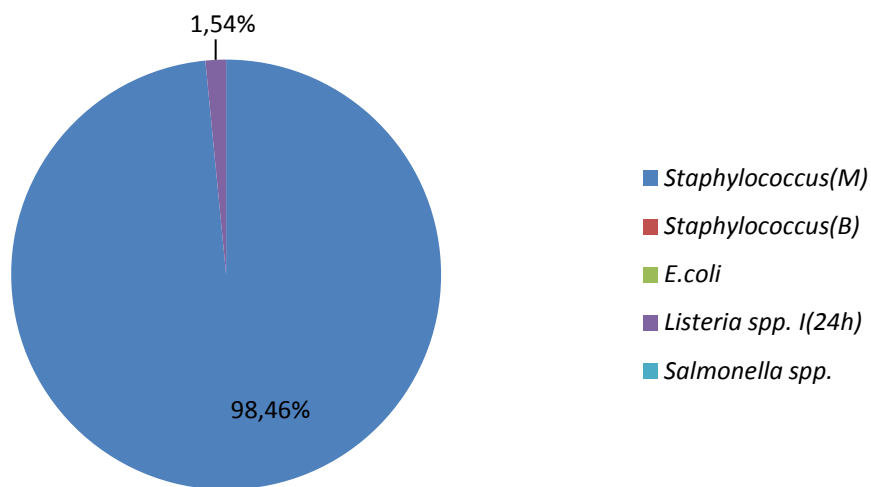
Ποσοστιαία κατανομή μικροοργανισμών Δείγμα 1



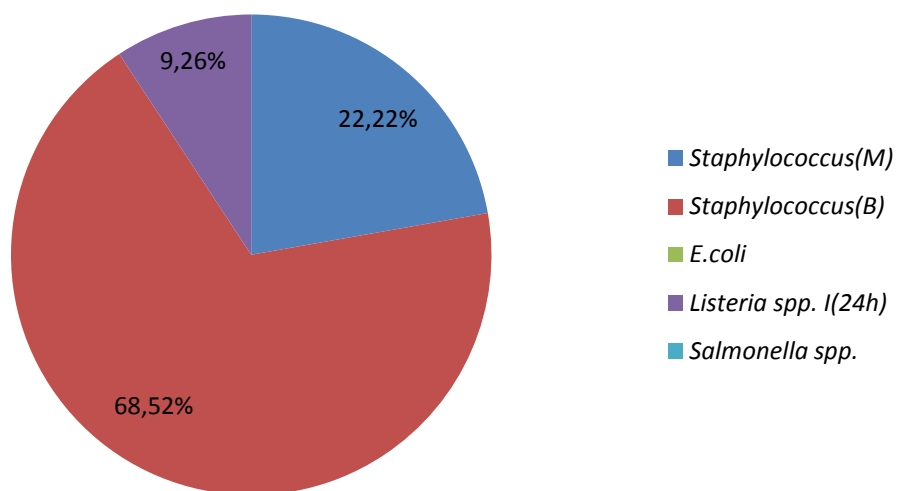
Δείγμα 2



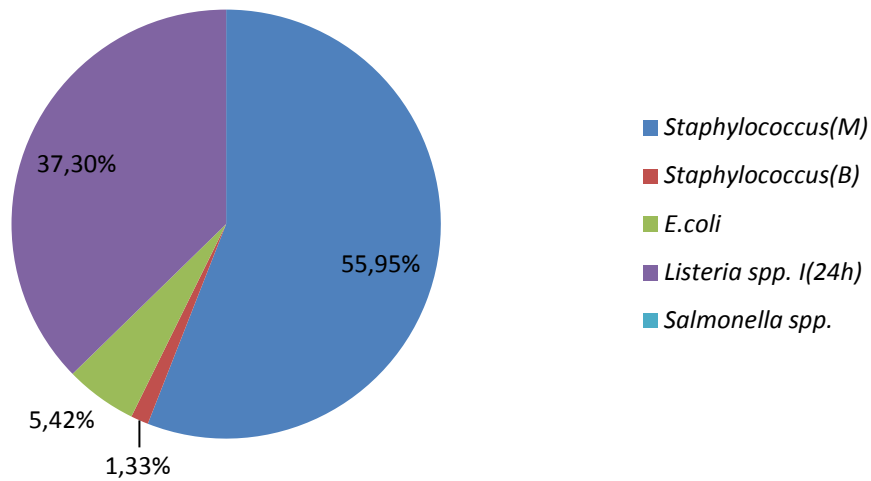
Ποσοστιαία κατανομή μικροοργανισμών Δείγμα 3



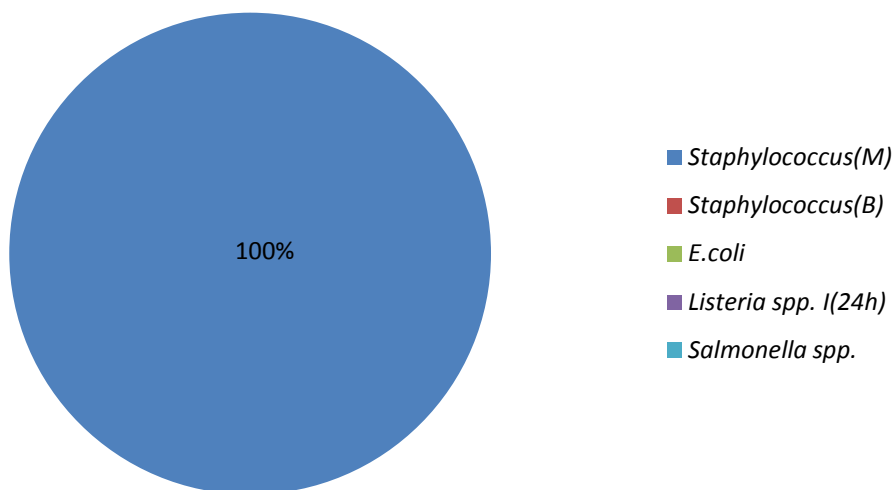
Δείγμα 4



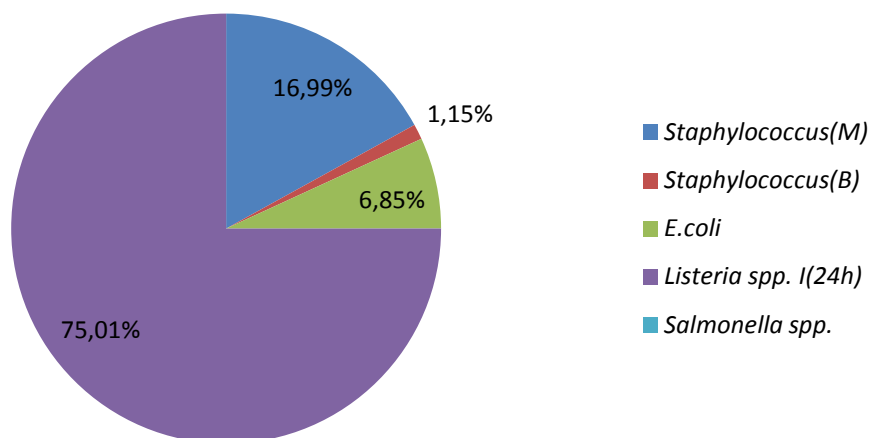
Ποσοστιαία κατανομή μικροοργανισμών Δείγμα 5



Δείγμα 6



Ποσοστιαία κατανομή μικροοργανισμών Δείγμα 7



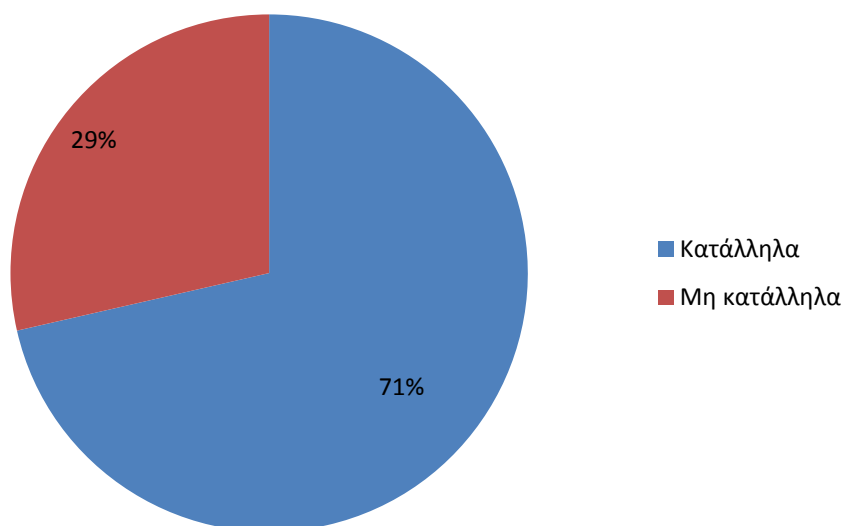
Οι τιμές που έχουν προκύψει από την μετατροπή των αποικιών σε μονάδες CFU/g συγκρίθηκαν με τα επιτρεπτά νομοθετικά όρια για τον χαρακτηρισμό του τροφίμου ως κατάλληλο ή μη κατάλληλο.

Πίνακας 6.4(d): Σύγκριση αποτελεσμάτων με νομοθετικά όρια

	<i>Staphylococcus sp.</i>	<i>Staphylococcus sp.</i>	<i>E.coli</i>	<i>Listeria sp. I(24h)</i>	<i>Listeria sp. I(48h)</i>	<i>Salmonella sp.</i>
Νομοθετικά όρια	<1.000/g	<1.000/g	<1.000/g	Απουσία στα 25 g	Απουσία στα 25 g	Απουσία στα 25 g
Δείγμα 1	9100	10833,33	800	T.M.T.C	T.M.T.C	0
Δείγμα 2	866,66	28733,33	8533,33	0	0	0
Δείγμα 3	T.M.T.C	0	0	2433,33	T.M.T.C	0
Δείγμα 4	466,66	1233,33	0	166,66	2633,33	0
Δείγμα 5	21566,66	500	2033,33	14033,33	T.M.T.C	0
Δείγμα 6	100	0	0	0	0	0
Δείγμα 7	22654	1533,33	9133,33	T.M.T.C	T.M.T.C	0

Παρατηρώντας τις τιμές που έχουν προκύψει και συγκρίνοντας τις τιμές με τα νομοθετικά όρια, βλέπουμε ότι κανένα δείγμα δεν πληροί τις προϋποθέσεις εκτός του δείγματος 6. Εδώ πρέπει να σημειωθεί ότι για την *Listeria sp.* πέρα από τις καλλιέργειες πρέπει να πραγματοποιηθεί και βιοχημική ταυτοποίηση API για να εξακριβωθεί η παρουσία της. Τέλος η παρουσία σταφυλόκοκκων μπορεί να μην σημαίνει και την ακαταλληλότητα των προϊόντων για κατανάλωση καθώς αυτό που μας νοιάζει κυρίως είναι η απουσία της τοξίνης που παράγει ο *S. aureus*.

Υποθέτοντας ότι δεν υπάρχει *Listeria* στα δείγματα από την στιγμή που έχουν προωθηθεί στο στάδιο της πώλησης και λόγω του ότι δεν πραγματοποιήθηκε ΑΡΙ τα δείγματα 1,3,4,5,6 μπορούν να θεωρηθούν κατάλληλα, ενώ τα δείγματα 2 και 7 ακατάλληλα.



Διάγραμμα 6.4(c) Ποσοστό κατάλληλων και μη δειγμάτων

6.5 Δείγματα ψαριών

Πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις σε πέντε δείγματα. Η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε κάτω από στείρες συνθήκες για την αποφυγή τυχόν επιμόλυνσης του δείγματος και η προετοιμασία του δείγματος καθώς και η διαδικασία καλλιέργειας γινόταν την ίδια μέρα με την αγορά για την αποφυγή αλλοίωσης του τροφίμου συνεπώς και τον αποτελεσμάτων. Τα δείγματα παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 6.5(a): Δείγματα ψαριών

Ψάρι	
Δείγματα	Τύπος δείγματος
Δείγμα 1	Γόπα
Δείγμα 2	Μελανούρι
Δείγμα 3	Λυθρίνι
Δείγμα 4	Γόπα
Δείγμα 5	Σαρδέλα

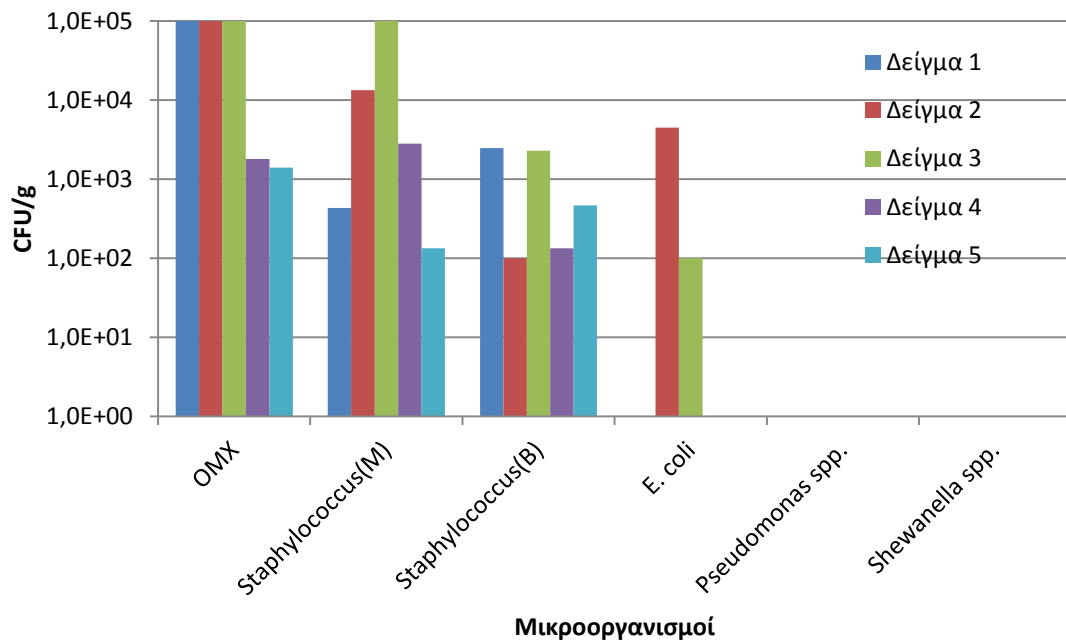
Τα δείγματα εξετάστηκαν για την παρουσία κάποιων μικροβιακών δεικτών πάνω στους οποίους έχουν θεσπιστεί νομοθετικά όρια τα οποία κρίνουν αν το προϊόν είναι κατάλληλο για την διάθεση σε σημεία λιανικής πώλησης. Στον πίνακα 6.5(b) φαίνονται οι μικροβιακοί δείκτες καθώς και τα όρια τους.

Πίνακας 6.5(b): Μικροβιακά επιτρεπτά όρια

Μικροβιακοί δείκτες	Νομοθετικά όρια (CFU/g)
OMX	<10.000/g
<i>E.coli</i>	<100/g
<i>Staphylococcus</i> sp.	
<i>Pseudomonas</i> sp.	
<i>Shewanella</i> sp.	

