

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

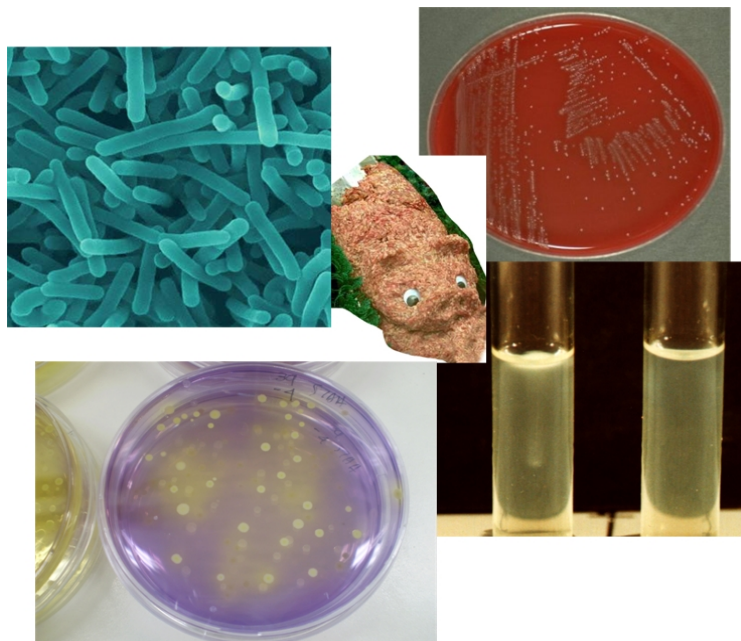
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΟΙΟΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ & ΥΓΙΕΙΝΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΠΟΤΩΝ

ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ, ΔΕΙΚΤΕΣ

ΥΓΙΕΙΝΗΣ & ΕΠΠΟΛΑΣΜΟΣ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥ

***Listeria monocytogenes* ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΧΟΙΡΕΙΟΥ ΚΙΜΑ**



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

ΒΑΣΙΛΙΚΗ Κ. ΚΑΡΑΜΠΕΡΗ

ΑΘΗΝΑ

2010

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΟΙΟΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ & ΥΓΙΕΙΝΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΠΟΤΩΝ

**ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ, ΔΕΙΚΤΕΣ
ΥΓΙΕΙΝΗΣ & ΕΠΙΠΟΛΑΣΜΟΣ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥ
Listeria monocytogenes ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΧΟΙΡΕΙΟΥ ΚΙΜΑ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ
ΒΑΣΙΛΙΚΗ Κ. ΚΑΡΑΜΠΕΡΗ**

Επιβλέπων: Καθηγητής Δροσινός Ελευθέριος
Μέλη Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής: Ματαράγκας Μάριος, Σκανδάμης Παναγιώτης

**ΑΘΗΝΑ
2010**

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ευχαριστώ θερμά τον κ. Δροσινό Ελευθέριο, για την ανάθεση του θέματος της μελέτης, την καθοδήγηση και το ενδιαφέρον του.

Ευχαριστώ επίσης τον υποψήφιο Διδάκτορα Ανδρίτσο Νίκο, η βοήθεια του οποίου ήταν καταλυτική για την ολοκλήρωση της παρούσας μελέτης, ο οποίος ήταν πρόθυμα να προσφέρει αγόγγυστα τις γνώσεις του καθώς και για την ψυχολογική υποστήριξη που μου προσέφερε. Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Διδάκτορα Ματαράγκα Μάριο για τις άριστες γνώσεις που μου παρείχε.

Τέλος, το μεγαλύτερο ευχαριστώ το οφείλω στους δικούς μου ανθρώπους που στηρίζουν πάντα οποιαδήποτε επιλογή μου.

A. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο κιμάς είναι ένα ιδιαίτερα ευαλλοίωτο και δυνητικά επισφαλές προϊόν κρέατος. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν πρώτον η καταμέτρηση του πληθυσμού αλλοιογόνων μικροοργανισμών και δεικτών υγιεινής καθώς και η αξιολόγηση των μικροβιακών συσχετίσεων μεταξύ τους και δεύτερον ο προσδιορισμός του επιπολασμού (p) και της συγκέντρωσης (c) του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* σε δείγματα χοιρινού κιμά.

Αναφορικά με το πρώτο μέρος της μελέτης, λήφθηκαν δείγματα χοιρινού κιμά, στα οποία διενεργήθηκε σειρά μικροβιακών αναλύσεων. Έτσι παρουσιάστηκαν οι κατανομές για την αλλοιογόνο μικροχλωρίδα καθώς και για τους δείκτες υγιεινής και έγιναν οι μικροβιακές συσχετίσεις μεταξύ των δυο αυτών ομάδων μικροοργανισμών.

Σχετικά τώρα με το δεύτερο μέρος της μελέτης, έγινε προσδιορισμός του επιπολασμού (p) και της συγκέντρωσης (c) του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* σε δείγματα χοιρινού κιμά. Παράλληλα, εκτιμήθηκε η ευαισθησία (Se) και η ικανότητα εξειδίκευσης (Sp) τριών στερεών επιλεκτικών υποστρωμάτων (PALCAM, ALOA, RAPID'L.mono) που χρησιμοποιούνται σε συνήθεις αναλύσεις για τον έλεγχο της παρουσίας του παθογόνου στα τρόφιμα. Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν προχωρημένες στατιστικές μέθοδοι ανάλυσης (Bayesian inference) και αναπτύχθηκε ένα μοντέλο (Bayesian model) πρόβλεψης/εκτίμησης των πραγματικών τιμών των εξεταζόμενων παραμέτρων (p , c , Se , Sp).

B. SUMMARY

Mince is a potentially hazardous meat product with a short self life. The aim of the present study was first the enumeration of spoilage flora and some typical microbiological hygiene indicators, as well as the evaluation of microbial association between the above and second the determination of the prevalence (p) and concentration (c) of the foodborne pathogen *Listeria monocytogenes* in minced pork samples.

Regarding the first part of the study, samples of minced pork meat were taken and subjected to microbiological analysis. The distributions for spoilage flora are presented, as well as the hygiene indicators and were made the microbial association between them.

The second part of the study, the determination of the prevalence (p) and concentration (c) of the *Listeria monocytogenes* was conducted, as well as the sensitivity (Se) and specificity (Sp) of the three different culture media (PALCAM, ALOA, RAPID'L.mono) by the application of Bayesian inference.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	iii
SUMMARY	iv
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο – ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1 Γενικά στοιχεία και ορισμοί	2
1.2 Θρεπτική αξία και κατανάλωση του κρέατος	3
1.3 Μικροχλωρίδα του κρέατος	5
1.3.1 Αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί στο κρέας	6
1.3.2 Παθογόνοι μικροοργανισμοί στο κρέας	8
1.3.2.1 <i>Listeria</i> spp.	8
1.4 Μικροοργανισμοί ως δείκτες ποιότητας και ασφάλειας των τροφίμων	11
1.4.1 Ορισμοί	13
1.4.2 Εντεροβακτήρια (Οικ. Enterobacteriaceae)	13
1.4.2.1 Κολοβακτηριοειδή (coliforms)	14
1.4.2.2 Κολοβακτηριοειδή κοπράνων (Faecal coliforms)	15
1.4.2.3 <i>Escherichia coli</i>	16
1.4.3 Εντερόκοκκοι	16
1.5 Μέτρα υγιεινής σε χώρους στους οποίους το κρέας προετοιμάζεται, επεξεργάζεται, διατηρείται, εκτίθεται και πωλείται	17
1.5.1 Γενικές απαιτήσεις για τους χώρους	17
1.5.2 Ειδικές απαιτήσεις για τους χώρους επεξεργασίας – προετοιμασίας- έκθεσης και πώλησης τροφίμων	18
1.5.3 Μεταφορά	20
1.5.4 Απαιτήσεις εξοπλισμού	21
1.5.5 Απορρίματα	23
1.6 Σύστημα διαχείρισης της ασφάλειας των τροφίμων (HACCP)	26
1.6.1 Ανασκόπηση και κατηγορίες των κινδύνων στο κρέας	27
1.6.2 Διάγραμμα ροής εμπορίας νωπού κρέατος	30
1.6.3 Σημεία ελέγχου για κρεοπωλεία	31

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο – ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ	34
2.1 Χρησιμοποιούμενα υλικά	35
2.1.1. Ανόργανα και οργανικά χημικά αντιδραστήρια	35
2.1.2. Συστατικά θρεπτικών υποστρωμάτων	36
2.1.3. Θρεπτικά υποστρώματα	36
2.2 Χρησιμοποιούμενος εργαστηριακός εξοπλισμός	37
2.2.1 Όργανα και συσκευές	37
2.2.2 Σκεύη	37
2.3 Χρησιμοποιούμενοι μικροοργανισμοί	39
2.4 Πειραματική διαδικασία	39
2.4.1 Δειγματοληψία	39
2.4.2 Ομογενοποίηση δείγματος	39
2.4.3 Μέτρηση pH	40
2.4.4 Διαδοχικές αραιώσεις	40
2.4.5 Ενοφθαλμισμός θρεπτικών υποστρωμάτων	43
2.4.6 Επώαση θρεπτικών υποστρωμάτων	44
2.4.7 Αρίθμηση αποικιών	45
2.4.8 Στάδιο εμπλουτισμού	46
2.4.9 Απομόνωση ύποπτων αποικιών του <i>Listeria monocytogenes</i>	46
2.4.10 Συντήρηση και ανακαλλιέργεια απομονωθέντων στελεχών	46
2.4.11 Ταυτοποίηση στελεχών	47
2.4.11.1 Δοκιμή οξειδάσης	47
2.4.11.2 Δοκιμή καταλάσης	47
2.4.11.3 Χρώση κατά Gram	48
2.4.11.4 Έλεγχος ικανότητας κίνησης	49
2.4.11.5 Ζύμωση σακχάρων	50
2.4.11.6 Αιμόλυση	51
2.4.11.7 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	51
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο – ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ & ΣΥΖΗΤΗΣΗ	55
3.1 Αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί	56
3.2 Δείκτες υγιεινής	58
3.3 <i>Listeria monocytogenes</i>	59

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	66
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ-ΣΧΗΜΑΤΩΝ-ΕΙΚΟΝΩΝ	68
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	71

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ



1.1 Γενικά στοιχεία και ορισμοί

Τις τελευταίες τρεις δεκαετίες οι επιδημιολογικές μελέτες δείχνουν αύξηση του αριθμού των τροφιμογενών νοσημάτων. Ειδικότερα, αναφέρεται ότι ποσοστό 10-15% του πληθυσμού των ανεπτυγμένων χωρών, αντιμετωπίζει ετησίως διαταραχή της υγείας του λόγω της κατανάλωσης τροφίμων (Kaferstein, 2003).

Το πρόβλημα οξύνεται στις αναπτυσσόμενες χώρες, όπου τα τροφιμογενή νοσήματα και οι υδατογενείς λοιμώξεις αποτελούν το κύριο αγωγό (vehicle) μετάδοσης παθογόνων και πρόκλησης ασθενειών και θανάτων, ενώ είναι υπεύθυνες για το θάνατο περίπου 2 εκατομμυρίων ατόμων ετησίως, εκ των οποίων το μεγαλύτερο ποσοστό είναι παιδιά (Schlundt, 2002). Σύμφωνα με στοιχεία του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (World Health Organization, WHO) των Ηνωμένων Εθνών, μόνο το 2005, 1.8 εκατομμύρια άνθρωποι έχασαν τη ζωή τους εξαιτίας διαρροϊκών συνδρόμων, με την πλειοψηφία των περιπτώσεων αυτών να αποδίδεται σε τροφιμογενή αίτια (Anonymous, 2002).

Κι όμως, παρά όλα τα παραπάνω, δυστυχώς μόνον ένα πολύ μικρό ποσοστό, της τάξης του 5-10%, των συνολικών τροφιμογενών νοσημάτων μικροβιολογικής αιτιολογίας γίνεται γνωστό και δηλώνεται στις επίσημες στατιστικές των υπηρεσιών δημόσιας υγείας.

Το κόστος των συνεπειών των τροφιμογενών ασθενειών είναι τεράστιο και αφορά, εκτός από τον άνθρωπο σε ατομικό επίπεδο, την κοινωνία γενικότερα (ιατρικές δαπάνες, απώλεια παραγωγικότητας, θάνατοι κ.λπ.), καθώς και τη βιομηχανία τροφίμων (απόσυρση τεραστίων ποσοτήτων προϊόντων, επιπλέον εργαστηριακοί έλεγχοι, απώλεια της αγοράς, νομικές δαπάνες για πρόστιμα, αμοιβές δικηγόρων, αποζημιώσεις κ.λπ.) (Zajac and Huffstutter, 2010).

Το κρέας αποτελεί ένα τρόφιμο, υπεύθυνο για την πρόκληση τροφιμογενών ασθενειών μιας και αποτελεί 'ιδανικό' θρεπτικό υλικό για την ανάπτυξη μικροοργανισμών και αποτελεί αντικείμενο μελέτης στην παρούσα εργασία. Οι ορισμοί του κρέατος καθώς και του κιμά δίνονται παρακάτω:

«Νωπό κρέας»: κρέας το οποίο δεν έχει υποστεί καμία άλλη επεξεργασία συντήρησης εκτός από την ψύξη, την κατάψυξη ή την ταχεία κατάψυξη, συμπεριλαμβανομένου του κρέατος που είναι συσκευασμένο σε κενό αέρος ή σε ελεγχόμενη ατμόσφαιρα.

(Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 853/2004)

«Κιμάς»: το κρέας χωρίς οστά το οποίο έχει υποστεί άλεσμα σε τεμάχια και περιέχει αλάτι σε ποσοστό μικρότερο του 1 % .(Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 853/2004)

1.2 Θρεπτική αξία και κατανάλωση του κρέατος

Το κρέας και τα προϊόντα του παρέχουν πρωτεΐνες υψηλής βιολογικής αξίας και αποτελούν πηγή κορεσμένων λιπιδίων, τριγλυκεριδίων και χοληστερόλης. Το κρέας περιέχει τις περισσότερες από τις βιταμίνες του συμπλέγματος Β και αποτελεί σημαντική πηγή της βιταμίνης Β₁₂. Η περιεκτικότητα σε λιποδιαλυτές βιταμίνες εξαρτάται από την διατροφή του ζώου.

Το κρέας και τα προϊόντα του έχουν επίσης υψηλή περιεκτικότητα και βιοδιαθεσιμότητα αρκετών από τα απαραίτητα μέταλλα. Αποτελούν καλή πηγή βιοδιαθέσιμου σιδήρου και ψευδαργύρου (Ascherio et al., 1994). Σελήνιο, χαλκός και άλλα ιχνοστοιχεία είναι επίσης παρόντα στο κρέας. Τα ανόργανα συστατικά αποθηκεύονται κυρίως στο μυϊκό ιστό και οι συγκεντρώσεις τους είναι χαμηλές στα λιπαρά τμήματα του ζώου (Γεωργάκης, 2005). Οι ποσότητες των μακροθρεπτικών στοιχείων, των μεταλλικών αλάτων και των βιταμινών στο κρέας φαίνονται στον πίνακα θρεπτικής αξίας (Πίνακας 1).

Η καταγραφή και παρακολούθηση των διατροφικών επιλογών του ελληνικού πληθυσμού είναι δυνατή μέσω των Φύλλων Ισοζυγίου Τροφίμων (Food Balance Sheets), στα οποία καταγράφεται η ποσότητα των τροφίμων που προορίζεται για ανθρώπινη κατανάλωση στο σύνολο της χώρας. Η κατανάλωση χοιρινού κρέατος απεικονίζεται διαγραμματικά στο Σχήμα 1.

Κατά το 2002 κάθε ευρωπαίος πολίτης είχε στη διάθεση του για κατανάλωση ετησίως, κατά μέσον όρο ,περίπου 65 kg κρέας. Η ποσότητα αυτή αντιστοιχεί σε ημερήσια κατανάλωση 145 περίπου γραμμαρίων έτοιμων για κατανάλωση προϊόντων και καλύπτει σχεδόν το 1/6 των ημερήσιων υφιστάμενων αναγκών σε ενέργεια. Στοιχεία της βάσης DAFNE φανερώνουν σημαντικές διαφοροποιήσεις στη διατροφική συμπεριφορά των Ευρωπαϊκών πληθυσμών. Μεταξύ των Ευρωπαϊκών λαών, οι Έλληνες κατατάσσονται πρώτοι στην κατανάλωση κόκκινου κρέατος (www.nut.uoa.gr)

Πίνακας 1.1. Θρεπτική αξία χοιρινού κρέατος

Μακροθρεπτικά συστατικά	Ολικό λίπος (g/100g)	15,35	} Κορεσμένα % 32.1 Μονοακόρεστα % 50.8 Πολυακόρεστα % 15.4 Trans % 0.3 Ω-3 % 1.3 Ω-6 % 14
	Πρωτεΐνες (g/100g)	25.1	
	Ενέργεια (kJ/kcal ανά 100 g)	903/215	
	Χοληστερόλη (mg/100g)	73.5	
Μεταλλικά άλατα	Se (μg/100g)	183	
	Fe (mg/100g)	1.8	
	Zn (mg/100g)	1.9	
	K (mg/100g)	334	
Βιταμίνες	B₁ (μg/100g)	850	
	B₂ (μg/100g)	230	
	B₆ (μg/100g)	500	
	B₁₂ (μg/100g)	5	



Πηγή : Φύλλα Ισοζυγίου Τροφίμων του Οργανισμού Ηνωμένων Εθνών(www.faostar.fao.org)

Σχήμα 1.1. Μεταβολή στη προμήθεια χοιρινού κρέατος για την κάλυψη των αναγκών του ελληνικού πληθυσμού κατά την περίοδο 1960-2002 (kg/άτομο/έτος)

Σε παγκόσμιο επίπεδο, η ποσότητα του κρέατος που υπάρχει παράγεται στο τέλος της διαδικασίας σφαγής. Ότι προκύπτει από το έτοιμο σφάγιο περιλαμβανομένων των οστών, αξιολογούνται στατιστικά και χαρακτηρίζονται ως «προϊόντα που θα χρησιμοποιηθούν». Ως «βρώσιμα προϊόντα» διατίθενται για την αγορά από τον τελικό καταναλωτή μόνο περίπου το 65% και τούτου γιατί κατά τη διάρκεια της σφαγής, εκτός από τα οστά, το δέρμα και τα λίπη δημιουργούνται απώλειες βάρους περίπου 3%, απώλειες για την εξισορρόπηση της θερμοκρασίας περίπου 2%, διάφορες άλλες απώλειες περίπου 2% που προκύπτουν κατά τη σφαγή και περίπου 3-5% από το περιεχόμενο του εντερικού σωλήνα. Κατά την προετοιμασία και την επεξεργασία του κρέατος πρέπει να υπολογίσει κανείς μια απώλεια βρασμού 20% περίπου (Γεωργάκης, 2005).

1.3 Μικροβλωρίδα του κρέατος

Η μικροβιολογία του νωπού κρέατος έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον τόσο από την άποψη της δημόσιας υγείας και της προστασίας του καταναλωτή όσο και από την άποψη της εμπορίας.

Το νωπό κρέας είναι ένα ευαλλοίωτο προϊόν για τους παρακάτω λόγους:

1. Περιέχει αφθονία θρεπτικών συστατικών που είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη των βακτηρίων, των ζυμών και των μυκήτων.
2. Έχει μεγάλη περιεκτικότητα σε υγρασία που αντιστοιχεί σε μια τιμή a_w περίπου 0,99, η οποία είναι ευνοϊκή για την ανάπτυξη των περισσότερων μικροοργανισμών.
3. Η τιμή του pH κυμαίνεται από 5.0-7.0 και επιτρέπει την ανάπτυξη των περισσότερων μικροοργανισμών.
4. Το οξειδοαναγωγικό δυναμικό στο εσωτερικό μεγάλων τεμαχίων κρέατος είναι χαμηλό με αποτέλεσμα να επιτρέπεται η ανάπτυξη μόνο αναερόβιων μικροοργανισμών, από τους οποίους λίγοι αναπτύσσονται στις χαμηλές θερμοκρασίες ψύξης. Στην επιφάνεια και στην περιοχή που βρίσκεται κοντά στην επιφάνεια του κρέατος επικρατούν ψηλότερες τιμές οξειδοαναγωγικού δυναμικού με αποτέλεσμα να αναπτύσσονται αυστηρά αερόβιοι και προαιρετικά αναερόβιοι μικροοργανισμοί (Κοτζεκίδου, 1993).