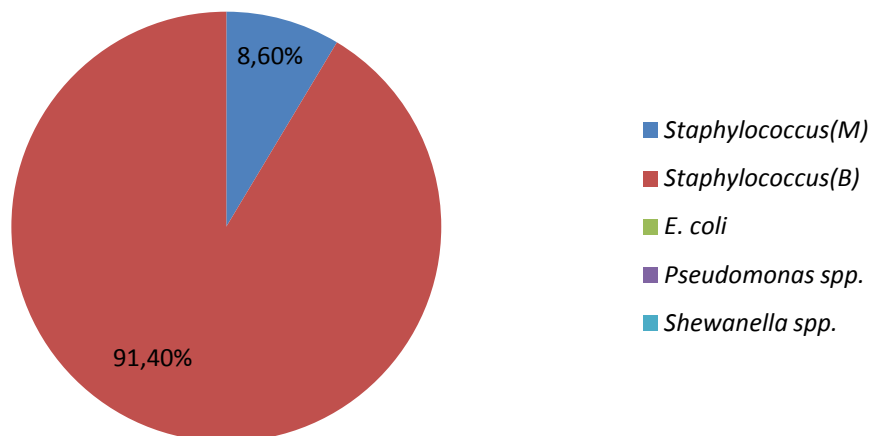
Για την μέτρηση των παραπάνω μικροβιακών δεικτών χρησιμοποιήθηκαν εκλεκτικά θρεπτικά υλικά για την ανίχνευσή τους και ακολουθήθηκαν συγκεκριμένα πρωτόκολλα καλλιέργειας (βλ. παράγραφο 5.3). Αφού λήφθηκαν τα τριβλία των καλλιεργειών, μετρήθηκαν οι αποικίες και στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε αναγωγή των αποικιών σε μονάδες CFU/g δείγματος για να δούμε αν πληρούνται οι προδιαγραφές. Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν βλέπουμε ότι κανένα από τα δείγματα δεν ήταν απαλλαγμένο από κάποιον μικροβιακό δείκτη όπως φαίνεται στο διάγραμμα 6.5(a) που παρατίθεται. Αντίθετα βλέπουμε έναν σημαντικό αριθμό μικροβίων να είναι παρών στα δείγματα μας. Αυτό βέβαια δεν σημαίνει και ότι το δείγμα είναι ακατάλληλο για κατανάλωση. Στο διάγραμμα 6.5(a) υπάρχουν δύο στήλες για τον *Staphylococcus* sp., επειδή χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικά θρεπτικά υλικά για την ανίχνευση του.

Μικροοργανισμοί που ανιχνεύθηκαν στα δείγματα ψαριού

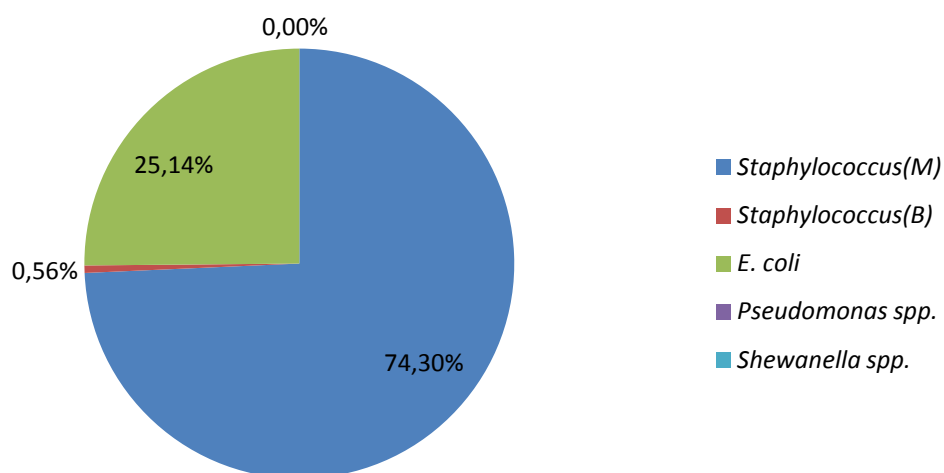


Διάγραμμα 6.5(a) Αποτελέσματα δειγματοληψιών

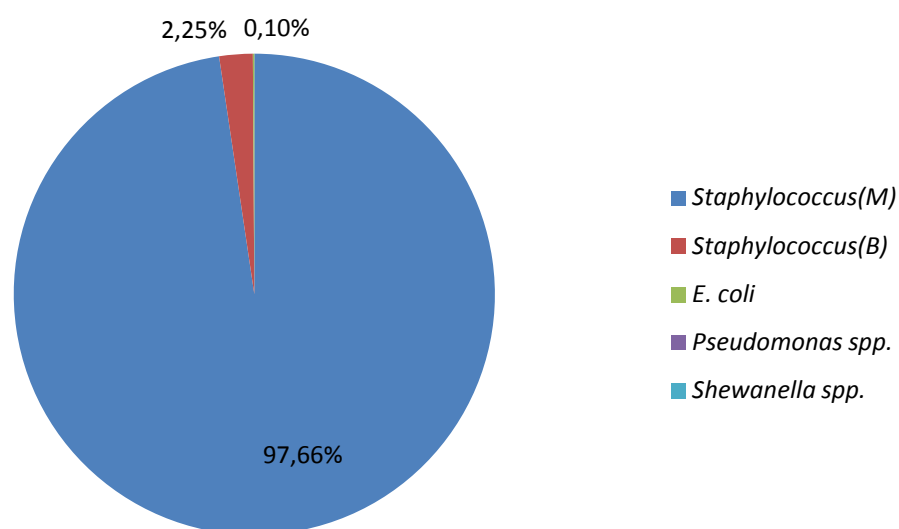
Ποσοστιαία κατανομή μικροοργανισμών Δείγμα 1



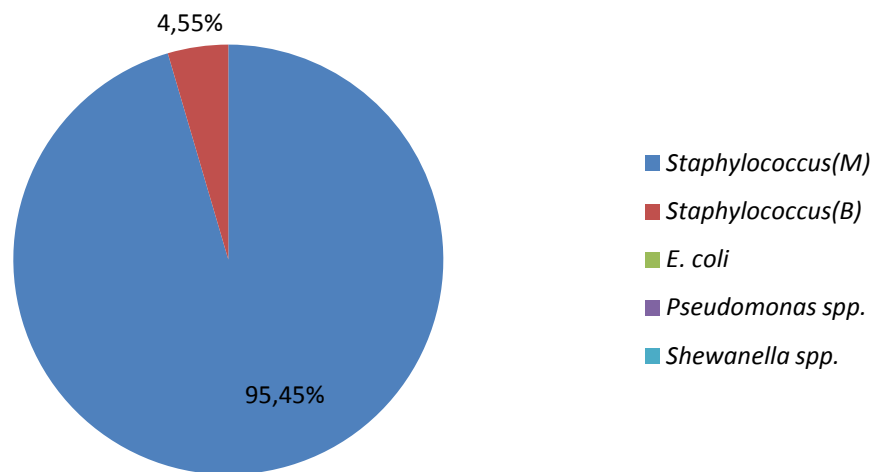
Ποσοστιαία κατανομή μικροοργανισμών Δείγμα 2



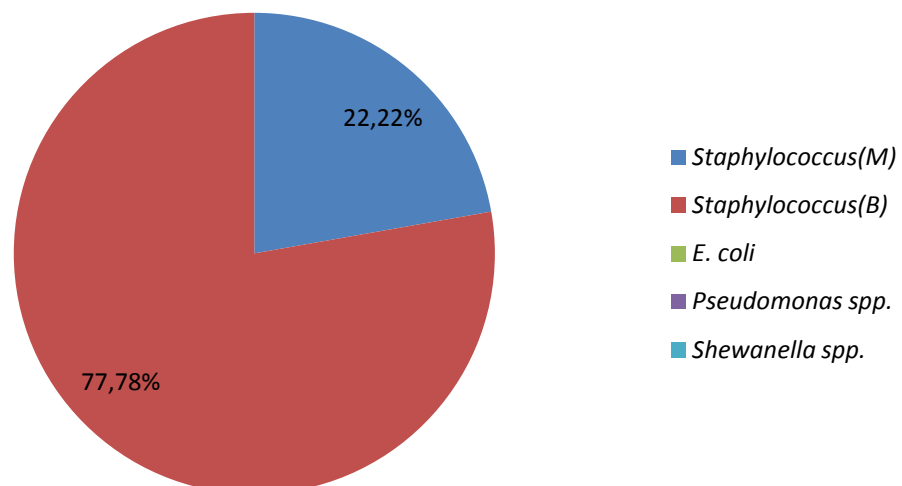
Δείγμα 3



Ποσοστιαία κατανομή μικροοργανισμών Δείγμα 4



Δείγμα 5

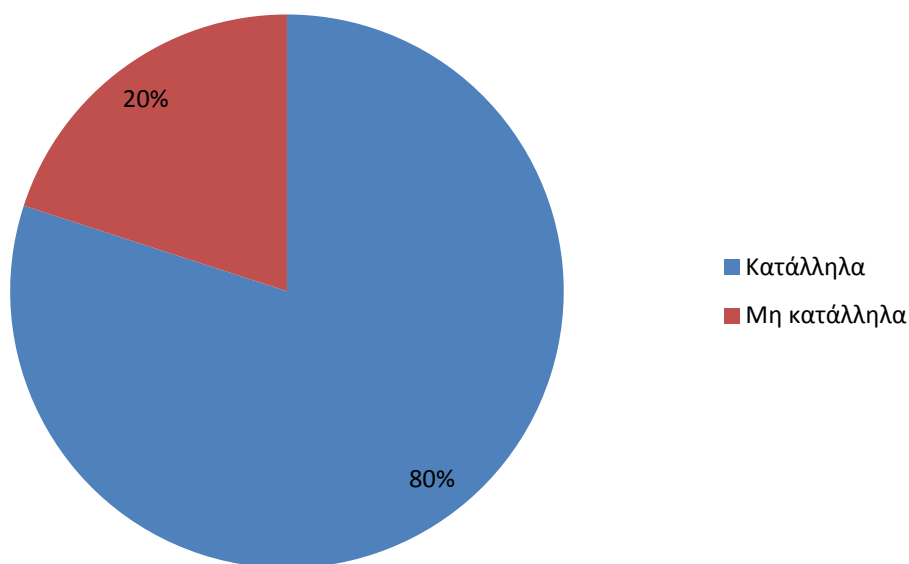


Οι τιμές που έχουν προκύψει από την μετατροπή των αποικιών σε μονάδες CFU/g συγκρίθηκαν με τα επιτρεπτά νομοθετικά όρια για τον χαρακτηρισμό του τροφίμου ως κατάλληλο ή μη κατάλληλο.

Πίνακας 6.5(d): Σύγκριση αποτελεσμάτων με νομοθετικά όρια

	OMX	<i>Staphylococcus</i> <i>sp.</i>	<i>Staphylococcus</i> <i>sp.</i>	<i>E. coli</i>	<i>Pseudomonas</i> <i>sp.</i>	<i>Shewanella</i> <i>sp.</i>
Νομοθετικά όρια	<10.000/g			<100/g		
Δείγμα 1	T.M.T.C	433,33	2833,33	0	0	0
Δείγμα 2	T.M.T.C	13300	266,66	4500	0	0
Δείγμα 3	T.M.T.C	T.M.T.C	2300	100	0	0
Δείγμα 4	2400	2800	133,33	0	0	0
Δείγμα 5	1900	133,33	466,66	0	0	0

Παρατηρώντας τις τιμές που έχουν προκύψει και συγκρίνοντας τις τιμές με τα νομοθετικά όρια, βλέπουμε ότι για τον δείκτη της *E. coli* μόνο το δείγμα 2 είναι πάνω από τα νομοθετικά όρια, ενώ για την OMX οι τιμές μπορούν να χαρακτηριστούν εκτός ορίων καθώς πραγματοποιήθηκαν δύο διαδοχικές αραιώσεις για την λήψη των παραπάνω τιμών. Παρόλα αυτά τα δείγματα μπορούν να θεωρηθούν κατάλληλα για κατανάλωση. Το μόνο δείγμα που θα μπορούσε να θεωρηθεί ως ακατάλληλο είναι το δείγμα 2 του οποίου η τιμή για την *E. coli* βρίσκεται πάνω από το επιτρεπτό όριο.



Διάγραμμα 6.5(c) Ποσοστό κατάλληλων και μη δειγμάτων

6.6 Real-time PCR

Αφού ελέγχθηκε η παρουσία των μικροβιακών δεικτών στα δείγματα, στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε η διαδικασία απομόνωσης (βλ. παρ.5.5) του DNA για κάποια δείγματα τροφίμων. Τα δείγματα που επιλέχτηκαν εξετάστηκαν με την μέθοδο της real-time PCR για την παρουσία του *Enterococcus faecalis*, ενός Εντερόκοκκου κοπρανώδους προέλευσης, και για την παρουσία *E. coli*. Τα δείγματα που εξετάστηκαν φαίνονται στον πίνακα 6.6(a).

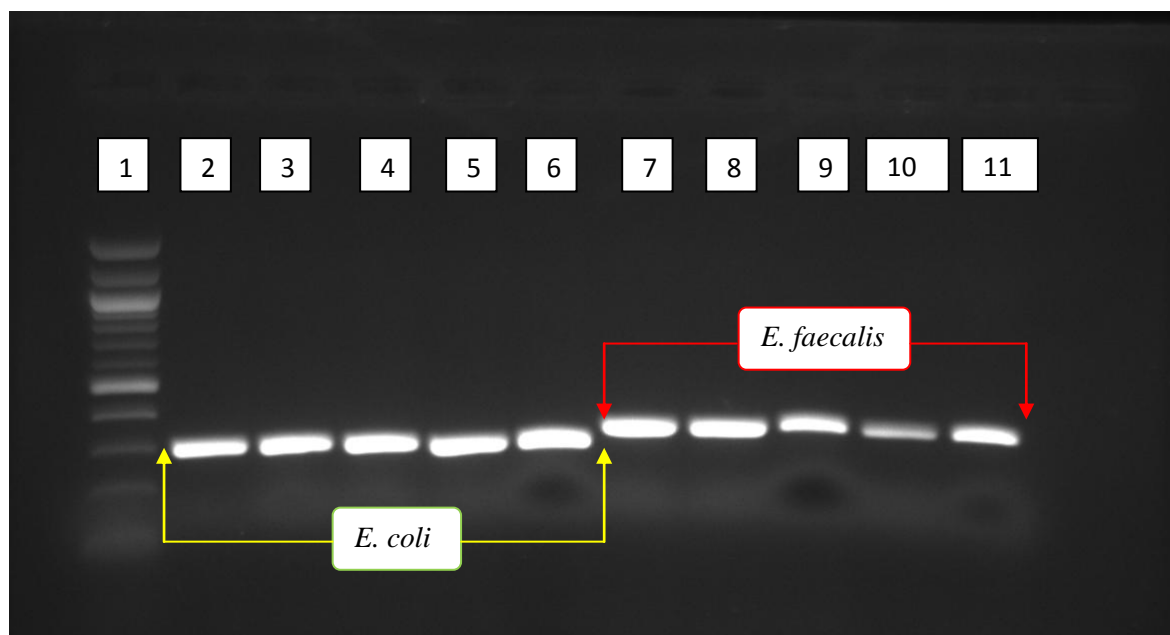
Πίνακας 6.6(a): Δείγματα που εξετάστηκαν με την real-time PCR

Δείγματα που εξετάστηκαν	Αριθμός απομόνωσης
Δείγμα 1 από κοτόπουλο	1
Δείγμα 2 από κοτόπουλο	2
Δείγμα 4 από κοτόπουλο	13
Δείγμα 5 από κοτόπουλο	3
Δείγμα 6 από κέλυφος αυγού	4
Δείγμα 8 από κέλυφος αυγού	5
Δείγμα 1 από κρόκο αυγού	14
Δείγμα 7 από κρόκο αυγού	6
Δείγμα 1 από σαλάτα	7
Δείγμα 3 από σαλάτα	15
Δείγμα 5 από σαλάτα	8
Δείγμα 1 από προϊόν τυρογάλακτος	16
Δείγμα 4 από προϊόν τυρογάλακτος	9
Δείγμα 6 από προϊόν τυρογάλακτος	17
Δείγμα 7 από προϊόν τυρογάλακτος	10
Δείγμα 2 από ψάρι	11
Δείγμα 3 από ψάρι	18
Δείγμα 5 από ψάρι	12

Αφού πραγματοποιήθηκε η διαδικασία απομόνωσης του DNA για τα παρακάτω δείγματα, τα δείγματα φωτομετρήθηκαν για να αξιολογηθεί η καθαρότητα του DNA και για να βρούμε την ποσότητα του DNA που απομονώθηκε από το κάθε δείγμα. Η καθαρότητα του DNA καθορίζεται από τον λόγο της οπτικής απορρόφησης στα δύο μήκη κύματος, όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω στην παρ. 5.6.

Παράλληλα, απομονώθηκε γενετικό υλικό από πρότυπα στελέχη *E. faecalis* & *E. coli*, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ως θετικά control για τη δημιουργία της πρότυπης καμπύλης στην PCR.

Παρακάτω φαίνονται τα προϊόντα της PCR και για τα δύο βακτήρια. Όπως αναφέρθηκε και στο πειραματικό μέρος της εργασίας, η PCR βασίστηκε στην ανίχνευση των γονιδίων *Efs* και *gadrt* των *E. faecalis* και *E. coli*, αντίστοιχα.

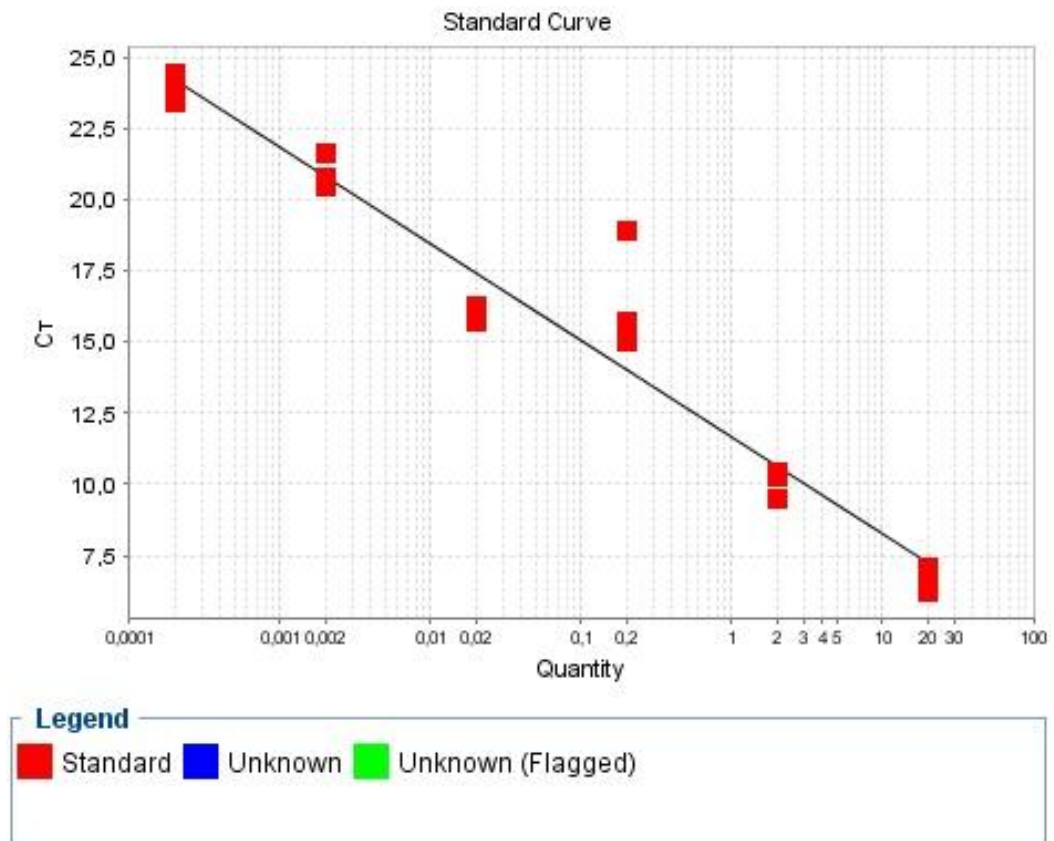


Εικόνα 6.6(a): Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR του γονιδίου *gadrt* του βακτηρίου *E. coli* (θετικό κοντρόλ) και του γονιδίου *Efs* του βακτηρίου *E. faecalis* (θετικό κοντρόλ)-διαδρομή 1 DNA marker 100bp, διαδρομή 2-6 PCR product της *E. coli*, διαδρομή 7-11 PCR product του *E. faecalis*

Τα προϊόντα της PCR της *E. coli* εντοπίζονται στις θέσει 2-6 με μέγεθος βάσεων για το γονίδιο *gadrt* 305bp και τα προϊόντα του *E. faecalis* βρίσκονται στις θέσεις 7-11 με μέγεθος βάσεων για το γονίδιο *Efs* 360bp.

Για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των *E. faecalis* και *E. coli* στα δείγματα που επιλέξαμε (βλ. Πίνακα 6.6(b)) επιλέχτηκε η μέθοδος της SYBR-GREEN (SYBR green method), με την χρήση του StepOne Plus System (Applied Biosystems Inc., Foster City, USA).

❖ *Enterococcus faecalis*

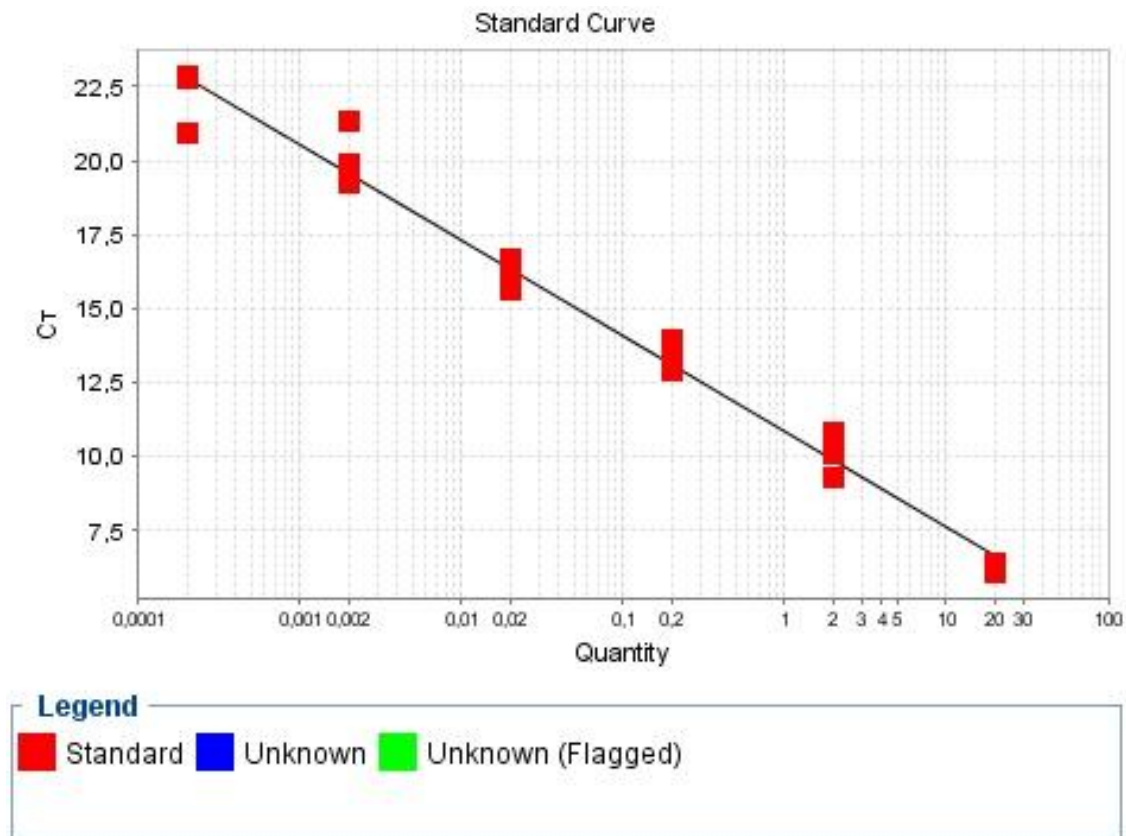


Target: Efs Slope: -3,397 Y-inter: 11,621 R²: 0,941 Eff%: 96,944

Εικόνα 6.6(b): Πρότυπη καμπύλη ποσοτικοποίησης του *E. faecalis* (όρια ανίχνευσης $20 \cdot 2 \cdot 10^{-3} \text{ ng}$)

Από το παραπάνω διάγραμμα μπορούμε να αξιολογήσουμε την αποδοτικότητα της διαδικασίας της PCR ως ποσοτική μέθοδο, λαμβάνοντας υπόψη τις τιμές του γραμμικού συντελεστή συσχέτισης και της κλίσεις, οι οποίες είναι 0,941 και -3,397 αντίστοιχα (Frahm and Obst 2003).

❖ *Escherichia coli*



Target: gadrt Slope: -3,227 Y-Inter: 10,83 R²: 0,982 Eff%: 104,115

Εικόνα 6.6(c): Πρότυπη καμπύλη ποσοτικοποίησης της *E. coli* (όρια ανίχνευσης $20 \cdot 2 \cdot 10^{-3}$ ng)

Από το παραπάνω διάγραμμα μπορούμε να αξιολογήσουμε την αποδοτικότητα της διαδικασίας της PCR ως ποσοτική μέθοδο, λαμβάνοντας υπόψη τις τιμές του γραμμικού συντελεστή συσχέτισης και της κλίσεις, οι οποίες είναι 0,982 και -3,227 αντίστοιχα (Frahm and Obst 2003).

Παρόλο που η διαδικασία της real-time PCR ήταν επιτυχής δεν ανιχνεύθηκε κάποιος από τους μικροοργανισμούς. Η αδυναμία ανίχνευσης των μικροοργανισμών αυτών μπορεί να οφείλεται στο ότι:

- Υπήρχαν διάφορες προσμίξεις στο απομονωμένο γενετικό υλικό από τα δείγματα των τροφίμων, οι οποίες πιθανόν να έδρασαν ως ανασταλτικοί παράγοντες για την αντίδραση της PCR.
- Η αντίδραση της PCR βασίστηκε στην ανίχνευση συγκεκριμένων γονιδίων τα οποία πιθανόν να μην έφεραν οι συγκεκριμένοι δείκτες στα δείγματα των τροφίμων.
- Για την ανίχνευση του *E. faecalis*, σημαίνει ότι δεν υπάρχει το συγκεκριμένο στέλεχος στα δείγματα μας, καθώς το γονίδιο Efs είναι αποκλειστικά για τον *E. faecalis*. Αυτό όμως δεν αποκλείει την ύπαρξη κάποιου άλλου στελέχους.

Κεφάλαιο 7: ISO-HACCP

7.1 ISO

Ο Διεθνής Οργανισμός Ταυτοποίησης (ISO- International Organization of Standardization) είναι μία διεθνής οργάνωση δημιουργίας και έκδοσης προτύπων. Ο ISO έχει εκδώσει ένα πλήθος οδηγών καλύπτοντας σχεδόν κάθε είδος βιομηχανίας. Η υιοθέτηση ενός πλάνου ISO εξασφαλίζει ότι το προϊόν και οι υπηρεσίες που παρέχονται από την εκάστοτε βιομηχανία είναι ασφαλείς, αξιόπιστες και υψηλής ποιότητας, για αυτό και η χρήση τους θεωρείται αναγκαία. Κάποια από τα σχέδια ISO που μας ενδιαφέρουν για την βιομηχανία των τροφίμων είναι:

- ISO 9001:2008- Εδραιώνει τα κριτήρια για την διαχείριση ποιότητας
- ISO 18593:2004- Καθορίζει τις μεθόδους για τις τεχνικές δειγματοληψίας από επιφάνειες χρησιμοποιώντας πλάκες επαφής και επιχρίσματα στην μικροβιολογία τροφίμων
- ISO 22000:2005- Καθορίζει τις απαιτήσεις ενός συστήματος διαχείρισης ασφάλειας τροφίμων. Εκδόθηκε από τον ISO το 2005 και ενσωματώνει τις:
 - Απαιτήσεις του HACCP
 - Απαιτήσεις της ισχύουσας νομοθεσίας
 - Γενικές αρχές των συστημάτων διαχείρισης

7.2 HACCP

Η ασφάλεια των τροφίμων διασφαλίζεται κυρίως με προληπτικά μέτρα, όπως είναι η εφαρμογή ορθών πρακτικών υγιεινής και η εφαρμογή διαδικασιών που διέπονται από αρχές βασιζόμενες στον προσδιορισμό και την ανάλυση των κινδύνων στα τρόφιμα και των κρίσιμων σημείων ελέγχου τους. Τα προληπτικά αυτά μέτρα εφαρμόζονται όχι μόνο στα στάδια της παραγωγικής διαδικασίας, αλλά και στην παραλαβή πρώτων υλών, καθώς και στην συσκευασία, αποθήκευση και διανομή των τελικών προϊόντων και συνθέτουν το σύστημα αυτοέλεγχου μιας επιχείρησης τροφίμων.

Σύμφωνα με το άρθρο 5 του κανονισμού ΕΚ 852/2004 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου για την υγιεινή των τροφίμων είναι υποχρεωτική για τους υπεύθυνους των επιχειρήσεων τροφίμων η θέσπιση, η εφαρμογή και η τήρηση μιας διαρκούς διαδικασίας που θα βασίζεται στις αρχές του HACCP.