Το κρέας των υγιών ζώων, πριν από τη σφαγή, θεωρείται ελεύθερο μικροοργανισμών. Εξαιρέσεις της γενίκευσης αποτελούν οι λεμφαδένες και μερικά όργανα που μπορούν να φέρουν περιορισμένο αριθμό βακτηρίων. Αντίθετα οι

επιφάνειες του ζώου που εκτίθενται στο περιβάλλον όπως το δέρμα, το στόμα και ο γαστρεντερικός σωλήνας είναι δυνατό να φέρουν υψηλό μικροβιακό φορτίο (Nottingham, 1982· Grau, 1986· Gill, 1998· Koutsoumanis and Sofos, 2005· Koutsoumanis et al., 2005). Αυτά τα μέρη του ζώου αποτελούν τις σημαντικότερες πηγές μίανσης σφαγίων κρέατος. Η έκταση της μεταφοράς της μικροβιακής μίανσης από τις ανωτέρω πηγές στο σφάγιο εξαρτάται από τις συνθήκες εκτροφής, σφαγής και επεξεργασίας (Nottingham, 1982· Grau, 1986· Gill, 1998· Koutsoumanis and Sofos, 2005· Koutsoumanis et al., 2005). Οι συνθήκες υγιεινής κατά τον χειρισμό και την επεξεργασία καθώς και οι συνθήκες αποθήκευσης και διακίνησης είναι οι σημαντικότεροι παράγοντες που καθορίζουν την μικροβιολογική ποιότητα των τελικών προϊόντων κρέατος.

1.3.1 Αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί στο κρέας

Έχει διαπιστωθεί ότι μόνο το 10% των μικροοργανισμών που βρίσκονται αρχικά στο κρέας θα αυξηθεί σε θερμοκρασίες ψύξης και μόνο ένα μέρος αυτών θα οδηγήσει σε αλλοιώσεις μέσω της μεταβολικής δραστηριότητας τους (Borch et al., 1996· Garcia-Lopez et al., 1998). Οι μικροβιακής αιτιολογίας αλλοιώσεις του κρέατος και των προϊόντων του εξαρτώνται από τον αριθμό και τον τύπο των μικροοργανισμών που μολύνουν το προϊόν, την επεξεργασία στην οποία υποβάλλεται αυτό, τη θερμοκρασία αποθήκευσης, την ατμόσφαιρα συσκευασίας και τη σύνθεση του προϊόντος (Gill, 1983). Οι κύριες ομάδες βακτηρίων που προκαλούν αλλοιώσεις του κρέατος είναι *Pseudomonas* spp., Enterobacteriaceae (*Serratia liquefaciens*, *Hafnia alvei*, *Enterobacter agglomerans*), *Brochothrix thermosphacta*, γαλακτικά βακτήρια (*Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* and *Leuconostoc* spp.), *Moraxella* spp., *Psychrobacter* spp., *Anicetobacter* spp., *Aeromonas* spp., και *Shewanella putrefaciens* (Dainty and Mackey, 1992· Jay, 2000). Οι ζύμες και οι μύκητες μπορούν επίσης να συμβάλλουν στην αλλοίωση του κρέατος αλλά μόνο όταν ο βακτηριακός ανταγωνισμός μειώνεται (Walker and Ayres, 1970), όπως κατά την έκθεση στην ακτινοβολία ιονισμού, τη μειωμένη ενεργότητα νερού και την παρουσία συντηρητικών ή αντιμικροβιακών παραγόντων (Dillon, 1998).

Η ανάπτυξη των μικροοργανισμών αυτών υλοποιείται στην υδάτινη φάση του κρέατος (Nychas et al., 1994). Οι μικροοργανισμοί στην φάση αυτή, καταναλώνουν

τη γλυκόζη, το γαλακτικό οξύ, ορισμένα αμινοξέα, νουκλεοτίδια, ουρία και υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες (Gill, 1976· Nychas et al., 1988· Drosinos, 1994).

Το κρέας και τα προϊόντα κρέατος που αποθηκεύονται υπό αερόβιες συνθήκες σε χαμηλή θερμοκρασία αλλοιώνονται κυρίως από αυστηρά αερόβια Gram-αρνητικά βακτήρια τα οποία, στις συνθήκες αυτές, παρουσιάζουν υψηλούς ρυθμούς ανάπτυξης. Οι ψευδομονάδες και συγκεκριμένα οι *Ps. fragi*, *Ps. fluorescens* και *Ps. lundensis* κυριαρχούν συνήθως στο κρέας που αποθηκεύεται σε χαμηλές θερμοκρασίες (Koutsoumanis et al., 2004). Οι ψευδομονάδες μεταβολίζουν κατά προτίμηση τη γλυκόζη και παράγουν προϊόντα μεταβολισμού τα οποία δεν επηρεάζουν σημαντικά τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του προϊόντος. Όταν εντούτοις, ο ρυθμός διάχυσης της γλυκόζης από τον ιστό στην επιφάνεια του κρέατος δεν μπορεί πλέον να ικανοποιήσει τις απαιτήσεις του υψηλού πληθυσμού ($>10^7$ cfu/g), οι ψευδομονάδες αρχίζουν να μεταβολίζουν αμινοξέα (cysteine, cystine και methionine) και πρωτεΐνες με αποτέλεσμα το σχηματισμό αμμωνίας, αμινών (cadaverine, putrescine, spermidine, spermine, histamine, and tyramine) και σουλφιδίων (hydrogen sulfide, methylsulfide and dimethylsulfide) και οδηγούν σε δυσάρεστες οσμές και τελικά στη αλλοίωση του κρέατος (Gill and Newton, 1977·1978).

Οι προαιρετικά αναερόβιοι οργανισμοί που ανήκουν στη οικογένεια *Enterobacteriaceae* μεταβολίζουν κατά προτίμηση τη γλυκόζη, και στη συνέχεια τα αμινοξέα. Ωστόσο, ο μικρός ρυθμός ανάπτυξης των εντεροβακτηρίων σε χαμηλές θερμοκρασίες αποτρέπει συνήθως την επικράτηση τους στο κρέας που αποθηκεύεται υπό ψύξη (Gill and Newton, 1977). Το Gram-θετικό, προαιρετικά αναερόβιο βακτήριο *B. thermosphacta* αποτελεί επίσης ένα δευτερεύον μέλος της μικροχλωρίδας που προκαλεί αλλοιώσεις του κρέατος σε αερόβιες συνθήκες. Έχει διαπιστωθεί ότι *B. thermosphacta* επικρατεί κυρίως στο πρόβειο και χοίρειο κρέας, ειδικά σε επιφάνειες με υψηλό ποσοστό λίπους και υπό συνθήκες συντήρησης σε θερμοκρασία 5°C (Egan and Roberts, 1987· Dainty and Mackey, 1992). Άλλες ομάδες βακτηρίων που εμπλέκονται στην αερόβια αλλοίωση του κρέατος είναι οι *Acinetobacter* spp., *Psychrobacter* spp. και *Moraxella* spp. Τα παραπάνω αυστηρά αερόβια βακτήρια αποτελούν την κυρίαρχη μικροχλωρίδα σε κρέας υψηλού pH ($>5,8$), ή κατά την αποθήκευση σε συνθήκες περιβάλλοντος (Gill and Newton, 1982). Αντίθετα από τις ψευδομονάδες, τα περισσότερα από αυτά τα αυστηρά αερόβια βακτήρια δεν μεταβολίζουν εξόξες και καταναλώνουν άμεσα τα αμινοξέα (Gill, 1983).

1.3.2 Παθογόνοι μικροοργανισμοί στο κρέας

Υπό την προϋπόθεση ότι η επεξεργασία του κρέατος γίνεται με βάση τους κανόνες ορθής βιομηχανικής και υγιεινής πρακτικής (Βλ. παράγραφο 1.5), η μείωση του με παθογόνους μικροοργανισμούς θα πρέπει να κυμαίνεται σε πολύ χαμηλά επίπεδα σε σχέση με τη μικροχλωρίδα που προκαλεί αλλοιώσεις του. Τα σημαντικότερα παθογόνα που συνδέονται με το κρέας περιλαμβάνουν *Salmonella s.*, *Staphylococcus aureus*, *verotoxigenic E.coli*, *Clostridium perfringens*, *Campylobacter jejuni/coli*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* και *Aeromonas hydrophila*. Τα παθογόνα *Salmonella* sp, *E.coli*, και *Campylobacter* είναι εντερικής προέλευσης και η κύρια πηγή μόλυνσης θεωρείται η πρώτη ύλη. Αντίθετα στην περίπτωση της *Listeria monocytogenes*, το περιβάλλον των εγκαταστάσεων αντιπροσωπεύει την κύρια πηγή μείωσης. Οι τροφιμογενείς λοιμώξεις που προκαλούνται από το παραπάνω παθογόνο σχετίζονται κυρίως με τα έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα ενώ η μείωση λαμβάνει χώρα μετά την επεξεργασία. Η παρουσία και τα επίπεδα των παθογόνων μικροοργανισμών στα σφάγια και τα προϊόντα κρέατος εξαρτώνται από διάφορους παράγοντες συμπεριλαμβανομένης της προέλευσης του ζώου, των διαδικασιών υγιεινής που υιοθετούνται κατά τη διάρκεια του χειρισμού και της επεξεργασίας του προϊόντος, την εφαρμογή των επεμβάσεων απολύμανσης (decontamination) και των συνθηκών αποθήκευσης και διανομής. Με βάση τα στοιχεία που συλλέχθηκαν από τον FSIS, 14,6% των μόσχων και 27,2 % των αγελάδων και των ταύρων είναι μολυσμένα με ένα έως 3 διαφορετικά παθογόνα βακτήρια). Τα στοιχεία αυτά δείχνουν επίσης ότι η παρουσία των παθογόνων στα σφάγια χοιρινού κρέατος είναι υψηλότερη δεδομένου ότι 52,4% των χοίρων είναι μολυσμένα με ένα έως πέντε διαφορετικά παθογόνα βακτήρια. Ανάλογα με τους παράγοντες που αναφέρθηκαν παραπάνω η συγκέντρωση των παθογόνων στα σφάγια κρέατος μπορεί να ποικίλει από 1 έως >30(MPN)/cm².

1.3.2.1 *Listeria* spp.

Κατά τα τελευταία 15 χρόνια ένας μεγάλος αριθμός ομαδικών κρουσμάτων έχει διαπιστωθεί σε αρκετές χώρες ενώ πολλαπλές είναι οι περιπτώσεις ανάκλησης τεράστιων ποσοτήτων κρεατοσκευασμάτων από την αγορά μετά τη διαπίστωση παρουσίας της *Listeria monocytogenes* (Cox and Bailey, 1999· Farber and Peterkin, 1999·2000· Swaminathan, 2001).

Σήμερα το γενικό κριτήριο κατάσχεσης ή οικειοθελούς απόσυρσης προϊόντων από την αγορά, από τις βιομηχανίες τροφίμων είναι η διαπίστωση της παρουσίας της *L. monocytogenes* σε 25 g. Στην Ελλάδα για την περίοδο 1993-1997 αναφέρεται μόνο ένα σποραδικό κρούσμα λιστερίωσης. Σε αντίθεση με την βελτίωση της επιδημιολογικής επιτήρησης είχαμε 7 το 1999 και 6 το 2000 (Schmidt and Tirado, 2001).

Οι λόγοι για τις αυξημένες περιπτώσεις λιστερίωσης στον άνθρωπο τα τελευταία χρόνια παραμένουν άγνωστοι. Ένας μεγάλος αριθμός οφείλεται στην καλύτερη διάγνωση και διερεύνηση. Άλλοι πιθανοί λόγοι είναι οι επερχόμενες αλλαγές στις διαιτητικές μας συνήθειες που περιλαμβάνουν την αυξημένη κατανάλωση έτοιμων τροφίμων ήπιας επεξεργασίας, με μεγάλο χρόνο συντήρησης στο ψυγείο, που πιθανόν να καταναλωθούν χωρίς νέα θέρμανση. Τέλος η συνεχής αύξηση του ποσοστού του πληθυσμού που αντιπροσωπεύεται από τα ηλικιωμένα και ανοσοκατεσταλμένα άτομα, είναι δυνατόν να αποτελεί ακόμα ένα λόγο.

Λόγω της σοβαρότητας της νόσου για τον άνθρωπο, η εμπλοκή των τροφίμων ως πηγών της λοίμωξης και η συχνή απομόνωση της *L. monocytogenes* από ωμά και επεξεργασμένα τρόφιμα, δημιούργησε ένα τεράστιο πρόβλημα για τη βιομηχανία τροφίμων και τις υπηρεσίες δημόσιας υγείας.

Από τα 7 είδη της *Listeria* spp μόνο η *L. monocytogenes* έχει την πιο μεγάλη σημασία για τη δημόσια υγεία. Ο μικρόοργανισμός αυτός είναι υπεύθυνος για αποβολές, περιγεννητική μηνιγγίτιδα, λοιμώξεις του κεντρικού νευρικού συστήματος με μηνιγγίτιδα και εγκεφαλίτιδα στους ενήλικες ή τοπικές λοιμώξεις που έχουν σχέση με το επάγγελμα (κτηνίατροι, σφαγείς, εργαστηριακοί). Η επώαση είναι από λίγες μέρες έως λίγες εβδομάδες, διάρκειας 2-3 βδομάδες και έχει θνητότητα 20-40%. Η νόσος είναι σπάνια σε υγιή άτομα. Το πεπτικό σύστημα είναι μάλλον ο κύριος τρόπος της λοίμωξης. Η επιδημιολογία των σποραδικών κρουσμάτων παραμένει αδιευκρίνιστη. Παρόλο που οι περισσότερες λοιμώξεις θεωρούνται τροφιμογενούς προέλευσης οι οδοί είναι πολλαπλοί (McLauchlin et al., 2004). Η δόση στα άτομα με προδιάθεση υπολογίζεται από 100-2.000 κύτταρα. Αντίθετα σε υγιή άτομα χρειάζονται πολλά εκατομμύρια.

Η λιστερίωση είναι συχνή στα αιγοπρόβατα, λιγότερο στις αγελάδες και πιο σπάνια στους χοίρους. Κύριο αίτιο είναι η *L. monocytogenes*. Ενσιρωμένες τροφές χωρίς καλή οξυγαλακτική ζύμωση αποτελούν πηγή μόλυνσης των ζώων. Όλα τα είδη του γένους *Listeria* spp. είναι ευρέως διαδεδομένα στη φύση και απομονώθηκαν από

πολλαπλές πηγές συμπεριλαμβανομένου του εδάφους, νερών, λυμάτων τροφίμων φυτικής και ζωικής προέλευσης, των κοπράνων των υγείων ζώων και το περιβάλλον των εργοστασίων τροφίμων όπου συχνά ενδημούν πληθυσμοί του μικροοργανισμού. Σήμερα θεωρείται μικροοργανισμός του εδάφους με τη δυνατότητα εισβολής από διάφορες οδούς, με ποικίλη μολυσματική δόση, συμπτωμάτων και εντοπισμών στους ιστούς του ανθρώπου και των ζώων και αδιευκρίνιστη και πολυπαραγοντική παθογένεια (Mc Lauchlin et al., 2004). Παρόλο που όλοι οι ορότυποι και τα στελέχη της *L. monocytogenes* θεωρούνται ως δυνητικά παθογόνα εν τούτοις ορισμένοι ορότυποι (4b, 1/2 a, 1/2b) εμφανίζονται παγκόσμια πλέον συχνά υπεύθυνοι για τις ομαδικές και τις διάσπαρτες λοιμώξεις (Tomprkin, 2002·Mc Lauchlin et al., 2004).

Στοιχεία από 20 χώρες δείχνουν ότι τα σφάγια και παρασκευάσματα νωπού κρέατος βοειδών, χοίρων και αρνιών ήταν θετικά για *L.monocytogenes* σε ποσοστά 0-50, 3-59 και 5-50% με κιμάδες να φτάνουν μέχρι 100% (Farber and Peterkin 1999·Okutami et al., 2004). *L .monocytogenes* βρέθηκε σε 69% των δειγμάτων πάστας αλλαντικών ελληνικών εργοστασίων πριν τη θέρμανση (Σεργκελίδης, 2000). Ο βαθμός μίανσης ωμών κρεάτων με *Listeria* spp. ήταν από 1 έως <21.000 cfu/g σύμφωνα με ξένα στοιχεία. Ελληνικά και ξένα στοιχεία δείχνουν ότι το περιβάλλον των εργοστασίων επεξεργασίας κρεάτων (δάπεδα, ψυγεία, μηχανήματα, αποχέτευση) είναι έντονα μiasμένο με *L.monocytogenes* και ως εκ τούτου υπάρχει μεγάλη δυνατότητα επιμόλυνσης των τελικών προϊόντων.

Ελληνικές μελέτες στην οικολογία της *L. monocytogenes* κατά τη σφαγή των χοίρων έδειξαν μια επιφανειακή μίανση 15,8 και 4,8% σε δύο δειγματοληψίες. Πριν και μετά το τελικό πλύσιμο των σφάγιων τα ποσοστά θετικότητας των επιφανειών μισού σφάγιου ήταν 2,2 και 0%, αντίστοιχα. Περιβαλλοντικά δείγματα στο περιβάλλον κοπής και επεξεργασίας νωπών κρεάτων έδειξαν την τεράστια σημασία εφαρμογής αυστηρών προγραμμάτων απορρύπανσης και απολύμανσης. Επιπλέον κοπή εντόπιων κρεάτων στις ίδιες επιφάνειες με εισαγόμενα αύξησε σημαντικά το επίπεδο επιμόλυνσης των πρώτων (Panoulis et al., 2003). Πιο συγκεκριμένα, ενώ μικροβιακή εικόνα εντόπιων κρεάτων έδειχναν μια καταπληκτική εικόνα με ποσοστά μόλυνσης 0-5% μετά την διαμείανση από εισαγόμενα κρέατα στα τεμαχιστήρια εργοστασίων το ποσοστό μίανσης ανήλθε σε ποσοστά 30-40% (Panoulis et al., 2003). Η παρουσία της *L.monocytogenes* γενικά σε εντόπια κρέατα σε συσκευασίες καταναλωτού (500-1000 g) ποίκιλε από 5,3 έως 66% για κιμάδες. Ο αριθμός των κυττάρων σε 83,3% των θετικών δειγμάτων ήταν <10/g και στα υπόλοιπα 25-490/g

(Genigeorgis, 2005). Σε δεκαπενθήμερες αναλύσεις του ίδιου τύπου νωπών κρεατοσκευασμάτων και για ένα τετράμηνο διαπιστώθηκε παρουσία *L. monocytogenes* σε 6,8, 13,6, 29,5% στις χοιρινές μπριζόλες, τηγανιά, και κιμά αντίστοιχα. Η συγκέντρωση της *L. monocytogenes* στα δύο πρώτα προϊόντα στα δύο πρώτα προϊόντα ήταν <10/g ενώ στον κιμά ήταν από <10-209 κύτταρα/g. Τα στοιχεία αυτά δείχνουν την επίπτωση του αυξημένου βαθμού κοπής των κρεάτων στη διασπορά και την αύξηση της θετικότητας των παθογόνων μικροοργανισμών σε αυτά (Genigeorgis, 2005). Στα κρέατα εισαγωγής η *L. monocytogenes* βρέθηκε σε ποσοστά 34,5% (Genigeorgis, 2005). Στοιχεία από 13 χώρες δείχνουν την παρουσία της *L. monocytogenes* και *Listeria* spp. στα έτοιμα για κατανάλωση κρεατοσκευάσματα σε ποσοστό 0-72 και 0-93, αντίστοιχα (Farber and Peterkin, 1999·2000· Cox and Bailey, 1999· Okutani et al., 2004). Στα περισσότερα δείγματα ο αριθμός των κυττάρων της *L. monocytogenes* ήταν 20-1000 με μερικά δείγματα μέχρι 10^6 cfu/g. Ελληνικά στοιχεία δείχνουν μια σημαντική μείωση της παρουσίας της *L. monocytogenes* σε κρεατοσκευάσματα, από 20-35% την περίοδο 1990-3 σε κάτω από 5% το 2000-4 (Panoulis, 2005).