Όπως αναφέραμε στο Κεφάλαιο 1 στην παράγραφο 1.2.2, το HACCP αποτελεί ένα σύστημα διασφάλισης της ασφάλειας των τροφίμων που βασίζεται στην ανάλυση

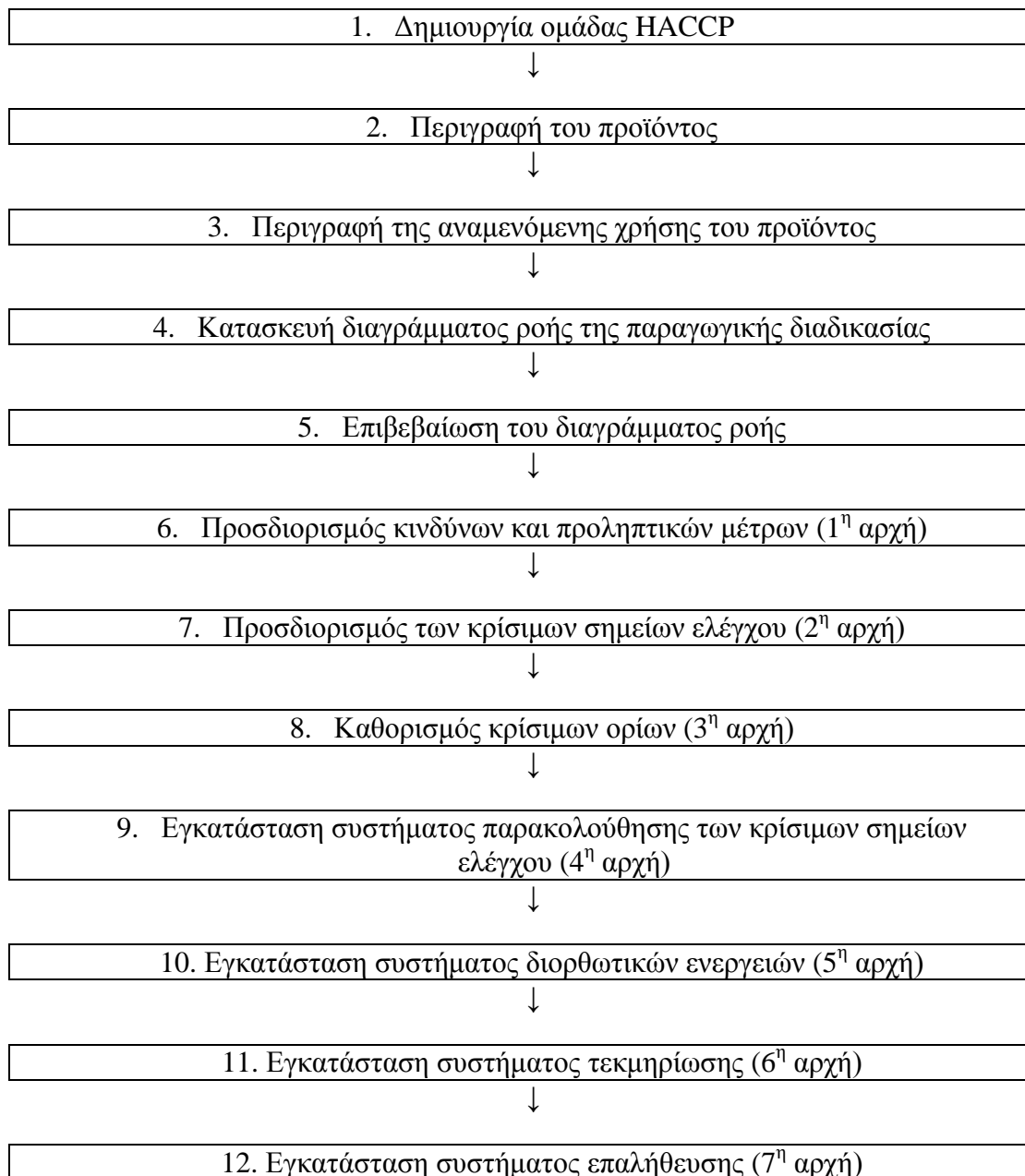
κινδύνων και τον προσδιορισμό των κρίσιμων σημείων ελέγχου. Το σύστημα HACCP, προκειμένου να εφαρμόζεται σε όλες τις περιπτώσεις και ιδίως σε μικρές επιχειρήσεις τροφίμων, προσαρμόζεται στη φύση, στο μέγεθος και στην δραστηριότητα κάθε επιχείρησης.

Το κυριότερο βήμα για να συστήσουμε τα ειδικά υγειονομικά μέτρα βάσει του HACCP είναι ο εντοπισμός των κινδύνων (βιολογικών, χημικών, φυσικών). Ακολουθεί ύστερα η εκτίμηση της σοβαρότητας τους για την υγεία του καταναλωτή και η συχνότητα της παρουσίας τους στα παραγόμενα προϊόντα της επιχείρησης. Η διαδικασία αυτή αποτελεί την ανάλυση κινδύνου, που είναι ουσιαστικά το αποτέλεσμα της εκτίμησης που θα μας οδηγήσει στην λήψη ή όχι ειδικών υγειονομικών μέτρων.

Το HACCP βασίζεται σε επτά (7) αρχές:

- 1) Προσδιορισμός και ανάλυση όλων των πιθανών κινδύνων που εμπεριέχονται σε ένα τρόφιμο και είναι δυνατό να προκαλέσουν βλάβη στην υγεία του καταναλωτή και καθορισμός των απαραίτητων προληπτικών μέτρων για τον έλεγχο τους.
- 2) Προσδιορισμός των κρίσιμων σημείων ελέγχου.
- 3) Καθιέρωση κρίσιμων ορίων για κάθε κρίσιμο σημείο ελέγχου και κριτηρίων με τα οποία εκτιμάται εάν και κατά πόσο αποτελεσματικά γίνεται ο έλεγχος ενός κρίσιμου σημείου ελέγχου.
- 4) Καθορισμός συστήματος παρακολούθησης των κρίσιμων σημείων ελέγχου.
- 5) Καθιέρωση των διορθωτικών ενεργειών για κάθε κρίσιμο σημείο ελέγχου.
- 6) Καθιέρωση διαδικασιών επαλήθευσης και επικύρωσης του συστήματος με σκοπό την αξιολόγηση της ορθής και αποτελεσματικής λειτουργίας του.
- 7) Καθιέρωση διαδικασιών καταγραφής και αρχειοθέτησης των δεδομένων και πληροφοριών κατά την λειτουργία του συστήματος με σκοπό την τεκμηρίωση του.

Αφού έχουν κατανοηθεί οι αρχές πάνω στις οποίες στηρίζεται το «στήσιμο» ενός σχεδίου HACCP, παρακάτω φαίνεται η πορεία που ακολουθείται για την ανάπτυξη ενός συστήματος HACCP.



Ακολουθώντας αυτά τα βήματα εφαρμόζεται σε μία επιχείρηση το σύστημα HACCP. Το HACCP μπορεί να εφαρμόζεται από την ομάδα σύστασης του HACCP σε μία μεγάλη επιχείρηση ή από τον υπεύθυνο της επιχείρησης σε μία επιχείρηση μικρότερης δυναμικότητας. Παρατηρούμε ότι κάθε αρχή του HACCP αποτελεί και ένα βήμα για την ανάπτυξη του σε μία επιχείρηση.

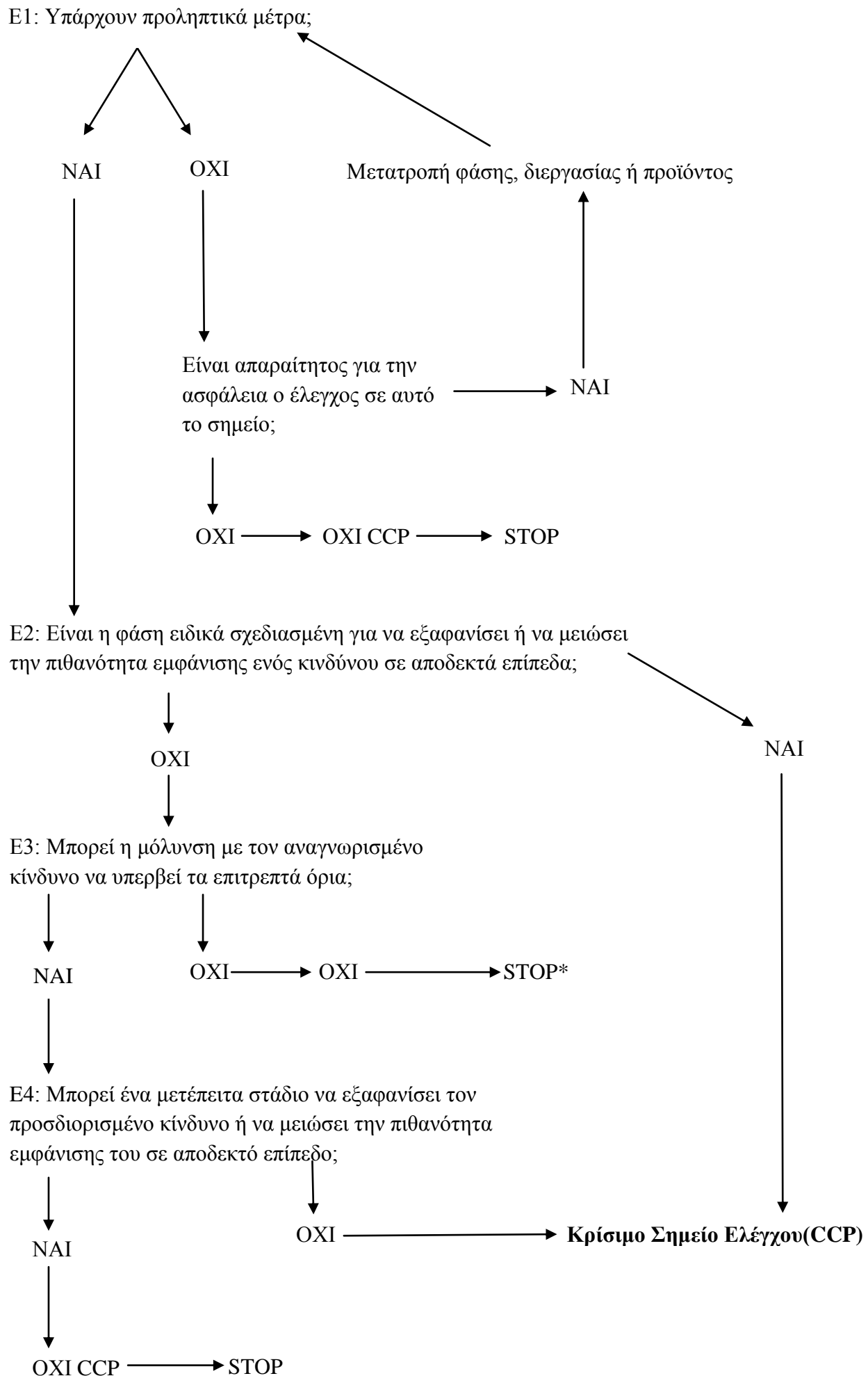
Ένα από τα σημαντικότερα στάδια κατά την δημιουργία ενός προγράμματος HACCP είναι η αναγνώριση των κρίσιμων σημείων ελέγχου (CCP's) κατά την γραμμή παραγωγής του προϊόντος. Ο προσδιορισμός των CCP's σε ένα σύστημα HACCP πραγματοποιείται με εφαρμογή του «διαγράμματος αποφάσεων» που προτείνεται από την NACMCF (1992) και αποτελεί μία ακολουθία ερωτήσεων για κάθε κίνδυνο που έχει αναγνωρισθεί. Η εφαρμογή του «διαγράμματος αποφάσεων»

πρέπει να γίνεται όταν ένα σημείο, μία διεργασία ή μία φάση λειτουργίας σχετίζεται με έναν αναγνωρισμένο κίνδυνο, προκειμένου να διαπιστωθεί εάν αποτελεί CCP. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται για όλες τις διεργασίες και όλους τους αναγνωρισμένους κινδύνους και εξασφαλίζει τον προσδιορισμό του ελάχιστου αριθμού CCP's που απαιτούνται για την παραγωγή ενός ασφαλούς προϊόντος. Η ελαχιστοποίηση του αριθμού των CCP's έχει ιδιαίτερη σημασία για την κατασκευή ενός σχεδίου HACCP, ώστε αυτό να μην είναι υπερβολικό περίπλοκο και δύσκολο στην αποτελεσματική εφαρμογή του, αλλά ταυτόχρονα να εξασφαλίζει την ασφάλεια του τροφίμου (Τζια, Τσιαπούρης, 1996). Στην εικόνα 7.1 βλέπουμε το διάγραμμα αποφάσεων που ακολουθείται για τον προσδιορισμό των CCP's

Μετά τον προσδιορισμό των CCP's και των κρίσιμων ορίων, πρέπει να καθιερωθούν τρόποι παρακολούθησης των CCP's για να διασφαλίζεται η ασφάλεια του προϊόντος, παρακολουθώντας τα CCP's ώστε να μην ξεπεραστούν τα κρίσιμα όρια που έχουν καθοριστεί. Η παρακολούθηση των CCP's μπορεί να γίνει είτε με παρατήρηση, είτε με μέτρηση. Η παρατήρηση παρέχει ποιοτικές ενδείξεις ενώ οι μετρήσεις ποσοτικά αποτελέσματα. Η εκλογή μεταξύ παρατήρησης και μέτρησης για την παρακολούθηση ενός CCP, βασίζεται στα καθορισμένα κρίσιμα όρια, στις διαθέσιμες μεθόδους, στο κόστος της μεθόδου και στο χρόνο που αυτή απαιτεί για την εξαγωγή αποτελεσμάτων. Οι κύριες κατηγορίες συστημάτων παρακολούθησης είναι πέντε (5):

- Παρατήρηση
 1. Οπτική παρακολούθηση
 2. Οργανοληπτική εκτίμηση
- Μέτρηση
 3. Φυσικές μετρήσεις
 4. Χημικές μετρήσεις
 5. Μικροβιολογικές αναλύσεις

Γενικά οι μικροβιακές αναλύσεις δεν προτιμούνται λόγω του μεγάλου χρόνου που απαιτείται για την λήψη των αποτελεσμάτων, αλλά και λόγω της συχνότητας και ποσότητας δειγμάτων για να έχουμε ακριβή αποτελέσματα. Οι μικροβιακές αναλύσεις βρίσκουν εφαρμογή όμως στην παρακολούθηση των κρίσιμων πρώτων υλών, πριν αυτές χρησιμοποιηθούν και στην παρακολούθηση κρίσιμων τελικών προϊόντων πριν αυτά διατεθούν για κατανάλωση (δεν υπάρχει δυνατότητα λήψης έγκαιρων μέτρων). Άλλη εφαρμογή των μικροβιακών αναλύσεων είναι η παρακολούθηση των κρίσιμων ορίων που σχετίζονται με την υγιεινή των μηχανημάτων και της εγκατάστασης. Στην περίπτωση αυτή χρησιμοποιούνται ταχείες αναλύσεις και πρότυπες μέθοδοι, με σκοπό τον προσδιορισμό της αποτελεσματικότητας της υγιεινής και όχι της ακριβούς ποσότητας των μικροοργανισμών.