1.4 Μικροοργανισμοί ως δείκτες ποιότητας και ασφάλειας των τροφίμων

Μικροοργανισμοί δείκτες είναι ομάδες ή είδη μικροοργανισμών οι οποίοι μπορούν εύκολα να προσδιορισθούν και των οποίων η παρουσία όταν υπερβαίνει ορισμένα προκαθορισμένα όρια για κάθε είδος τροφίμου, θεωρείται ένδειξη παραμονής του τροφίμου σε συνθήκες στις οποίες είναι πιθανή η μίανση του με παθογόνους μικροοργανισμούς ή ευνοείται η αύξηση των παθογόνων μικροοργανισμών. Η παρουσία των μικροοργανισμών δεικτών στα τρόφιμα σε πληθυσμό που υπερβαίνει ένα προκαθορισμένο όριο σε cfu/g τροφίμου δεν συνεπάγεται την ύπαρξη παθογόνων μικροοργανισμών αλλά καθιστά πιθανή την παρουσία τους. Οι μικροοργανισμοί δείκτες αντανακλούν τη μικροβιολογική ποιότητα των τροφίμων σε σχέση με τη διάρκεια συντηρήσεως τους ή την ασφάλεια των τροφίμων από τους παθογόνους μικροοργανισμούς. Οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται συνήθως ως δείκτες της ασφάλειας των τροφίμων είναι τα εντεροβακτήρια (Οικ. *Enterobacteriaceae*), κολοβακτηριοειδή (coliforms), κολοβακτηριοειδή κοπράνων (faecal coliforms), *Escherichia coli* και εντερόκοκκοι (Κοτζεκίδου, 1993).

Εθνικές και διεθνείς συμβουλευτικές επιτροπές των οργανισμών FAO/WHO και το εθνικό συμβούλιο έρευνας μικροβιολογικών κριτηρίων των Ηνωμένων Πολιτειών, έχουν καταλήξει σε κοινό συμπέρασμα, ότι είναι άκυρο να προβλέπεται η ασφάλεια των τροφίμων βασιζόμενη στα επίπεδα των εντεροβακτηρίων, κολοβακτηριοειδών, κολοβακτηριοειδών κοπράνων ή *Escherichia coli*. Στοιχεία από το 1994, που παρουσιάστηκε κρούσμα με *Salmonella enteritidis* σε παγωτό ενισχύει αυτή την άποψη. Κύτταρα της *S. enteritidis* σε παγωτό ήταν αρκετά για να προκαλέσουν δηλητηρίαση κοντά σε 250.000 άτομα παρά τις χαμηλές μετρήσεις σε κολοβακτηριοειδή και *E.coli* (<1 cfu/g). Πολυάριθμες έρευνες έχουν οδηγήσει στο συμπέρασμα ότι κολοβακτηριοειδή, κολοβακτηριοειδή κοπράνων, εντεροβακτήρια και *E. coli* είναι αναξιόπιστα όταν χρησιμοποιούνται ως δείκτες της μίανση των τροφίμων με παθογόνα (American Public Health Association, 2001).

Η καταλληλότερη εφαρμογή των δοκιμών με κολοβακτηριοειδή, κολοβακτηριοειδή κοπράνων, εντεροβακτήρια και *E.coli* αφορά την εκτίμηση της συνολικής ποιότητας του τροφίμου και των συνθηκών υγιεινής κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας του τροφίμου. Για παράδειγμα, η καταμέτρηση αυτών των οργανισμών στη παστερίωση των τροφίμων, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να εκτιμηθεί η αρτιότητα σχεδίασης της διαδικασίας παστερίωσης για να καταστραφούν οι βλαστικές μορφές των βακτηρίων. Ο *E. coli* χρησιμοποιήθηκε το 1927, από μικροβιολόγο γαλακτοκομικών προϊόντων, για να εκτιμηθεί η διαδικασία παστερίωσης στο γάλα, όπου τελικά η μίανση προερχόταν από τις φιάλες. Η παρουσία του *E.coli* στο παστεριωμένο γάλα ίσως δηλώνει ανεπαρκή παστερίωση, μη εφαρμογή κανόνων υγιεινής στην επεξεργασία και/ή μίανση μετά την επεξεργασία λόγω του ότι κατάλληλη παστερίωση καταστρέφει τα επίπεδα του *E.coli* που προβλέπονταν στο νωπό γάλα (American Public Health Association, 2001).

Οι μικροοργανισμοί δείκτες πρέπει να πληρούν τα εξής κριτήρια:

- Να υπάρχουν και να μπορούν να προσδιοριστούν στο προϊόν του οποίου η ποιότητα αξιολογείται.
- Η ανάπτυξη τους και ο πληθυσμός τους να είναι αντιστρόφως ανάλογος της ποιότητας του τροφίμου.
- Να μπορούν εύκολα να ανιχνευθούν, να καταμετρηθούν και να ξεχωρίζονται από άλλους μικροοργανισμούς.
- Να μπορούν να καταμετρηθούν σε μικρό χρονικό διάστημα.

° Η ανάπτυξη τους να μην παρεμποδίζεται από άλλους μικροοργανισμούς που απαντώνται στη μικροχλωρίδα του τροφίμου.

Πρέπει να αναφερθεί ότι εκτός από τους μικροοργανισμούς, χρησιμοποιούνται και προϊόντα μεταβολισμού τους για την αξιολόγηση της ποιότητας ορισμένων τροφίμων. Παρουσιάζουν το πλεονέκτημα ότι προσδιορίζονται εύκολα και τα αποτελέσματα της εξέτασης είναι γνωστά σε μικρό χρονικό διάστημα.

1.4.1 Ορισμοί

Όταν στη συγκεκριμένη μελέτη, χρησιμοποιείται ο όρος «εντεροβακτήρια» είναι για να περιγράψει συνολικά τα κολοβακτηριοειδή, τα κολοβακτηριοειδή κοπράνων, το *Escherichia coli* και άλλα βακτήρια που ανήκουν στην οικογένεια Enterobacteriaceae (π.χ. *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Erwinia*, *Proteus*).

Οι ορισμοί που χρησιμοποιούνται για τα «κολοβακτηριοειδή» και «κολοβακτηριοειδή κοπράνων», λειτουργούν περισσότερο σαν έννοιες, αφού αυτές οι ομάδες δεν έχουν καμία ταξινομική ισχύ. «Κολοβακτηριοειδή» και «κολοβακτηριοειδή κοπράνων», χρησιμοποιούνται πρακτικά για αυτούς τους μικροοργανισμούς που ανιχνεύονται με τη δοκιμή των κολοβακτηριοειδών και τη δοκιμή κολοβακτηριοειδών κοπράνων αντίστοιχα.

1.4.2 Εντεροβακτήρια (Οικ. Enterobacteriaceae)

Τα εντεροβακτήρια αποτελούν μια σχετικά ομοιογενή φυλογενετική ομάδα των γ-πρωτεοβακτηρίων και έχουν τα ακόλουθα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά: αρνητικά κατά Gram, μη σποριογόνα, ραβδόμορφα, ακίνητα ή αυτοκινούμενα με περίτριχα μαστίγια, προαιρετικά αναερόβια, αρνητικά στη δοκιμή οξειδάσης, ζυμώνουν τη γλυκόζη προς οξύ, με σχετικά απλές διατροφικές απαιτήσεις. Αυτή η οικογένεια περιλαμβάνει τα γένη: *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Providencia*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella* και *Yersinia* (Madigan, 2005).

Τα εντεροβακτήρια (εντερικά βακτήρια) χρησιμοποιούνται χρόνια στην Ευρώπη σαν δείκτες ποιότητας και ασφάλειας τροφίμων. Η χρήση των κολοβακτηριοειδών ως δεικτών ποιότητας και υγιεινής στο περιβάλλον επεξεργασίας του τροφίμου βασίζεται

κατά παράδοση στις Ηνωμένες Πολιτείες. Η παραπάνω πρακτική βασίζεται αυθαίρετα στην απόφαση σχετικά με τη ποιότητα του τροφίμου ή την υγιεινή των εγκαταστάσεων, στην ανάκτηση των μελών της *Enterobacteriaceae* που ζυμώνουν τη λακτόζη, αγνοώντας κατά συνέπεια την παρουσία των μελών που δεν ζυμώνουν τη λακτόζη. Οι Mossel et al. σύστησε την δοκιμή του τροφίμου για τα εντεροβακτήρια παρά για τα κολοβακτηριοειδή στην προσπάθεια να αξιολογήσει καλύτερα τα θετικά και αρνητικά λακτόζης, μέλη της μικροχλωρίδας του τροφίμου (American Public Health Association, 2001).

1.4.2.1 Κολοβακτηριοειδή (coliforms)

Ο όρος «κολοβακτηριοειδή» φαίνεται να επινοήθηκε από τον Blachstein το 1893, για να αναφερθεί σε βακίλους, οι οποίοι είχαν κοινά γνωρίσματα με το *E. coli* και σχημάτιζαν παρόμοιες αποικίες. Η ομάδα των κολοβακτηριοειδών καθορίστηκε με βάση βιοχημικούς μηχανισμούς και όχι λόγω γενετικής συγγένειας. Και ως εκ τούτου ο όρος «κολοβακτηριοειδή» δεν έχει καμία ταξινομική ισχύ. Τα κολοβακτηριοειδή είναι οργανισμοί αερόβιοι και προαιρετικά αναερόβιοι, gram αρνητικοί, μη σποριογόνοι, ραβδόμορφοι, που ζυμώνουν τη λακτόζη και σχηματίζουν οξύ και αέριο σε 48 ώρες σε θερμοκρασία 35 °C. Το μέσο δοκιμής περιλαμβάνει ποικίλα υγρά ή στερεά υλικά που περιέχουν λακτόζη καθώς και προσθήκη χρωστικών. Αντιπρόσωποι 20 ή και περισσότερων ειδών ίσως να ταξινομούνται στα κολοβακτηριοειδή, χρησιμοποιώντας ως καθοριστικό κριτήριο τον σχηματισμό αερίου από τον μεταβολισμό της λακτόζης. Ακόμα καλύτερα είναι δυνατόν να διακριθούν τα κολοβακτηριοειδή βάσει της αντίδρασης της β-γαλακτοζιδάσης. Ο προσδιορισμός μπορεί να βασίζεται επίσης στο χρώμα των σχηματιζόμενων τελικών προϊόντων ή στην πτητική ο-νιτροφαινόλη. Εντούτοις δοκιμές με τη χρήση συνθετικών υποστρωμάτων για τη β-γαλακτοζιδάση ίσως προσδιορίζουν εντεροβακτήρια που δεν σχηματίζουν αέριο κατά τη ζύμωση της λακτόζης στην MPN δοκιμή και συνεπώς δεν ταξινομούνται ως κολοβακτηριοειδή (American Public Health Association, 2001).