*Προχώρησε στον επόμενο κίνδυνο για το στάδιο που περιγράφεται

Εικόνα 7.1 Διάγραμμα αποφάσεων για CCP's

Για την παρακολούθηση ενός CCP με βάση μία μικροβιολογική ανάλυση πρέπει πρώτα να πραγματοποιηθούν τα εξής πέντε (5) βήματα:

1. Καθορισμός του τροφίμου και του συστατικού του
2. Προσδιορισμός του τύπου μόλυνσης που ενδιαφέρει, δηλαδή το είδος του μικροοργανισμού και/ή της τοξίνης που παράγει
3. Προσδιορισμός της αναλυτικής μεθόδου που θα χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση ή την ποσοτική μέτρηση του κινδύνου
4. Προσδιορισμός του σχεδίου δειγματοληψίας
5. Καθορισμός του κατάλληλου μικροβιολογικού ορίου (π.χ. συγκέντρωση μικροοργανισμών) σε σχέση με το τρόφιμο και το επιλεγμένο σχέδιο δειγματοληψίας

Η Διεθνής Επιτροπή για τις Μικροβιολογικές Προδιαγραφές των Τροφίμων (ICMSF, 1986) παρουσιάζει σε έναν συνολικό πίνακα (βλ. Πίνακα 7.1) τον τύπο και τη συχνότητα του σχεδίου δειγματοληψίας σε σχέση με τους πιθανούς κινδύνους υγείας του τροφίμου και τις συνθήκες στις οποίες το τρόφιμο κανονικά βρίσκεται και καταναλώνεται μετά τη δειγματοληψία. Τα σχέδια δειγματοληψίας που προτείνει η ICMSF διακρίνονται σε δύο κύριες κατηγορίες:

- Σχέδια δειγματοληψίας με χαρακτηριστικά 2^{ης} τάξης (Two-Class Attributes Sampling Plans), όπου κατατάσσεται κάθε δείγμα που εξετάζεται σε αποδεκτό ή μη αποδεκτό με **n** τον αριθμό δειγμάτων ανά παρτίδα προϊόντος, **c** είναι ο μέγιστος επιτρεπτός αριθμός δειγμάτων με μη ικανοποιητικά αποτελέσματα και **m** το μικροβιολογικό όριο
- Σχέδια δειγματοληψίας με χαρακτηριστικά 3^{ης} τάξης (Three-Class Attributes Sampling Plans), όπου κατατάσσεται κάθε δείγμα που εξετάζεται σε αποδεκτό, οριακά αποδεκτό ή μη αποδεκτό με **n** τον αριθμό δειγμάτων ανά παρτίδα προϊόντος, **c** είναι ο μέγιστος επιτρεπτός αριθμός δειγμάτων με μη ικανοποιητικά αποτελέσματα, **m** το οριακά αποδεκτό μικροβιολογικό όριο και **M** το μη αποδεκτό μικροβιολογικό όριο

Πίνακας 7.1 Προτεινόμενα σχέδια δειγματοληψίας (σύμφωνα με την ICMSF) για διάφορους συνδυασμούς μεταξύ σοβαρότητας κινδύνου και συνθηκών χρήσης του τροφίμου

	Συνθήκες υπό τις οποίες αναμένεται να χρησιμοποιηθεί το τρόφιμο μετά τη δειγματοληψία*		
Βαθμός ανησυχίας σε σχέση με τη χρήση και τους κινδύνους	Συνθήκες που μειώνουν το βαθμό ανησυχίας	Συνθήκες που δεν επιφέρουν αλλαγή στο βαθμό ανησυχίας	Συνθήκες που αυξάνουν το βαθμό ανησυχίας
Κανένας άμεσος κίνδυνος για την υγεία	Κατηγορία 1 ^η 3 ^η τάξη n=5, c=3	Κατηγορία 2 ^η 3 ^η τάξη n=5, c=2	Κατηγορία 3 ^η 3 ^η τάξη n=5, c=1
Κίνδυνος για την υγεία Μικρός, έμμεσος	Κατηγορία 4 ^η 3 ^η τάξη n=5, c=3	Κατηγορία 5 ^η 3 ^η τάξη n=5, c=2	Κατηγορία 6 ^η 3 ^η τάξη n=5, c=1
Κίνδυνος για την υγεία Μέτριος, άμεσος με μικρή πιθανότητα εξάπλωσης	Κατηγορία 7 ^η 3 ^η τάξη n=5, c=2	Κατηγορία 8 ^η 3 ^η τάξη n=5, c=1	Κατηγορία 9 ^η 3 ^η τάξη n=10, c=1
Κίνδυνος για την υγεία Μέτριος, άμεσος, με μεγάλη πιθανότητα για εκτεταμένη εξάπλωση (επιδημία)	Κατηγορία 10 ^η 2 ^η τάξη n=5, c=0	Κατηγορία 11 ^η 2 ^η τάξη n=10, c=0	Κατηγορία 12 ^η 2 ^η τάξη n=20, c=0
Κίνδυνος για την δημόσια υγεία Σοβαρός, άμεσος	Κατηγορία 13 ^η 2 ^η τάξη n=15, c=0	Κατηγορία 14 ^η 2 ^η τάξη n=30, c=0	Κατηγορία 15 ^η 2 ^η τάξη n=60, c=0

*Για ευαίσθητα τρόφιμα που προορίζονται για κατανάλωση από πληθυσμούς υψηλής επικινδυνότητας απαιτούνται πιο αυστηρά σχέδια δειγματοληψίας

Βέβαια παρόλο τον μεγάλο αριθμό εξεταζόμενων δειγμάτων μπορεί να μην ανιχνευθεί κάποιο σοβαρό πρόβλημα μόλυνσης. Η περίπτωση αυτή εμφανίζεται, όταν το ποσοστό των ελαττωματικών μονάδων του προϊόντος είναι κάτω από 10%. Στους πίνακες 7.2 και 7.3 βλέπουμε την πιθανότητα αποδοχής μιας παρτίδας προϊόντος για ορισμένο ποσοστό ελαττωματικών μονάδων.

Πίνακας 7.2: Σχέδια δειγματοληψίας 3^{ης} τάξης: πιθανότητα αποδοχής μιας παρτίδας προϊόντος για ορισμένο ποσοστό ελαττωματικών μονάδων

Κατηγορία	Σχέδιο δειγματοληψίας	Ποσοστό ελαττωματικών μονάδων			
		0,1%	1%	5%	10%
1	n=5, c=3	0.999	0.999	0.999	0.999
2	n=5, c=2	0.999	0.999	0.998	0.991
3	n=5, c=1	0.999	0.999	0.977	0.919
4	n=5, c=3	0.999	0.999	0.999	0.999
5	n=5, c=2	0.999	0.999	0.998	0.991
6	n=5, c=1	0.999	0.998	0.977	0.919
7	n=5, c=2	0.999	0.999	0.998	0.991
8	n=5, c=1	0.999	0.998	0.977	0.919
9	n=10, c=1	0.999	0.995	0.904	0.726

Πίνακας 7.3: Σχέδια δειγματοληψίας 2^{ης} τάξης: πιθανότητα αποδοχής μιας παρτίδας προϊόντος για ορισμένο ποσοστό ελαττωματικών μονάδων

Κατηγορία	Σχέδιο δειγματοληψίας	Ποσοστό ελαττωματικών μονάδων			
		0,1%	1%	5%	10%
10	n=5, c=0	0,995	0,991	0,774	0,590
11	n=10, c=0	0,990	0,904	0,599	0,348
12	n=20, c=0	0,980	0,812	0,358	0,123
13	n=15, c=0	0,985	0,860	0,463	0,206
14	n=30, c=0	0,970	0,740	0,215	0,042
15	n=60, c=0	0,942	0,547	0,046	0,002

Τέλος οι σημαντικότερες «ταχείες» αναλυτικές μέθοδοι ανίχνευσης και ποσοτικού προσδιορισμού των μικροοργανισμών και των τοξινών τους που εφαρμόζονται κατά τη μικροβιολογική παρακολούθηση είναι:

- Η μέθοδος προσδιορισμού με βάση τη μεταβολή των ηλεκτρικών φυσικών σταθερών ενός θρεπτικού μέσου, λόγω παρουσίας των μικροοργανισμών
- Η μέθοδος προσδιορισμού με βάση τη συγκέντρωση του ATP
- Η μέθοδος προσδιορισμού με βάση την ανίχνευση νουκλεϊκών οξέων (DNA, RNA)
- Ράδιο-ανοσολογικές μέθοδοι ή ενζυμικοί άνοσο-προσδιορισμοί με μονοκλωνικά ή πολυκλωνικά αντισώματα για τον προσδιορισμό των τοξινών

Στην περίπτωση που κάποιο CCP βρεθεί εκτός ορίων (όπως θα προκύψει από κάποια διαδικασία παρατήρησης) θα πρέπει να ληφθούν αμέσως μέτρα (διορθωτικές

ενέργειες) για την αντιμετώπιση του προβλήματος που ευθύνεται για αυτή την αλλαγή. Οι διορθωτικές ενέργειες που πρέπει να πραγματοποιούνται είναι:

- Σταμάτημα της διεργασίας, εάν αυτό κρίνεται απαραίτητο
- Τοποθέτηση όλου του «ύποπτου» προϊόντος σε «θέση αναμονής»
- Γρήγορη διόρθωση, ώστε η μετέπειτα παραγωγή να είναι ασφαλής και να μην εμφανιστούν και άλλες αποκλίσεις
- Αναγνώριση και διόρθωση της βασικής αιτίας του προβλήματος, ώστε να μην εμφανιστούν μελλοντικά αποκλίσεις από τα κρίσιμα όρια
- Διόρθωση «ύποπτου» προϊόντος
- Καταγραφή σε αρχεία του προβλήματος και των διορθωτικών ενεργειών που πραγματοποιούνται
- Επανεξέταση και βελτίωση του σχεδίου HACCP, εάν αυτό κρίνεται απαραίτητο

Οι διορθωτικές ενέργειες θα πρέπει να καθορίζονται κατά την ανάπτυξη του σχεδίου HACCP για τις πιο σημαντικές αποκλίσεις για κάθε CCP χωριστά, λόγω της μεγάλης ποικιλίας CCP's για τα διάφορα τρόφιμα.

Το είδος των διορθωτικών ενεργειών εξαρτάται από τη σοβαρότητα και την επικινδυνότητα του κινδύνου, σύμφωνα με τις οδηγίες του FDA. Ο FDA διακρίνει την επικινδυνότητα σε τρία (3) επίπεδα: υψηλή επικινδυνότητα, μέτρια επικινδυνότητα και χαμηλή επικινδυνότητα. Στον Πίνακα 7.4 φαίνονται οι διορθωτικές ενέργειες που εφαρμόζονται ανάλογα με τον βαθμό επικινδυνότητας.

Πίνακας 7.4: Προτεινόμενες από τον FDA διορθωτικές ενέργειες ανάλογα με την επικινδυνότητα

Επίπεδο επικινδυνότητας	Διορθωτική ενέργεια
Υψηλή επικινδυνότητα	Κανένα προϊόν δεν πρέπει να παραχθεί, μέχρι να διορθωθεί το πρόβλημα. Το «ύποπτο» προϊόν πρέπει να τοποθετείται σε «κατάσταση αναμονής» και να αναλύεται.
Μέτρια επικινδυνότητα	Το προϊόν επιτρέπεται να παραχθεί, αλλά το πρόβλημα πρέπει να διορθωθεί μέσα σε σύντομο χρονικό διάστημα (π.χ. λίγες μέρες ή εβδομάδες). Απαιτείται επιπρόσθετη παρακολούθηση μέχρι να πραγματοποιηθεί η διόρθωση.
Χαμηλή επικινδυνότητα	Το προϊόν συνεχίζει να παράγεται. Τα προβλήματα πρέπει να διορθώνονται, όταν το επιτρέπει το πρόγραμμα της παραγωγής. Πρέπει να πραγματοποιούνται συχνοί έλεγχοι για να εξασφαλιστεί ότι το επίπεδο της επικινδυνότητας δεν έχει μεταβληθεί σε μέτριο ή υψηλό.

Στην συνέχεια αφού ληφθούν τα απαραίτητα μέτρα, σε περίπτωση που το «ύποπτο» προϊόν έχει δεσμευθεί υπόκειται σε διορθωτικές ενέργειες. Υπάρχουν πέντε επιλογές για την μετέπειτα πορεία του «ύποπτου» προϊόντος.

1. Η πρώτη επιλογή είναι η προώθηση του προϊόντος, χωρίς όμως να αποτελεί την καλύτερη επιλογή, αφού τίθεται θέμα ασφάλειας του τροφίμου.
2. Η δεύτερη επιλογή είναι η ανάλυση του προϊόντος, ώστε να διαπιστωθεί, εάν αυτό είναι ασφαλές για να προωθηθεί. Η εξέταση της καταλληλότητας ή μη του «ύποπτου» προϊόντος πρέπει να γίνεται με τη χρησιμοποίηση των κατάλληλων σχεδίων δειγματοληψίας, όπως αναφέρονται παραπάνω στον πίνακα 7.1. Τα στατιστικά σχέδια δειγματοληψίας καθορίζουν τον απαραίτητο αριθμό δειγμάτων που πρέπει να αναλυθούν για να εξασφαλιστεί με μεγάλη πιθανότητα η ασφάλεια του προϊόντος.
3. Η τρίτη επιλογή είναι η διοχέτευση του προϊόντος σε μία διεργασία, στην οποία η χρήση του να είναι ασφαλής. Για παράδειγμα, αυγά ή μαγειρεμένο κοτόπουλο που έχουν μολυνθεί με σαλμονέλα δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται από έναν παραγωγό ως συστατικά για την παρασκευή ενός σαλατικού προϊόντος. Παρόλα αυτά, είναι πιθανά αποδεκτή η χρήση των υλικών αυτών προκειμένου να χρησιμοποιηθούν για την παρασκευή ενός κονσερβοποιημένου προϊόντος ή άλλου προϊόντος, του οποίου η παραγωγική διαδικασία περιλαμβάνει ένα ικανοποιητικό στάδιο καταστροφής της σαλμονέλας.
4. Η τέταρτη επιλογή είναι η εκ νέου επεξεργασία του «ύποπτου» προϊόντος.
5. Η τελευταία επιλογή είναι το κάψιμο, το θάψιμο και γενικά η καταστροφή του προϊόντος.

Η τελική απόφαση για την πορεία του «ύποπτου» προϊόντος, καθορίζεται από διάφορους παράγοντες. Οι κυριότεροι από αυτούς είναι:

- η σοβαρότητα του κινδύνου
- η επικινδυνότητα (πιθανότητα εμφάνισης) του κινδύνου
- ο τρόπος με τον οποίο θα αποθηκευθεί, θα διανεμηθεί και θα προετοιμαστεί το τρόφιμο
- ποιος θα επεξεργασθεί εκ νέου το τρόφιμο
- ποιος θα καταναλώσει το τρόφιμο

7.2.1 Αξιολόγηση των ληφθέντων δειγμάτων τυρογάλακτος με το σύστημα HACCP - εφαρμογή HACCP σε μία επιχείρηση γαλακτοκομικών προϊόντων

Το γάλα και όλα τα γαλακτοκομικά προϊόντα είναι ένα προϊόν με το οποίο έρχονται σε επαφή άτομα από όλες τις ηλικίες, από βρέφη μέχρι άτομα τρίτης ηλικίας. Μπορεί να γίνει αντιληπτό ότι μέσα στα άτομα που θα καταναλώσουν αυτά

τα προϊόντα μπορεί να ανήκουν και άτομα από ομάδες υψηλού κινδύνου που χρίζουν ιδιαίτερης προσοχής ως προς τα προϊόντα που καταναλώνουν. Συνεπώς η ασφαλείς επεξεργασία, παραγωγή και διανομή των προϊόντων γάλακτος κρίνεται αναγκαία και άκρως απαραίτητη. Η υιοθέτηση ενός συστήματος HACCP πετυχαίνει τον στόχο αυτό μέχρι ενός σημείου μέσω των αρχών που το διέπουν.

Σε γενικές γραμμές κατά την γραμμή παραγωγής των γαλακτοκομικών προϊόντων υπεισέρχονται πολλοί παράγοντες κινδύνου μέχρι την τελική διάθεση του προϊόντος στην αγορά, οι οποίοι μπορούν να έχουν σοβαρές επιπτώσεις στο τελικό προϊόν και ως προς την υγεία του καταναλωτή.