1.4.2.2 Κολοβακτηριοειδή κοπράνων (Faecal coliforms)

Ως «κολοβακτηριοειδή κοπράνων» αναφέρονται αυτά τα κολοβακτηριοειδή τα οποία μπορούν να σχηματίσουν οξύ και αέριο σε 48 ώρες σε θερμοκρασία 44.5- 45.5 °C, σε EC broth. Με τη δοκιμή αυτή ίσως να ανιχνεύονται στελέχη του *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter spp* (*E. aggfomerans*, *E. aerogenes* και *E. cloacae*) και *Citrobacter*. Ο όρος «κολοβακτηριοειδή κοπράνων» όπως και τα κολοβακτηριοειδή δεν έχουν καμία ταξινόμική ισχύ. Ο όρος «θερμοανθεκτικά κολοβακτηριοειδή» χρησιμοποιείται μερικές φορές για να αναφερθεί σε αυτούς τους οργανισμούς και αποτελεί ενδεχομένως πιο ακριβή περιγραφή από το «κολοβακτηριοειδή κοπράνων». Η δοκιμή των κολοβακτηριοειδών με επώαση σε υψηλές θερμοκρασίες για τον διαχωρισμό των κολοβακτηριοειδών κοπράνων από τα άλλα κολοβακτηριοειδή, ξεκίνησε με τον Eijkman το 1904 και αρχικά χρησιμοποιήθηκε για να αξιολογηθεί περιττωματική μίανση του νερού. Η επώαση σε υψηλή θερμοκρασία και ο σχηματισμός αερίου από τη λακτόζη δεν μπορεί πραγματικά να διακρίνει αν οι οργανισμοί δημιουργούνται στο έντερο ή τα περιττώματα. Η δοκιμή των κολοβακτηριοειδών κοπράνων είναι ουσιαστικά μια μικρότερη μορφή της *E. coli* MPN δοκιμής που δεν περιλαμβάνει την απομόνωση ή τις χρονοβόρες και κοπιώδεις IMViC δοκιμές που χρησιμοποιούνται παραδοσιακά για να ανιχνεύσουν το *E.coli*. Εντούτοις, αναπτύχθηκε μια δοκιμή IMViC 48 ωρών που προσφέρει το πλεονέκτημα της επαφής σε στερεά μέσα με διαφορετικές χημικές ουσίες, των πολύ υψηλότερων βακτηριακών πληθυσμών σε μια αποικία όπως με τις παραδοσιακές δοκιμές που χρησιμοποιούν υγρή καλλιέργεια. Οι αντιδράσεις μπορούν να «διαβαστούν» σε απλό τριβλίο.

Ποικιλία θερμοκρασιών επώασης χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό των κολοβακτηριοειδών κοπράνων. Η θερμοκρασία των 45.5±0.2°C είναι η ευρέως χρησιμοποιούμενη για τα τρόφιμα. Σύμφωνα με άλλα στοιχεία η επώαση σε EC broth στους 45.5°C ίσως είναι ιδανική για το *E.coli*. ενώ η επώαση στους 44.5°C μπορεί να παράγει ελαφρώς υψηλότερο αριθμό κολοβακτηριδίων κοπράνων. Σύμφωνα με τα παραπάνω στοιχεία, μια θερμοκρασία επώασης στους 45 ± 0.2 °C για όλες τις δοκιμές θα ήταν ένας λογικός συμβιβασμός (American Public Health Association, 2001).

1.4.2.3 *Escherichia coli*

Το βακτήριο *E. coli* αποτελεί πιο εξειδικευμένο δείκτη υγειονομικής σημασίας. Η παρουσία του *E. coli* προσδιορίζεται με μια σειρά βιοχημικών δοκιμών, που είναι γνωστή με τη συνοπτική ονομασία IMViC, όπου το I αναφέρεται στη παραγωγή ινδόλης από το μεταβολισμό της τρυπτοφάνης, το M δείχνει τη δυνατότητα του οργανισμού να σχηματίζει οξύ από γλυκόζη όπως ανιχνεύεται από την αντίδραση του ερυθρού του μεθυλενίου, το V αναφέρεται στην παραγωγή 2,3-βουτανεδιόλης και/ή ακετοΐνης από το μεταβολισμό της γλυκόζης, γνωστή σαν αντίδραση Voges-Proskauer και το C αντιπροσωπεύει τη δυνατότητα του βακτηρίου να αποικοδομεί τα κιτρικά ιόντα ως μόνη πηγή άνθρακα. Με αυτές τις βιοχημικές δοκιμές η *E. coli* πιστοποιείται ως εξής : + + - - (Τύπος I) και - + - - (Τύπος II).

1.4.3 Εντερόκοκκοι

Οι εντερόκοκκοι αποτελούσαν παλαιότερα ομάδα του γένους *Streptococcus*, αλλά από το 1984 αποτελούν το γένος *Enterococcus* το οποίο περιλαμβάνει 16 είδη. Ιδιαίτερη σημασία για τα τρόφιμα έχουν ο *Enterococcus faecalis* και ο *Enterococcus faecium*. Όλα σχεδόν τα βακτήρια του γένους *Enterococcus* απαντώνται στον εντερικό σωλήνα και στα κόπρανα των ζώων.

Οι περισσότεροι εντερόκοκκοι αναπτύσσονται σε θερμοκρασία από 10°C έως 45°C, ενώ τα είδη *E. faecalis* και *E. faecium* αναπτύσσονται σε θερμοκρασίες από 0°C έως 50°C. Αναπτύσσονται σε μεγάλο εύρος τιμών pH από 3,3 έως 9,6. Είναι μικροαερόφιλα βακτήρια και δεν παράγουν καταλάση. Οι εντερόκοκκοι παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στην ψύξη, στην κατάψυξη, στην αφυδάτωση και στις ουσίες αλιπάσωσης του κρέατος, γι'αυτό θεωρούνται κατάλληλοι δείκτες της υγειονομολογικής κατάστασης των τροφίμων που υφίστανται μια από τις παραπάνω μεθόδους επεξεργασίας. Ειδικά στα κατεψυγμένα τρόφιμα οι εντερόκοκκοι θεωρούνται καλύτεροι δείκτες της υγειονομολογικής τους κατάστασης από τα κολοβακτηριοειδή, επειδή ο αριθμός τους δεν ελαττώνεται στη διάρκεια διατήρησης του προϊόντος στην κατάψυξη (Κοτζεκίδου, 1993).

1.5 Μέτρα υγιεινής σε χώρους στους οποίους το κρέας προετοιμάζεται, επεξεργάζεται, διατηρείται, εκτίθεται και πωλείται

Γενικές αρχές υγιεινής των τροφίμων του Codex Alimentarius και νομοθετικές διατάξεις (Π.Δ. 79/2007, Κανονισμός 853/2004, Κανονισμός 854/2004, Οδηγία 2004/41/ΕΚ, ΚΥΑ15523/ΦΕΚ 1187) ενθαρρύνουν τις επιχειρήσεις τροφίμων να εφαρμόζουν κανόνες υγιεινής πρακτικής.

Στα κρεοπωλεία πρέπει να εφαρμόζονται μέτρα υγιεινής προκειμένου να διασφαλίζεται η υγιεινή των τροφίμων και η συμμόρφωση με τη νομοθεσία. Παρακάτω θα αναφερθούμε σε γενικές και ειδικές απαιτήσεις που αφορούν την εφαρμογή των Κανόνων Υγιεινής στα κρεοπωλεία καθώς και οδηγίες για τη συμμόρφωση με τη νομοθεσία.

1.5.1 Γενικές απαιτήσεις για τους χώρους

Σχεδιασμός και κατασκευή κρεοπωλείων¹

- Οι χώροι τροφίμων διατηρούνται καθαροί και σε καλή κατάσταση.
- Τα κρεοπωλεία πρέπει να έχουν απαραίτητα τους παρακάτω **χώρους**:
 - Χώρος παραλαβής.
 - Χώρος αποθήκευσης (ξηρά, ψύξη, κατάψυξη, ανάλογα με τις ανάγκες της επιχείρησης).
 - Χώρος επεξεργασίας και χειρισμού κρέατος και παραγωγής προϊόντων αυτού θεωρούνται όλοι οι χώροι του κτιρίου στους οποίους το κρέας και τα προϊόντα αυτού προετοιμάζονται, επεξεργάζονται, διατηρούνται.
 - Χώρος πώλησεως κρέατος, προϊόντων κρέατος κ.λπ.
 - Αποδυτήρια προσωπικού / Χώροι υγιεινής.
 - Χώρος πλυσίματος σκευών.

¹ [Σημείωση: Στο παρακάτω κείμενο όσες προτάσεις φέρουν στο μπροστινό μέρος το σύμβολο "•" ή αριθμό, πρόκειται για απαιτήσεις που αφορούν την εφαρμογή των Κανόνων Υγιεινής στα κρεοπωλεία και όσα φέρουν το σύμβολο "ο" πρόκειται για οδηγίες για τη συμμόρφωση με την νομοθεσία.]

Χώροι πλύσεως, νιπτήρες

- Πρέπει να υπάρχει επαρκής αριθμός νιπτήρων εγκατεστημένων στα κατάλληλα σημεία και προοριζομένων ειδικά για το πλύσιμο των χεριών.

Εξαερισμός

- Πρέπει να υπάρχουν κατάλληλα και επαρκή μέσα μηχανικού ή φυσικού αερισμού.

Φωτισμός

- Οι χώροι των τροφίμων πρέπει να έχουν επαρκή φυσικό ή/ και τεχνητό φωτισμό

Αποχετεύσεις

- Οι αποχετευτικές εγκαταστάσεις πρέπει να είναι επαρκείς για τον επιδιωκόμενο σκοπό και σχεδιασμένες και κατασκευασμένες με τρόπο που να μην δημιουργείται κίνδυνος μόλυνσης των τροφίμων.

Αποδυτήρια

- Όπου είναι αναγκαίο, πρέπει να προβλέπονται αποδυτήρια, σε επαρκή αριθμό για το προσωπικό.

1.5.2 Ειδικές απαιτήσεις για τους χώρους επεξεργασίας – προετοιμασίας-έκθεσης και πώλησης τροφίμων**➤ Δάπεδα και τοίχοι**

- Οι επιφάνειες των δαπέδων πρέπει να διατηρούνται σε καλή κατάσταση και να καθαρίζονται και, όπου είναι αναγκαίο, να απολυμαίνονται εύκολα, πράγμα που απαιτεί τη χρήση στεγανών, μη απορροφητικών, μη τοξικών υλικών, τα οποία πλένονται.