Αρχικά, η συλλογή γάλακτος από μεγάλο αριθμό μονάδων καθιστά δύσκολη την διατήρηση ικανοποιητικής μικροβιολογικής ποιότητας στο νωπό γάλα, για το λόγο αυτό η παραγωγή, το άρμεγμα και η μεταφορά του γάλακτος πρέπει να γίνεται υπό άριστες συνθήκες υγιεινής για την αποφυγή επιμολύνσεων του. Από τους πιο σημαντικούς παράγοντες στις βιομηχανίες γάλακτος είναι η σωστή θερμοκρασία του γάλακτος. Το γάλα πρέπει να ψύχεται σε θερμοκρασία $\leq 6^{\circ}\text{C}$ για να αποτρέπεται ο πολλαπλασιασμός της πλειονότητας των παθογόνων βακτηρίων (π.χ. κωλοβακτηριοειδών και *S. aureus*). Για το λόγο αυτό το γάλα πρέπει να συντηρείται υπό ψύξη, αλλά και να μεταποιείται το συντομότερο μετά το άρμεγμα και μεταφορά του στην γαλακτοκομική εγκατάσταση. Βέβαια κάποια παθογόνα βακτήρια, όπως η *L. monocytogenes*, μπορούν έστω και αργά να πολλαπλασιάζονται σε θερμοκρασίες ψύξης. Άλλα ψυχρότροφα βακτήρια που πολλαπλασιάζονται αργά σε γάλα θερμοκρασίας $2-7^{\circ}\text{C}$ υποβαθμίζουν την ποιότητα του γάλακτος καθώς παράγουν ένζυμα που μειώνουν τις αποδόσεις της τυροκόμησης. Επιπλέον η παρουσία αντιβιοτικών στο γάλα δυσχεραίνει την παραγωγή του γιαουρτιού και διαταράσσει την εξέλιξη της ωρίμανσης των τυριών, γεγονός που οδηγεί στην ποιοτική υποβάθμιση τους, την καταστροφή του προϊόντος, μέχρι και την ανάπτυξη επικίνδυνων για τον άνθρωπο μικροοργανισμών. Συνεπώς ο έλεγχος της παρουσίας υπολειμμάτων αντιβιοτικών στο νωπό γάλα με προσδιορισμένη συχνότητα αποτελεί νομοθετική υποχρέωση του υπεύθυνου της γαλακτοκομικής μονάδας. Τέλος οι περιβαλλοντικοί ρυπαντές ασκούν χρόνια τοξική δράση στα παραγωγικά ζώα και κατ' επέκταση επιμολύνουν τα παραγόμενα από αυτά προϊόντα (π.χ. κρέας, γάλα), οπότε τα βοοειδή και αιγοπρόβατα πρέπει να διατρέφονται με ελεγχόμενες ζωοτροφές και να μην βόσκουν σε βιομηχανικές περιοχές ή σε περιοχές που υπάρχει κίνδυνος αυξημένης μόλυνσης του περιβάλλοντος.

7.2.1.2 Τυροκομικά προϊόντα

Στην παρούσα διπλωματική εργασία θα γίνει αναφορά μόνο στα προϊόντα τυρογάλακτος (π.χ. μυζήθρα), τα οποία αποτελούν και μέρος των δειγμάτων που

ελήφθησαν κατά την εκπόνηση της εργασίας. Για την δημιουργία ενός συστήματος HACCP, όπως αναφέρθηκε παραπάνω χρειάζεται να γίνει κατασκευή του διαγράμματος ροής. Κάθε ένα γαλακτοκομικό προϊόν μπορεί να χρειάζεται διαφορετικό HACCP και αυτό γιατί δέχεται διαφορετική επεξεργασία, για παράδειγμα οι διεργασίες που δέχεται η μυζήθρα για την παραγωγή της διαφέρουν σε κάποια στάδια από τις διεργασίες που χρειάζονται για την παραγωγή γιαουρτιού.

Κατά την παραγωγή τυριών δρουν διάφοροι βιολογικοί παράγοντες κινδύνου οι οποίοι ευθύνονται για τις τροφικές δηλητηριάσεις από τυροκομικά προϊόντα. Τα σκληρά τυριά που παράγονται στην χώρα μας καθώς και τα τυριά άλμης ως προϊόντα ζύμωσης με χαμηλό pH και σημαντικά επίπεδα αλατιού, σε σχέση με πολλά άλλα τυριά, έχουν ισχυρούς μηχανισμούς εξυγίανσης, κατά την ωρίμανση τους, από παθογόνα βακτήρια. Η παρουσία όμως παθογόνων μικροοργανισμών στο γάλα που τυροκομείται ή και τοξινών μπορεί να προκαλέσει ασθένεια (ή και σπανιότερα θάνατο) σε καταναλωτές. Προβλήματα στην υγεία του καταναλωτή προκαλούνται από τα τοξινογόνα βακτήρια, όπως ο *S. aureus*, αν υπάρχουν σε μεγάλους αριθμούς, αλλά και από μικρό πληθυσμό παθογόνων βακτηρίων, όπως οι σαλμονέλες και η *L. monocytogenes*, εάν το τυρί είναι μολυσμένο. Εδώ πρέπει να σημειωθεί ότι, η εντεροτοξίνη του *S. aureus* εάν προϋπάρχει ή παραχθεί στα πρώτα στάδια της τυροκόμησης, παραμένει σταθερή κατά την ωρίμανση και την συντήρηση του τυριού.

Οι εντεροτοξινογόνοι σταφυλόκοκκοι είναι σε θέση να πολλαπλασιαστούν και να παράγουν εντεροτοξίνες κατά το αρχικό στάδιο της παραγωγής, όταν η τιμή του pH του τυροπήγματος είναι ακόμα υψηλή και δεν έχει δράσει πλήρως η καλλιέργεια (τα ανταγωνιστικά οξυγαλακτικά βακτήρια της καλλιέργειας βρίσκονται σε χαμηλά επίπεδα).

Για την αποφυγή των παραπάνω κινδύνων η παστερίωση του γάλακτος επιβάλλεται για την προάσπιση της δημόσιας υγείας καθώς θανατώνει τους παθογόνους μικροοργανισμούς που τυχόν υπάρχουν στο γάλα (πλην των σπόρων, της εντεροτοξίνης του *S. aureus*, των μυκοτοξινών και του *Mycobacterium paratuberculosis*). Επίσης η παστερίωση εφαρμόζεται και για την ορθή πορεία της περαιτέρω επεξεργασίας, καθώς μειώνει σημαντικά την κοινή μικροβιακή χλωρίδα του γάλακτος. Όσο για την αποφυγή ύπαρξης εντεροτοξίνης από *S. aureus* απαιτείται προσοχή ώστε να αποφεύγεται η επιμόλυνση του γάλακτος και του τυροπήγματος με την τήρηση αυστηρών υγειονομικών μέτρων στην εγκατάσταση, την τήρηση κανόνων ατομικής υγιεινής από το προσωπικό και την ύπαρξη κατάλληλης θερμοκρασίας στον χώρο παραγωγής.

7.2.1.3 HACCP προϊόντων τυρογάλακτος

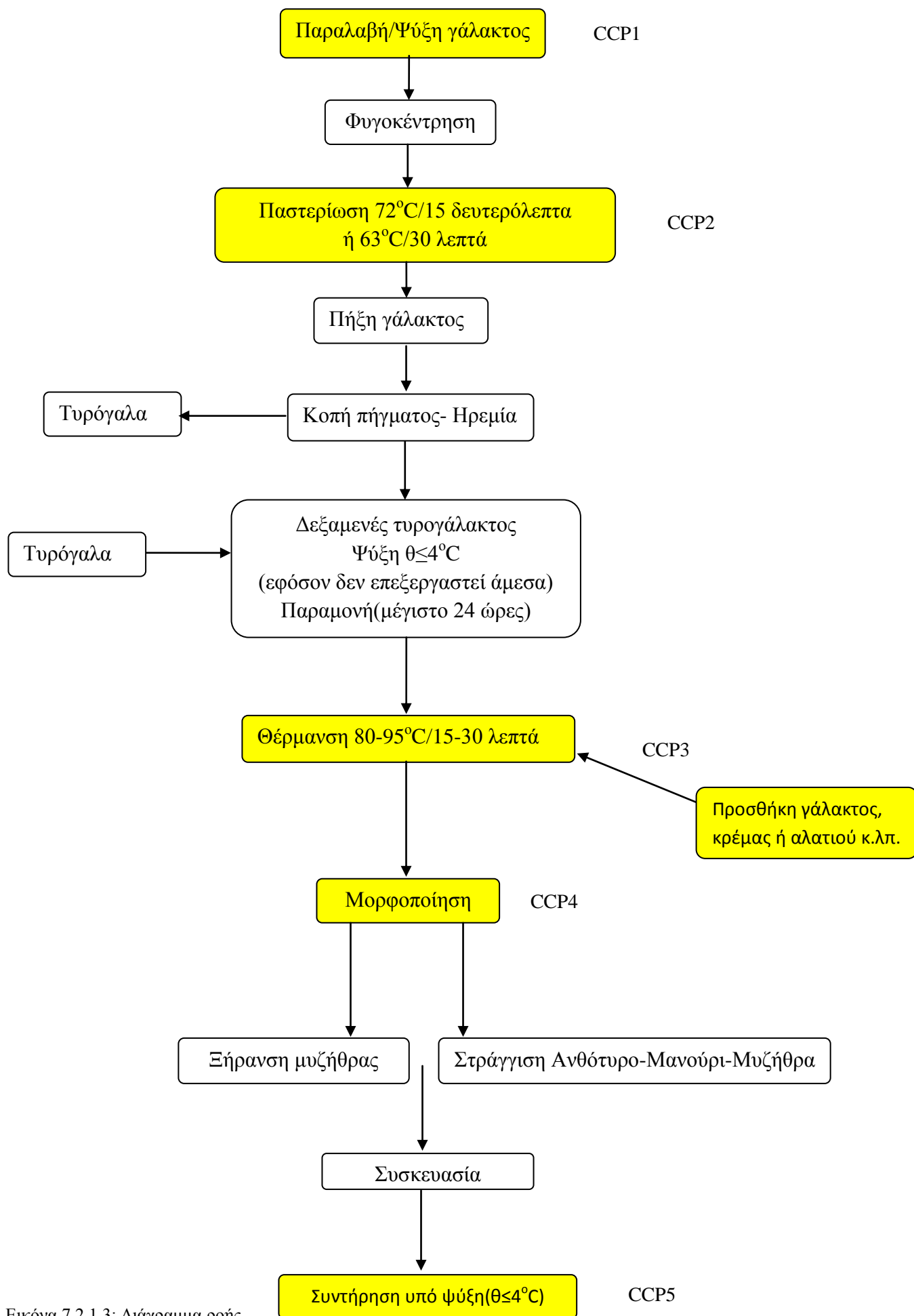
Κατά την δημιουργία ενός συστήματος HACCP πρώτο βήμα είναι η περιγραφή του προϊόντος. Ένας τυπικός πίνακας περιγραφής προϊόντων τυρογάλακτος είναι ο πίνακας 7.2.1.3 που παρατίθεται.

Πίνακας 7.2.1.3. Περιγραφή προϊόντος

Όνομα	Μυζήθρα, ανθότυρο, μανούρι		
Σύνθεση	Αιγοπρόβειο ή αγελαδινό (μυζήθρα) τυρόγαλα, αιγοπρόβειο ή αγελαδινό γάλα (πρόσγαλα) ή/και προσθήκη κρέμας, αλάτι		
Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά	Μυζήθρα	Ανθότυρο	Μανούρι
Ενέργεια	366 kcal/100g	191 kcal/100g	374 kcal/100g
Πρωτεΐνες	20%	11%	10,5%
Λίπος	30%	19,5%	36%
Υγρασία (μέγιστη)	50%	70%	60%
NaCl (μέγιστη)	1,2%	1,2%	1,4%
Ελάχιστη λιποπεριεκτικότητα επί ξηρού	70%	70%	70%
Συσκευασία	Ανάλογα με τον τύπο του τυριού χρησιμοποιείται αεροστεγής συσκευασία των 200g, 1, 1,5, 2kg		
Συνθήκες συντήρησης	Διατηρείται σε ψύξη($\theta \leq 4^{\circ}\text{C}$)		
Συνθήκες διανομής	Υπό ψύξη ($\theta \leq 4^{\circ}\text{C}$)		
Συνθήκες χρήσης	Τα τυριά τυρογάλακτος αποτελούν συνοδευτικό γεύματος και μέρος συνταγής μαγειρικής		
Χρόνος ζωής του προϊόντος	Μυζήθρα	Ανθότυρο	Μανούρι
	Ένα έτος	30 ημέρες	90 ημέρες

Επόμενο βήμα είναι η δημιουργία του διαγράμματος ροής για την παραγωγή των προϊόντων τυρογάλακτος. Το διάγραμμα ροής φαίνεται στην εικόνα 7.2.1.3.

Το πρώτο κρίσιμο σημείο κατά την παραγωγή προϊόντων τυρογάλακτος, όπως φαίνεται και στο διάγραμμα ροής είναι η παραλαβή του γάλακτος. Στο στάδια της παραλαβής περιλαμβάνεται η παραλαβή του νωπού γάλακτος από βυτία ή γαλακτοδοχεία και η αποθήκευση του γάλακτος σε δεξαμενές ψύξης. Όσων αφορά το στάδιο της παραλαβής του νωπού γάλακτος υπάρχουν κάποια στάδια που πραγματοποιούνται μέχρι την εισαγωγή του στις μονάδες παραγωγής. Αρχικά πραγματοποιείται οπτικός έλεγχος από κάποιον υπεύθυνο για την ύπαρξη τυχόν εμφανών αλλοιώσεων, δηλαδή των οργανοληπτικών ιδιοτήτων (οσμή, χρώμα, πτητικότητα), την ύπαρξη ξένων σωμάτων και την θερμοκρασία του γάλακτος κατά την παραλαβή.



Η θερμοκρασία του γάλακτος πρέπει να είναι μέχρι 10°C, εφόσον το γάλα δεν υποβάλλεται για επεξεργασία μέσα σε διάστημα 2 ωρών από το άρμεγμα. Στην συνέχεια το γάλα οδηγείται στον εργαστηριακό έλεγχο. Κατά τον εργαστηριακό έλεγχο ο υπεύθυνος ελέγχει με δικά του μέσα ή με την υποστήριξη εξωτερικού εργαστηρίου:

- το συνολικό αριθμό μικροβίων
- την αρίθμηση σωματικών κυττάρων (σε αγελαδινό γάλα μόνο)
- την πιθανή παρουσία αντιβιοτικών
- το είδος του γάλακτος
- τη λιποπεριεκτικότητα του γάλακτος
- το pH του γάλακτος

Τέλος κατά την τήρηση των κανόνων υγιεινής κατά την παραλαβή ελέγχεται ο καλός καθαρισμός του εξοπλισμού μεταφοράς του γάλακτος, των εργαλείων και γενικά του χώρου παραλαβής.

Εν συνεχεία το γάλα αποθηκεύεται σε δεξαμενές ψύξης σε θερμοκρασία $\leq 6^{\circ}\text{C}$, εφόσον η επεξεργασία του γάλακτος δεν αρχίζει αμέσως μετά το άρμεγμα ή μέσα σε 4 ώρες από την παραλαβή του στην εγκατάσταση. Κατά την αποθήκευση του γάλακτος υπάρχει κίνδυνος επιμόλυνσης από μη καλό καθαρισμό των δεξαμενών και εργαλείων, καθώς και κίνδυνος πολλαπλασιασμού επικίνδυνων μικροοργανισμών από μη ορθή θερμοκρασία συντήρησης. Συνεπώς ο υπεύθυνος θα πρέπει να ελέγχει την θερμοκρασία αποθήκευσης και τον καλό καθαρισμό και απολύμανση των δεξαμενών αποθήκευσης.