➤ **Οροφές**

- Οι οροφές, οι ψευδοροφές και ότι είναι στερεωμένο σε αυτές, πρέπει να είναι σχεδιασμένες, κατασκευασμένες και επιστρωμένες έτσι ώστε :
 - να μην συσσωρεύονται ρύποι,
 - να περιορίζεται η συμπύκνωση υδρατμών, και η ανάπτυξη ανεπιθύμητης μούχλας,
 - και η αποκόλληση σωματιδίων.

Επιφάνειες που έρχονται σε επαφή με τα τρόφιμα

Γενικές απαιτήσεις για τις επιφάνειες (συμπεριλαμβανομένων των επιφανειών εξοπλισμού) που έρχονται σε επαφή με τα τρόφιμα:

- Οι επιφάνειες (συμπεριλαμβανομένων των επιφανειών εξοπλισμού), που έρχονται σε επαφή με τα τρόφιμα, πρέπει να διατηρούνται σε καλή κατάσταση και να καθαρίζονται και όπου είναι αναγκαίο, να απολυμαίνονται εύκολα.
- Αυτό απαιτεί τη χρήση λείων, μη τοξικών υλικών.
- Αυτή η απαίτηση αφορά όλες τις επιφάνειες που έρχονται σε άμεση επαφή με το κρέας και τα προϊόντα του, κατά την επεξεργασία, προετοιμασία και διατήρησή του.
 - Η επιφάνεια κοπής του κρέατος μπορεί να είναι από ξύλο ή τεφλόν. Συνιστάται η περιορισμένη χρήση του ξύλου, ως επιφάνειας κοπής (κούτσουρο), και μόνο για βαριές εργασίες.
 - Τα εξαρτήματα της μηχανής του κιμά τα οποία είναι εκτεθειμένα θα πρέπει να καλύπτονται για να προφυλάσσονται από κάθε είδους ρύπανση ή μόλυνση.
 - Απαιτείται η αντικατάσταση των τμημάτων των επιφανειών όταν φθείρονται, ειδικά στην περίπτωση χρησιμοποίησης ξύλου.
 - Στην περίπτωση που οι πάγκοι εργασίας εφάπτονται των τοίχων, θα πρέπει να διασφαλίζεται ότι δε δημιουργείται κενό γεγονός που καθιστά δύσκολο τον καθαρισμό τους.
 - Για να διευκολύνεται ο αποτελεσματικός καθαρισμός του δαπέδου κάτω από τους πάγκους εργασίας, θα πρέπει να τοποθετούνται ρόδες στους πάγκους για να μετακινούνται εύκολα. Εάν οι πάγκοι διαθέτουν ράφια, τότε το τελευταίο θα πρέπει να απέχει από το δάπεδο τουλάχιστον 15 εκατοστά.

Καθαρισμός-Απολύμανση

- Για τον καθαρισμό και την απολύμανση των εργαλείων και του εξοπλισμού εργασίας πρέπει να προβλέπονται, εάν χρειάζονται, κατάλληλες εγκαταστάσεις. Οι εγκαταστάσεις αυτές πρέπει να είναι κατασκευασμένες από υλικό ανθεκτικό στη διάβρωση, να καθαρίζονται εύκολα και να διαθέτουν επαρκή παροχή ζεστού και κρύου νερού.
- Η υγιεινή του κρέατος και των προϊόντων του εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τον καθαρισμό (πλύσιμο) και την απολύμανση των εργαλείων, σκευών και γενικά του εξοπλισμού που χρησιμοποιήθηκε για την επεξεργασία και την προετοιμασία τους. Με τον καθαρισμό απομακρύνεται η ορατή ρύπανση από τις επιφάνειες, ενώ με την απολύμανση καταστρέφονται οι ζωντανοί μικροοργανισμοί και σπανιότερα τα σπόριά τους.

Πλύσιμο τροφίμων

- Κάθε νεροχύτης ή άλλη παρόμοια εγκατάσταση για το πλύσιμο των τροφίμων πρέπει να διαθέτει επαρκή παροχή ζεστού ή /και κρύου πόσιμου νερού ανάλογα με τις ανάγκες και να καθαρίζεται τακτικά.

1.5.3 Μεταφορά

1. Τα μεταφορικά οχήματα ή/και οι περιέκτες που χρησιμοποιούνται για τη μεταφορά τροφίμων, πρέπει να διατηρούνται καθαρά και σε καλή κατάσταση, ώστε να προφυλάσσονται τα τρόφιμα από μολύνσεις.
 - Τα προϊόντα προς μεταφορά θα πρέπει να ψυχθούν ώστε η θερμοκρασία τους κατά τη φόρτωση και διακίνηση να είναι ως εξής:
 - σφάγια και παραπροϊόντα $\leq 7^{\circ}\text{C}$
 - νωπό κρέας $\leq 3^{\circ}\text{C}$
 - πουλερικά $\leq 4^{\circ}\text{C}$
 - προϊόντα βαθιάς κατάψυξης $\leq - 18^{\circ}\text{C}$
2. Όταν τα μεταφορικά οχήματα ή /και περιέκτες χρησιμοποιούνται για τη μεταφορά άλλων προϊόντων και όχι τροφίμων, ή για τη μεταφορά διαφορετικών ειδών τροφίμων, πρέπει τα προϊόντα, όπου απαιτείται, να διατηρούνται χωριστά για να

προφυλάσσονται από τυχόν μόλυνση και να γίνεται αποτελεσματικός καθαρισμός μεταξύ των φορτώσεων ώστε να αποφεύγεται ο κίνδυνος μόλυνσης.

3. Τα μέσα μεταφοράς του κρέατος/ πουλερικών αυτού πρέπει να ανταποκρίνονται στην ακόλουθη απαίτηση:
τα εσωτερικά τοιχώματά τους ή κάθε άλλο τμήμα που δύναται να έλθει σε επαφή με το κρέας πρέπει να κατασκευάζονται από υλικά ανθεκτικά στη διάβρωση και μη δυνάμενα να αλλοιώσουν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του κρέατος ούτε να το καταστήσουν επιβλαβές για την ανθρώπινη υγεία.
4. Όπου είναι αναγκαίο, τα μεταφορικά οχήματα ή /και οι περιέκτες που χρησιμοποιούνται για τη μεταφορά τροφίμων, πρέπει να έχουν την ικανότητα να τα διατηρούν στην κατάλληλη θερμοκρασία.
 - Η φόρτωση γίνεται όταν το μεταφορικό μέσο αποκτήσει την κατάλληλη θερμοκρασία όσο το δυνατόν πιο γρήγορα.
 - Ο έλεγχος της θερμοκρασίας κατά τη μεταφορά γίνεται με:
 - εφοδιασμό των μεταφορικών οχημάτων με θερμόμετρα και κατάλληλο εξοπλισμό καταγραφής και ελέγχου των συνθηκών μεταφοράς (ψύξης, κατάψυξης)
 - την παροχή φορητών θερμομέτρων σαν εναλλακτική λύση.

1.5.4 Απαιτήσεις εξοπλισμού

- Κάθε αντικείμενο, εγκατάσταση ή εξοπλισμός, με τα οποία έρχονται σε επαφή οι τροφές, πρέπει να διατηρούνται καθαρά και:
 - (α) Να κατασκευάζονται και να συντηρούνται έτσι ώστε να ελαχιστοποιείται ο κίνδυνος μόλυνσης των τροφίμων.
 - (β) Με εξαίρεση τα δοχεία και τις συσκευασίες μιας χρήσεως, να κατασκευάζονται και να συντηρούνται έτσι ώστε να μπορούν να καθαρίζονται σε βάθος.
 - **Ζυγοί:** Οι ζυγοί πρέπει να έχουν ανοξειδώτες πλατφόρμες
 - **Άγγιστα** (Γάντζοι–Τσιγκέλια–Πολυγάντζοι): Όταν χρησιμοποιούνται για την απ'ευθείας ανάρτηση (άμεση επαφή) του κρέατος πρέπει να είναι από ανοξειδωτο υλικό.

- **Επιφάνειες τεμαχισμού κρέατος:** Ο εξοπλισμός για τον τεμαχισμό του κρέατος πρέπει να έχει κατάλληλες πλαστικές ή ανοξείδωτες επιφάνειες κοπής. Πρέπει να προβλέπονται διαφορετικές επιφάνειες για τον τεμαχισμό πουλερικών.
- **Δοχεία – περιέκτες:** Τα δοχεία και οι περιέκτες που χρησιμοποιούνται για το κρέας και τα παραπροϊόντα πρέπει να είναι κατασκευασμένα από κατάλληλο πλαστικό ή ανοξείδωτο υλικό, να πλένονται και να απολυμαίνονται μετά τη χρήση τους.
- **Μαχαίρια – εργαλεία:** Τα μαχαίρια και όλα τα υπόλοιπα εργαλεία πρέπει να είναι κατασκευασμένα έτσι ώστε να καθαρίζονται εύκολα και να μη σπάνε. Οι λαβές πρέπει να είναι από πλαστικό ή άλλο κατάλληλο υλικό. Τα μαχαίρια και τα εργαλεία που χρησιμοποιούνται για τον τεμαχισμό του κρέατος πρέπει να χρησιμοποιούνται αποκλειστικά για τον σκοπό αυτό.
- **Εξοπλισμός κοπής κιμά και κοπής σνίτσελ:** Οι μηχανές κοπής κιμά, κοπής σνίτσελ, τα εργαλεία και ο υπόλοιπος εξοπλισμός πρέπει να αποσυναρμολογείται και να καθαρίζεται αποτελεσματικά.
- **Βιτρίνες - προθήκες έκθεσης- ψύξεως:** Ο εξοπλισμός που χρησιμοποιείται για την έκθεση του κρέατος (βιτρίνες έκθεσης κρέατος) πρέπει να είναι κατασκευασμένος από υλικά που να μπορούν να καθαρίζονται εύκολα.
- **Δίσκοι επίδειξης:** Οι δίσκοι επίδειξης που τοποθετούνται σε ψυχόμενους χώρους ή βιτρίνες έκθεσης ή προθήκες πρέπει να είναι κατασκευασμένοι από πλαστική ύλη ή ανοξείδωτο υλικό.
- Απαγορεύεται η χρήση πλαστικών λουλουδιών και άλλων διακοσμητικών στοιχείων για το στολισμό της βιτρίνας. Εξαιρείται η χρήση νωπών λαχανικών με την προϋπόθεση ότι αυτά έχουν εξυγιανθεί.
- Ο εξοπλισμός ψύξης πρέπει να έχει κατάλληλο σύστημα αποστράγγισης ώστε οι συμπυκνούμενοι υδρατμοί να μην στάζουν και επιμολύνουν το κρέας.