Επόμενο κρίσιμο σημείο αποτελεί η παστερίωση. Η παστερίωση του γάλακτος σύμφωνα με την ισχύουσα νομοθεσία γίνεται στον παστεριωτήρα στους 72°C τουλάχιστον για 15 δευτερόλεπτα (συνήθως κλειστού τύπου παστερίωση) ή στους 63°C τουλάχιστον για 30 λεπτά (συνήθως ανοικτού τύπου παστερίωση) ή σε οποιονδήποτε άλλο συνδυασμό θερμοκρασίας και χρόνου δίνει το αντίστοιχο αποτέλεσμα. Η διεργασία της παστερίωσης ελέγχεται με τη συνεχή παρακολούθηση της θερμοκρασίας του γάλακτος ώστε να φθάσει στην απαιτούμενη τιμή, καθώς και του χρόνου παραμονής σε αυτή τη θερμοκρασία. Επιπλέον ελέγχεται με την δοκιμή της αλκαλικής φωσφατάσης, το αποτέλεσμα της οποίας πρέπει να είναι αρνητικό. Η παστερίωση είναι η πιο σημαντική διεργασία για την ασφάλεια των γαλακτοκομικών προϊόντων. Εδώ θανατώνονται τα επικίνδυνα για την δημόσια υγεία βακτήρια, που πιθανόν να υπάρχουν στο γάλα και μειώνεται ο αριθμός των μικροβίων (ο μικρός αριθμός των κοινών βακτηρίων που πιθανόν να επιβιώνει κατά την παστερίωση, ελέγχεται στη συνέχεια με την προσθήκη της οξυγαλακτικής καλλιέργειας). Η επιβίωση ή ανάπτυξη επικίνδυνων βακτηρίων για την δημόσια υγεία και την αλλοίωση των τυριών συμβαίνει όταν δεν επιτυγχάνεται η κατάλληλη θερμοκρασία ή ο κατάλληλος χρόνος παστερίωσης και όταν γίνεται ανάμειξη παστεριωμένου

γάλακτος με νωπό ή ανεπαρκώς παστεριωμένο. Μετά το πέρας της παστερίωσης το γάλα ψύχεται σε θερμοκρασία 32°C. Ο υπεύθυνος πέρα από την πραγματοποίηση των ελέγχων που αναφέρθηκαν παραπάνω, θα πρέπει να φροντίζει να καθαρίζονται και να απολυμαίνονται όλες οι δεξαμενές και ο εξοπλισμός μετά το τέλος της διαδικασίας, καθώς και να ελέγχει τον εξοπλισμό για υπολείμματα καθαριστικών και απολυμαντικών, ώστε να μην υπάρξει χημική επιμόλυνση στην επόμενη παρτίδα.

Τρίτο και επίσης πολύ σημαντικό κρίσιμο σημείο είναι η περαιτέρω θέρμανση στους 80-95°C για 15-20 λεπτά και η προσθήκη προσθέτων. Στο στάδιο αυτό γίνεται η επεξεργασία του πηγματος. Όταν η θερμοκρασία υπερβεί τους 60°C προστίθενται ανάλογα με την περίπτωση, δηλαδή το είδος τυριού του παράγεται, γάλα, κρέμα, αλάτι ή άλλα πρόσθετα. Λόγω της ισχυρής θερμικής επεξεργασίας εξυγιαίνεται το προϊόν από τα παθογόνα βακτήρια, χωρίς να καταστρέφονται όμως οι θερμοάντοχοι σπόροι των σπορογόνων βακτηρίων καθώς και οι τοξίνες τους. Σε αυτό το στάδιο ο υπεύθυνος πρέπει να ελέγχει όπως και στην παστερίωση την θερμοκρασία και τον χρόνο παραμονής του προϊόντος στην απαιτούμενη θερμοκρασία, αλλά επιπλέον να φροντίζει για την ορθή πρακτική υγιεινής κατά την προσθήκη των πρόσθετων συστατικών για την αποτροπή επιμόλυνσης του τυρογάλακτος. Επιπλέον θα πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή στην ποσότητα των προσθέτων που προστίθεται καθώς δεν μπορεί να ελεγχθεί σε παρακάτω διεργασία ούτε να ληφθεί κάποια διορθωτική ενέργεια.

Τέταρτο κρίσιμο σημείο στην γραμμή παραγωγής προϊόντων τυρογάλακτος αποτελεί η μορφοποίηση. Αν και θα μπορούσε να θεωρηθεί διεργασία χαμηλής επικινδυνότητας, αντίθετα το στάδιο της μορφοποίησης των τυριών τυρογάλακτος χαρακτηρίζεται ως το πιο επικίνδυνο από άποψη ασφαλείας, γιατί τα παραγόμενα προϊόντα αν επιμολυνθούν δεν ακολουθεί άλλη διαδικασία για την απολύμανση τους. Για τον λόγο αυτό ο υπεύθυνος πρέπει να ελέγχει αυστηρά την εφαρμογή αυστηρών μέτρων υγιεινής πρακτικής. Φροντίζει για την αποφυγή επιμολύνσεων από το περιβάλλον, την ύπαρξη τρωκτικών και εντόμων, τον καλό καθαρισμό του χώρου εργασίας, των πάγκων εργασίας, των σκευών, του ξηραντήρα κ.λπ. Επιπλέον ελέγχει την θερμοκρασία του χώρου και την καταλληλότητα των υλικών συσκευασίας. Επιπρόσθετα, για την μυζήθρα που ξηραίνεται σε ημιυπαίθριους χώρους απαιτούνται ειδικά μέτρα προστασίας (π.χ. τοποθέτηση κατάλληλης σίτας) για την αποτροπή κινδύνων επιμόλυνσης από το περιβάλλον.

Τελευταίο κρίσιμο σημείο θεωρείται και η τελευταία διαδικασία στο διάγραμμα ροής η συντήρηση. Ο υπεύθυνος θα πρέπει να ελέγχει την θερμοκρασία να μην υπερβεί τους 4°C για την αποφυγή πολλαπλασιασμού μικροβίων. Να σημειωθεί ότι τα προϊόντα θα πρέπει να οδηγούνται αμέσως στην συντήρηση υπό ψύξη και να μεταφέρονται επίσης υπό ψύξη στα σημεία πώλησης.

Είναι πολύ σημαντικό να σημειωθεί ότι τα προϊόντα τυρογάλακτος αφορούν φρέσκα τυριά με υψηλή υγρασία και χαμηλή οξύτητα (pH περίπου 6), που δεν υφίστανται ωρίμανση και λόγω της θέρμανσης του τυρογάλακτος, στερούνται φυσικής οξυγαλακτικής χλωρίδας, οπότε δεν αναστέλλεται η δράση των παθογόνων μικροοργανισμών. Για το λόγο αυτό τα τυριά αυτά έχουν αυξημένο κίνδυνο και καθίστανται ακατάλληλα ταχύτερα σε σχέση με τα τυριά που ζυμώνονται και ωριμάζουν. Περαιτέρω, έχουν μικρό χρόνο ανάλωσης και αν ακόμη γίνει εργαστηριακός έλεγχος στο τέλος της διαδικασίας παραγωγής, τα αποτελέσματα χρησιμεύουν μόνο για το χαρακτηρισμό της συγκεκριμένης παρτίδας, χωρίς όμως να δίνουν την ευχέρεια εφαρμογής διορθωτικών ενεργειών (δέσμευση, ανάκληση).

Συνοπτικά όλοι οι πιθανοί κίνδυνοι που μπορούν να προκύψουν κατά την γραμμή παραγωγής, ο χαρακτηρισμός τους, τα κρίσιμα όρια, αλλά και η παρακολούθηση τους και τα διορθωτικά μέτρα παρατίθενται πάντα συνοπτικά σε έναν πίνακα για την ευκολότερη εφαρμογή του συστήματος HACCP. Ο αντίστοιχος πίνακας για το σχέδιο HACCP για την παραγωγή τυριών τυρογάλακτος παρατίθεται από κάτω.

Σχέδιο HACCP για την παραγωγή προϊόντων τυρογάλακτος								
α/α	Στάδιο	Πιθανός κίνδυνος	Είδος σημείου ελέγχου	Κρίσιμο σημείο	Παρακολούθηση			Διορθωτική ενέργεια
					Προληπτικά μέτρα	Συχνότητα	Υπευθυνότητα	
1	Παραλαβή/αποθήκευση-ψύξη νωπού γάλακτος	Μη σωστή θερμοκρασία διανομής, αποθήκευσης	CCP1	4°C≤θ κατά την παραλαβή ή μη σωστή αποθήκευση μέχρι την αξιοποίηση του γάλακτος	Οπτικός έλεγχος	Σε κάθε παραλαβή	Υπεύθυνος πρώτων υλών	Ενημέρωση του προμηθευτή
		Παρουσία αντιβιοτικών στο γάλα			Εργαστηριακός έλεγχος			
					Τήρηση κανόνων υγιεινής			
2	Φυγοκέντρωση	Ατελής καθαρισμός του φυγοκεντρικού φίλτρου	CP		Έλεγχος καλού καθαρισμού του φίλτρου	Καθημερινά	Υπεύθυνος παραγωγής	Επανάληψη καθαρισμού
3	Παστερίωση	Επιβίωση μικροβίων λόγω ατελούς παστερίωσης	CCP2	72°C/15'' ή 63°C/30' ή οποιονδήποτε άλλο συνδυασμό θερμ./χρόνου για την επίτευξη	Έλεγχος διαγράμματος παστερίωσης	Συνεχής	Υπεύθυνος παστερίωσης γάλακτος	Επανάληψη παστερίωσης
					Δοκιμή αλκαλικής φωσφατάσης	Περιοδικά		

		Χημική επιμόλυνση από υπολείμματα καθαριστικών και απολυμαντικών	CP	ισοδύναμου αποτελέσματος	Μακροσκοπικός έλεγχος καθαρισμού-απολύμανσης	Μετά το πέρας των διαδικασιών		Επανάληψη έκπλυσης παστεριωτήρα
4	Πλήρωση δεξαμενών τυρογάλακτος	Μικροβιακή επιμόλυνση από ατελή καθαρισμό-απολύμανση των μέσων μεταφοράς του και των δεξαμενών υποδοχής	CP		Μακροσκοπικός έλεγχος καθαρισμού-απολύμανσης	Καθημερινά	Υπεύθυνος παραγωγής	Επανάληψη καθαρισμού
		Πολλαπλασιασμός βακτηρίων από πολύωρη παραμονή σε θερμοκρασία >4°C (σε περίπτωση μη άμεσης επεξεργασίας)			Τήρηση θερμοκρασίας ψύξης ($\leq 4^{\circ}\text{C}$) και χρόνου (έως 24 ώρες)	Καθημερινά		
5	Θέρμανση 80-95°C/15-20 λεπτά Πρόσθετα	Επιβίωση μικροβίων λόγω ατελούς θερμικής επεξεργασίας	CCP3	80-95°C/15-20 λεπτά	Έλεγχος θερμοκρασίας-χρόνου	Συνεχής	Υπεύθυνος παραγωγής	Επανάληψη διαδικασίας
		Μικροβιακή επιμόλυνση από ατελή καθαρισμό-απολύμανση του βραστήρα			Μακροσκοπικός έλεγχος καθαρισμού του βραστήρα	Καθημερινά		Επανάληψη καθαρισμού

		Χημική επιμόλυνση από υπολείμματα καθαριστικών και απολυμαντικών			Μακροσκοπικός έλεγχος καθαρισμού-απολύμανσης	Μετά το πέρας των διαδικασιών		Επανάληψη έκπλυσης του βραστήρα
		Μικροβιακή επιμόλυνση από ακατάλληλους χειρισμούς προσωπικού			Τήρηση κανόνων ορθής υγιεινής πρακτικής του προσωπικού	Συνεχής		
		Αστοχία επιθυμητής δράσης των προσθέτων			Έλεγχος προσθέτων. Έλεγχος παστερίωσης προσγάλακτος. Αξιολόγηση του προμηθευτή	Κάθε παρτίδα		Ενημέρωση προμηθευτή βοηθητικών υλών
		Προσθήκη λάθος ποσότητας προσθέτων			Χρήση ζυγού ακριβείας	Περιοδικά		Συντήρηση του ζυγού
6	Μορφοποίηση: Ξήρανση- Στράγγιση	Μικροβιακή επιμόλυνση από ατελή καθαρισμό εξοπλισμού	CPP4		Μακροσκοπικός έλεγχος σκευών και ξηραντήρα	Καθημερινά	Υπεύθυνος παραγωγής	Επανάληψη καθαρισμού
		Επιμόλυνση από το περιβάλλον, πτώση ξένων σωμάτων, παρουσία εντόμων, τρωκτικών (όταν γίνεται χρήση			Μέτρα προστασίας από ξένα σώματα, έντομα, τρωκτικά (ακεραιότητα προστατευτικού πλέγματος-σίτας, ατομική υγιεινή, αποτελεσματική	Καθημερινά		Δειγματοληπτικός έλεγχος τελικού προϊόντος (για χαρακτηρισμό μελλοντικών παρτίδων)

		ημιυπαίθριου ή εξωτερικού χώρου ξήρανσης)			εντομοκτονία και μυοκτονία)			
		Αύξηση μικροβιακού φορτίου λόγω ακατάλληλης θερμοκρασίας χώρου			Έλεγχος θερμοκρασίας χώρου	Συνεχής		
		Μικροβιακή επιμόλυνση από ακατάλληλους χειρισμούς του προσωπικού			Τήρηση κανόνων ορθής υγιεινής πρακτικής του προσωπικού	Συνεχής		
7	Συσκευασία	Επιμόλυνση από το περιβάλλον. Πτώση ξένων σωμάτων, εντόμων	CP		Μέτρα προστασίας από ξένα σώματα, αποτελεσματική εντομοκτονία	Καθημερινά	Υπεύθυνος παραγωγής	Εντείνονται τα μέτρα υγιεινής από το στάδιο 6
		Αύξηση μικροβιακού φορτίου λόγω ακατάλληλης θερμοκρασίας χώρου			Έλεγχος θερμοκρασίας χώρου και ολοκλήρωση της διαδικασίας σε σύντομο χρονικό διάστημα	Συνεχής		
		Επιμόλυνση από χειρισμούς του προσωπικού			Τήρηση κανόνων ορθής υγιεινής πρακτικής από το προσωπικό	Συνεχής		

		Επιμόλυνση από υλικά συσκευασίας			Έλεγχος καταλληλότητας των υλικών συσκευασίας. Αξιολόγηση του προμηθευτή	Κάθε παρτίδα		Αλλαγή προμηθευτή υλικών συσκευασίας
8	Συντήρηση υπό ψύξη	Επιβίωση και ανάπτυξη βακτηρίων λόγω ακατάλληλης θερμοκρασίας θαλάμων συντήρησης	CCP5	Θερμοκρασία $\leq 4^{\circ}\text{C}$	Έλεγχος θερμοκρασίας θαλάμων συντήρησης	Συνεχής	Υπεύθυνος παραγωγής	Δειγματοληπτικός έλεγχος του τελικού προϊόντος
				Απουσία παθογόνων από 25g	Έλεγχος τελικού προϊόντος	Περιοδικά		

7.2.2 Προτεινόμενα μέτρα σύμφωνα με τα μικροβιολογικά δεδομένα της διπλωματικής εργασίας

Αναλύοντας ένα ενδεικτικό πρόγραμμα HACCP που χρησιμοποιείται σε μία επιχείρηση παραγωγής προϊόντων τυρογάλακτος και λαμβάνοντας υπόψη και τα αποτελέσματα από τις μικροβιακές αναλύσεις κατά το πειραματικό μέρος, μπορούν να προταθούν κάποια μέτρα για την περαιτέρω μείωση της εμφάνισης κάποιου κινδύνου μόλυνσης του προϊόντος.

1. Η επιχείρηση μπορεί να χρησιμοποιεί βυτιοφόρα και δοχεία μεταφοράς του γάλακτος δικής της ιδιοκτησίας, ώστε να εξασφαλίζεται από την ίδια την επιχείρηση ο σωστός καθαρισμός και χρήση τους, καθώς και η σωστή μεταφορά στο σημείο παραγωγής.
2. Ο υπεύθυνος πρώτων υλών θα πρέπει να γνωρίζει την ιστορία του πεδίου από το οποίο εκτρέφονται τα ζώα από τα οποία προμηθεύεται η επιχείρηση το γάλα για να αποφευχθούν τυχόν ανεπιθύμητες εμφανίσεις χημικών παραγόντων στο γάλα (π.χ. μολυσμένο έδαφος από βιομηχανική δραστηριότητα στην κοντινή περιοχή ή και μολυσμένο νερό)
3. Ο υπεύθυνος πρώτων υλών θα πρέπει να ζητάει από τον εκτροφέα και παραγωγό του γάλακτος μία βεβαίωση για τον τρόπο εκτροφής των ζώων και για την οποιαδήποτε χορήγηση αντιβιοτικών ή άλλων ουσιών.
4. Θα πρέπει να γίνεται συνεχής επίβλεψη των εργαζομένων για τυχόν περιπτώσεις παρουσίας ασθένειας, ειδικά στα άτομα που εργάζονται στον χώρο παραγωγής και συσκευασίας
5. Η φύλαξη των υλικών συσκευασίας θα πρέπει να γίνεται σε αποστειρωμένο χώρο και σε μεταλλικά ράφια (δεν ενδείκνυται η χρήση ξύλινων ραφιών γιατί χρειάζονται συνεχή προσοχή καθώς η ύπαρξη ρωγμών μπορεί να αποτελέσει κατοικία μικροοργανισμών)
6. Η διατήρηση των δοχείων και των εργαλείων που έρχονται σε επαφή με το γάλα και με τα προϊόντα, θα ήταν καλό να φυλάσσονται σε θερμαινόμενο κλίβανο για την αποφυγή μόλυνσης τους
7. Το νερό που χρησιμοποιείται στις διεργασίες παραγωγής θα πρέπει να χρησιμοποιείται ως πρώτη χρήση στα τελευταία στάδια όπου τα προϊόντα είναι ως επί το πλείστον απαλλαγμένα από μικροοργανισμούς και από εκεί να τροφοδοτείται για επαναχρησιμοποίηση του στις αρχικές διεργασίες.

Κεφάλαιο 8: Συμπεράσματα

Λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα που προέκυψαν κατά την εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας μπορούν να εξαχθούν τα κάτωθι συμπεράσματα:

- ❖ Παρ' όλες τις διαδικασίες επεξεργασίας στις οποίες υπόκεινται τα τρόφιμα κατά την επεξεργασία τους, η πλήρης απομάκρυνση των μικροοργανισμών καθίσταται αδύνατη. Συνεπώς απώτερος στόχος των βιομηχανιών τροφίμων είναι η μέγιστη απομάκρυνση, αδρανοποίηση και εξάλειψη των παθογόνων μικροοργανισμών οι οποίοι οφείλονται για την εμφάνιση ασθενειών στον καταναλωτή, αλλά και η μείωση των υπόλοιπων μικροοργανισμών.
- ❖ Η επιχείρηση θα πρέπει να λαμβάνει όλα τα απαραίτητα μέτρα για την σωστή και ασφαλή επεξεργασία των προϊόντων της, καθώς και για την πλήρη εκπαίδευση του προσωπικού για την εφαρμογή ορθών πρακτικής υγιεινής.
- ❖ Παρόλο που τα δείγματα εμφάνισαν μεγάλη παρουσία μικροοργανισμών δεν σημαίνει απαραίτητα ότι είναι ακατάλληλα για κατανάλωση. Οι μικροοργανισμοί που ενδιαφέρουν κυρίως να απουσιάζουν από το τρόφιμο είναι η *Salmonella* sp., η *Listeria* sp. και ο *Staphylococcus aureus*. Βέβαια η απουσία του *S. aureus* από το τρόφιμο δεν σηματοδοτεί απαραίτητα και την καταλληλότητα του τροφίμου για κατανάλωση, καθώς αυτό που προκαλεί τα συμπτώματα είναι τοξίνη που παράγει ο *S. aureus*, η οποία μπορεί να βρίσκεται στο τρόφιμο ενώ ο μικροοργανισμός έχει καταστραφεί.
- ❖ Όπως αναφέρθηκε στο κεφάλαιο 7, υπάρχει μία πιθανότητα να επιλεγεί κάποια ελαττωματική παρτίδα παρά των μεγάλο αριθμό δειγματοληψιών από την εταιρεία πριν την διάθεση του προϊόντος στην αγορά.
- ❖ Η παρουσία μικροοργανισμών στα δείγματα που ελέγχθησαν μπορεί να οφείλεται και στην μη σωστή ή ελλιπή εφαρμογή ενός συστήματος HACCP, καθώς τα δείγματα που εξετάστηκαν ανήκαν σε μικρές τοπικές επιχειρήσεις ή και σε ντόπιους παραγωγούς.
- ❖ Η κατανάλωση του κοτόπουλου, του ψαριού αλλά και των αυγών μπορεί να θεωρηθεί κατάλληλη καθώς για την κατανάλωση τους μαγειρεύονται και φτάνουν θερμοκρασίες ανασταλτικές για τους παθογόνους και μη μικροοργανισμούς που μπορεί να βρίσκονται στο τρόφιμο. Εξαίρεση αποτελεί η ύπαρξη θερμοανθεκτικών τοξινών οι οποίες δεν καταστρέφονται με την θέρμανση.
- ❖ Από τις βιοχημικές αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν στα δείγματα του σταφυλόκοκκου βρέθηκε ότι από όλες τις αποικίες που απομονώθηκαν μόνο μία ανήκε στο βακτήριο *S. aureus*. Οι αποικίες που εξετάστηκαν ήταν από το εκλεκτικό θρεπτικό υλικό Mannitol salt agar, στο οποίο αναπτύσσονται με κίτρινο χρώμα οι αποικίες του *S. aureus*. Κάτι τέτοιο παρατηρήθηκε ότι δεν ισχύει καθώς οι περισσότερες αποικίες σταφυλόκοκκου που αναπτύχθηκαν στο συγκεκριμένο θρεπτικό υλικό είχαν κίτρινο χρώμα. Συνεπώς πέρα από τις καλλιέργειες θα πρέπει

να πραγματοποιούνται περαιτέρω μέθοδοι ταυτοποίησης του μικροοργανισμού για την σίγουρη ταυτοποίηση του.

- ❖ Η αποτυχία ανίχνευσης των βακτηρίων *E. faecalis* & *E. coli* σε κάποια από τα δείγματα με την μέθοδο της real – time PCR, μπορεί να οφείλεται στην παρουσία προσμίξεων στο απομονωμένο γενετικό υλικό οι οποίες μπορεί να έδρασαν ανασταλτικά. Επίσης ανιχνεύθηκαν συγκεκριμένα γονίδια από το κάθε βακτήριο το οποίο μπορεί να μην υπήρχε στα δείγματα μας.
- ❖ Οι PCR πολλές φορές δεν ενδείκνυται δεδομένου ότι τα δείγματα (τρόφιμα) είναι περιβαλλοντικά και μπορεί να φέρουν αναστολές
- ❖ Για την ποιοτική ανάλυση των τροφίμων μας ενδιαφέρει η βιωσιμότητα των μικροοργανισμών και για αυτό το λόγο επιλέγονται οι καλλιεργητικές μέθοδοι.
- ❖ Παρατηρώντας το σύστημα HACCP που εφαρμόζεται σε μία γαλακτοκομική επιχείρηση, συμπεραίνεται ότι η παρουσία των μικροοργανισμών που βρέθηκαν κατά την ανάλυση των δειγμάτων τυρογάλακτος, μπορεί να οφείλονται:
 - Σε μη σωστή εφαρμογή κανόνων ορθών πρακτικών υγιεινής κατά το στάδιο της συσκευασίας, καθώς δεν υπάρχει μετέπειτα διαδικασία απολύμανσης.
 - Στην λάθος αποθήκευση των δοχείων στραγγίσματος ή στην μη σωστή τοποθέτηση σίτας ή άλλου εμποδίου στους ημιυπαίθριους χώρους όπου λαμβάνει χώρα η ξήρανση της μυζήθρας.
 - Στην καθυστέρηση μεταφοράς του τελικού προϊόντος στην συντήρηση ή στην ύπαρξη μη κατάλληλης θερμοκρασίας συντήρησης.
 - Σε μη σωστό καθαρισμό των δεξαμενών από προηγούμενη χρήση τους
- ❖ Στο δείγμα 3 από τις συσκευασμένες σαλάτες αξίζει να αναφερθεί ότι αποτελεί βιολογικό προϊόν, τυποποιημένου από την BIO Hellas και το δείγμα 2 είχε καλλιεργηθεί χωρίς την παρουσία φυτοφαρμάκων. Παρατηρώντας τις τιμές που προέκυψαν από τις καλλιέργειες παρατηρείται μικρό μικροβιακό φορτίο σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα. Αυτό μπορεί να οφείλεται στην καλή ποιότητα του εδάφους καθώς και του νερού άρδευσης. Επίσης η χρήση φυτοφαρμάκων μπορεί να οδηγήσει σταδιακά στην ανάπτυξη ανθεκτικών στελεχών.

Βιβλιογραφία

Ξένη Βιβλιογραφία

Adams M.R. and Moss M.D., 2000, Food Microbiology, 2nd ed., New York: Springer.

Banwart G.J., 1989, Basic Food Microbiology 2nd ed., Chapman & Hall.

Baron S., 1996, Medical Microbiology, 4th ed., University of Texas Medical Branch at Galveston.

Belitz H.D., Grosch W., Schieberle P., 2009, Food Chemistry 4th ed., New York: Springer.

Catalin A., Bruno C., Taina N., 2014, ECDC: Annual epidemiological report, food and waterborne diseases and zoonoses.

FDA, 1998, Guidance to Minimize Microbial Food Safety Hazards for Fresh fruits and vegetables.

Forsythe S.J., 2000, The Microbiology of safe food, Blackwell Science.

Fortsythe S.J. and Hayes P.R., 1998, Food hygiene, microbiology and HACCP, Springer Science & Business Media, LLC.

Fraham E., Obst U., 2003, Application of the fluorogenic probe technique (TaqMan PCR) to the detection of *Enterococcus* spp. and *Escherichia coli* in water samples. Journal of Microbiological Methods, 52 (1): 123-131.

Frakruddin Md., Mazumdar R., Mannan K., 2011, Predictive Microbiology – Modeling microbial responses in food. Ceylon Journal of Science (Biological Sciences).

Fraser G., Gomes D.J., Hrubá F., Albu C., 2013, Reporting on 2011 surveillance data and 2012 epidemic intelligence data. ECDC: Annual epidemiological report.

FSA, 2005, General Guidance for Food Business Operators

Hajmeer M., 2006, Predictive Microbiology.

Hui Y.H., Khachaturians G.G., 1995, Food biotechnology: microorganisms (Food Science and Technology), Wiley.

ICMSF, 1995, International Commission on Microbiological Specifications for Foods. Microorganisms in Foods 5: characteristics of microbial pathogens, Kluwer Academic/Plenum Publisher.

Jay J.M., 2000, Modern Food Microbiology, Aspen Publishers, Inc.

Kenneth E.S., 1995, HACCP: establishing hazard analysis critical control point programs

- Leistner L., 2000, Basic aspects of Food Preservation by the hurdle technology.
- Lund B.M., Baird-Parker T.C., 2000, The microbiological safety and quality of food, Aspen Publishers, Inc.
- Mortimore S., Wallace C., 1998, HACCP: a practical approach, New York: Springer.
- Pepper I.L., Gerba C.P., Gentry T.J., 2015, Environmental Microbiology, 3rd ed., Academic Press.
- Shafiur Rahman M., 2007, Handbook of Food Preservation, 2nd ed., CRC Press.
- Sharma K.K., Kalawat U., 2010, Emerging infections: *Shewanella* – series of five cases. Journal of Lab Physicians 2 (2): 61-5.
- U.S. Department of Agriculture, 2011, Overview of Food Microbiology.
- Venieri D., Chatzisyμεon E. Sofianos S.S., Politi E., Xekoukoulotakis N.P., Katsaounis A., Mantzavinos D., 2012, Removal of faecal indicator pathogens from water and wastewater by photoelectrocatalytic oxidation on TiO₂/Ti films under simulated solar radiation. Environmental Science and Pollution Research 19(9): 3782-3790.
- Ventura da Silva M., 2014, Poultry and poultry products – risk for human health. Food and Agriculture Organization of the United Nations.

Ελληνική Βιβλιογραφία

- Αρβανιτίδου – Βαγιώνα Μ., 2009, Υγιεινή, University Studio Press.
- Βενιέρη Δ., Γουνάκη Ι., 2011, Πανεπιστημιακές σημειώσεις μαθήματος «Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας», Σχολή Μηχανικών Περιβάλλοντος, Πολυτεχνείο Κρήτης, Χανιά.
- ΕΦΕΤ, 2004, Εγχειρίδιο βασικής εκπαίδευσης στην Υγιεινή και την Ασφάλεια των τροφίμων.
- ΕΦΕΤ, 2013, Εθνικά προγράμματα Επίσημου ελέγχου ασφάλειας & ποιότητας των τροφίμων έτος 2012 – Δειγματοληψία και ανάλυση.
- ΕΦΕΤ, 2009, Παθογόνοι μικροοργανισμοί στα τρόφιμα.
- ΕΦΕΤ, 2003, Οδηγός υγιεινής για τις επιχειρήσεις λιανικής πώλησης τροφίμων.
- ΕΦΕΤ, 2003, Οδηγός υγιεινής για τις επιχειρήσεις αποθήκευσης και διανομής τροφίμων σε συνθήκες περιβάλλοντος, ψύξης ή κατάψυξης.
- ΕΦΕΤ, 2012, Γενικός οδηγός για την εφαρμογή συστήματος βάσει των αρχών του HACCP σε μικρές γαλακτοκομικές επιχειρήσεις.

Μπαλατσούρας Γ., 1992, Μικροβιολογία Τροφίμων, Εκδόσεις Σ. Βασιλειάδης.

Παπαδοπούλου Χ., 2001, Θεωρία, Μεθοδολογία και Υγιεινή – Μικροβιολογία τροφίμων, Εκδόσεις Κωσταράκη.

Σούλτος Ν., Ιωσηφίδου Ε., 2012, Μικροβιολογία τροφίμων, Σημειώσεις μαθήματος, Τμήμα Χημείας, Α.Π.Θ. Θεσσαλονίκη.

Τζία Κ., Τσιαπούρης Α., 1996, Ανάλυση επικινδυνότητας στα κρίσιμα σημεία ελέγχου (HACCP) στη βιομηχανία τροφίμων – HACCP, Εκδόσεις Παπασωτηρίου.

Ηλεκτρονική Βιβλιογραφία

European Center for Disease Prevention and Control www.ecdc.europa.eu

Food and Drug Administration official site www.fda.gov

National Center for Biotechnology Information www.ncbi.nlm.nih.gov

Todar's Online Textbook of Bacteriology www.textbookofbacteriology.net

<http://www.food.gov.uk/>, Monaghan J., Hutchison M., 2010, Monitoring microbial food safety of fresh produce

www.foodsafety.gov

www.microbewiki.kenyon.edu

www.wikipedia.com