(γ) Να είναι εγκατεστημένα κατά τρόπο που να επιτρέπει επαρκή καθαρισμό των πέριξ χώρων.

1.5.5 Απορρίματα

1. Απορρίματα τροφών και άλλα απορρίματα δεν πρέπει να αφήνονται να συσσωρεύονται σε χώρους τροφίμων, παρά μόνο στο βαθμό που αυτό είναι αναπόφευκτο για τη σωστή λειτουργία της επιχείρησης.
 - Τα κρέατα που δεν προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση, καθώς και τα προϊόντα που έχουν μολυνθεί ή αλλοιωθεί, πρέπει να καταστρέφονται, παρουσία της αρμόδιας αρχής, και να απορρίπτονται.
2. Τα απορρίματα τροφίμων και τα άλλα απορρίματα πρέπει να εναποτίθενται σε περιέκτες που να κλείνουν.
3. Πρέπει να υπάρχει κατάλληλη πρόβλεψη για την απομάκρυνση και την αποθήκευση απορριμμάτων τροφών ή άλλων απορριμμάτων.
 - Κανονισμός 1774/2002 «για τον καθορισμό υγειονομικών κανόνων σχετικά με τα ζωικά υποπροϊόντα που δεν προορίζονται για κατανάλωση από τον άνθρωπο».

1.5.6 Παροχή νερού

- **Νερό** [Απαιτήσεις της νομοθεσίας]
 - Από τις 25.12.2003 θα πρέπει να πληρούνται οι προδιαγραφές για το νερό ανθρώπινης κατανάλωσης (πόσιμο) όπως αναφέρονται στην Κοινή Υπουργική Απόφαση Υ2/2600/2001 (ΦΕΚ 892/Β/11.07.2001, «Περί της ποιότητας νερού ανθρώπινης κατανάλωσης» σε συμμόρφωση προς την οδηγία 98/83/ΕΚ του Συμβουλίου της Ε.Ε. της 3ης .11.1998.

1.5.7 Προσωπικό, υγεία και ατομική υγιεινή

1. Απαιτείται υψηλός βαθμός ατομικής καθαριότητας, από κάθε πρόσωπο που κινείται σε χώρους όπου γίνονται εργασίες με τρόφιμα.
2. Απαγορεύεται η, με οποιαδήποτε ιδιότητα, απασχόληση, σε χώρους εργασίας με τρόφιμα οποιουδήποτε ατόμου είναι γνωστό ή υπάρχουν υπόνοιες ότι πάσχει από νόσημα που μεταδίδεται δια των τροφών, ή ατόμου που πάσχει.

1.5.8 Προστασία της ασφάλειας του κρέατος και των προϊόντων του

Παραλαβή

1. Η επιχείρηση τροφίμων δεν πρέπει να δέχεται καμία πρώτη ύλη ή συστατικό, εάν γνωρίζει ή έχει βάσιμους λόγους να υποπτεύεται ότι, έχει προσβληθεί από παράσιτα, παθογόνους μικροοργανισμούς ή τοξικές, αποσυντεθειμένες ή ξένες ουσίες σε βαθμό που, μετά τη συνήθη διαλογή ή/ και τις προπαρασκευαστικές διαδικασίες ή διαδικασίες επεξεργασίας που εφαρμόζουν οι επιχειρήσεις τροφίμων σύμφωνα με τους κανόνες της υγιεινής, θα είναι και πάλι ακατάλληλο προς βρώση.
 - Κατά την παραλαβή ελέγχονται τα παρακάτω, ώστε να διασφαλιστεί η ποιότητα των προϊόντων που παραλαμβάνονται:
 - Η κατάσταση υγιεινής και θερμοκρασία μεταφορικών μέσων.
 - Η θερμοκρασία των προϊόντων
 - Η τοποθέτηση προϊόντων μέσα στα μεταφορικά μέσα και η παρουσία αντικειμένων ή προϊόντων που δυνητικά θέτουν σε κίνδυνο τα τρόφιμα.
 - Τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, με μακροσκοπικό έλεγχο. Γίνεται έλεγχος για ανεπιθύμητα χαρακτηριστικά όπως οσμή από χημικές ουσίες ή καύσιμα, σημάδια αλλοίωσης όπως μούχλα ή σήψη.
 - Η συσκευασία των πρώτων υλών, η οποία θα πρέπει να είναι άθικτη, ακέραια και καθαρή, χωρίς σημάδια αλλοιώσεων, εξωτερικές φθορές και παραμορφώσεις.
 - Η ημερομηνία λήξης.

Χειρισμός –Τεμαχισμός

- Όλα τα τρόφιμα τα οποία διακινούνται, αποθηκεύονται συσκευάζονται, εκτίθενται και μεταφέρονται, προφυλάσσονται από κάθε μόλυνση, η οποία ενδέχεται να τα καταστήσει
 - (α) ακατάλληλα προς βρώση, ή επιβλαβή για την υγεία,
 - (β) μολυσμένα κατά τρόπο που δεν θα ήταν λογικό να αναμένεται η κατανάλωσή τους σε αυτή τη κατάσταση.
 - Υψηλά επίπεδα ατομικής υγιεινής απαιτούνται για τον χειρισμό νωπού κρέατος και κρέατος πουλερικών.

- Ο τεμαχισμός του κρέατος και των πουλερικών πρέπει να γίνεται γρήγορα, σε διαφορετικές επιφάνειες κοπής και με διαφορετικά εργαλεία.
- Η κοπή κιμά πρέπει να γίνεται παρουσία του πελάτη. Δεν επιτρέπεται η παραμονή κιμά στις μηχανές κοπής κιμά. Ο καθαρισμός του εξοπλισμού αυτού πρέπει να γίνεται τακτικά και οπωσδήποτε στο τέλος κάθε ημέρας.

Αποθήκευση-Συντήρηση

- Οι πρώτες ύλες και τα συστατικά που αποθηκεύονται στην επιχείρηση πρέπει να διατηρούνται υπό κατάλληλες συνθήκες, ούτως ώστε να αποφεύγεται κάθε επιβλαβής αλλοίωση και να προφυλάσσονται από μολύνσεις.
 - Κάθε επιχείρηση λιανικής πώλησης κρέατος και πουλερικών πρέπει να έχει τουλάχιστον έναν ψυκτικό θάλαμο, διαστάσεων ανάλογων με την δυναμικότητα της επιχείρησης.
 - Οι χώροι αποθήκευσης του κρέατος και των πουλερικών πρέπει να είναι κατάλληλα διαμορφωμένοι και εξοπλισμένοι για τη διατήρηση της κατάλληλης θερμοκρασίας των προϊόντων.
 - Η αποθήκευση-συντήρηση κρέατος και πουλερικών, καθώς και των παραπροϊόντων αυτών, προτείνεται να γίνεται σε διαφορετικούς ψυκτικούς θαλάμους.
 - Στους χώρους αυτούς πρέπει να υπάρχει κατάλληλος ψυκτικός μηχανισμός για τη διατήρηση της θερμοκρασίας κατώτερης από τους 7°C για το κρέας.

Έκθεση

- Οι βιτρίνες ή προθήκες έκθεσης πρέπει να εξασφαλίζουν τις ίδιες συνθήκες θερμοκρασίας που ισχύουν και για τα ψυγεία.
- Τις ώρες που τα καταστήματα είναι κλειστά, οι βιτρίνες έκθεσης πρέπει να κλείνουν με πλαστικές πόρτες για να διατηρείται η θερμοκρασία σε χαμηλά επίπεδα.
- Απαγορεύεται η έκθεση σφάγιων ή κρέατος ή πουλερικών σε τσιγκέλια ή σε χώρους που έχουν θερμοκρασία περιβάλλοντος (π.χ. εξωτερικοί χώροι των εγκαταστάσεων).

Υλικά περιτύλιξης και περιέκτες για τα προς πώληση τρόφιμα

Κώδικας Τροφίμων και Ποτών, Κεφ. Ι, ΙΙ Αγορανομική Διάταξη αριθμ. 14/89, άρθρο 449

- Όλα τα είδη υλικών συσκευασίας των τροφίμων που προορίζονται για την προσφορά προϊόντων μη συσκευασμένων πρέπει να προέρχονται από νόμιμα λειτουργούντα εργοστάσια ή εργαστήρια και στην επισήμανση τους να αναγράφεται ότι είναι κατάλληλα για τρόφιμα.
- Τα φύλλα χαρτιού που χρησιμοποιούνται για την περιτύλιξη τροφίμων που πωλούνται στο κρεοπωλείο, πρέπει να είναι απόλυτα καθαρά, λευκά ή χρωματισμένα με αβλαβείς χρωστικές, μη μεταχειρισμένα και αδιάβροχα.
- Απαγορεύεται η χρήση εφημερίδων ή σελίδων περιοδικών (γενικά έντυπου υλικού) και ανακυκλωμένου χαρτιού, μη εγκεκριμένου, για την περιτύλιξη των τροφίμων.
- Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δίνεται στο χειρισμό του χαρτιού περιτύλιξης γενικότερα, έτσι ώστε η δέσμη του χαρτιού να είναι προφυλαγμένη από κάθε είδους ρύπανση κατά τη διάρκεια της πώλησης και ειδικότερα κατά τον αποχωρισμό των φύλλων χαρτιού από τη δέσμη που πρέπει να γίνεται με καθαρά χέρια.
- Απαγορεύεται η διαβροχή του δακτύλου με σάλιο για τον αποχωρισμό του χαρτιού, διαδικασία που θα πρέπει να γίνεται με καθαρά χέρια.

1.6 Σύστημα διαχείρισης της ασφάλειας των τροφίμων (HACCP)

Η ασφάλεια των τροφίμων αποτελεί πρωταρχικής σημασίας παράγοντα της ποιότητας των τροφίμων και αφορά την προστασία του καταναλωτή με την παραγωγή τροφίμων τα οποία δεν θα προκαλέσουν βλάβη στην υγεία του. Κάθε κρεοπωλείο πρέπει να θεωρεί υποχρέωσή του την επίτευξη και διατήρηση υψηλών προτύπων υγιεινής, ασφάλειας και ποιότητας, για όλα τα παραγόμενα ή διακινούμενα προϊόντα του. Για την εκπλήρωση των απαιτήσεων ασφάλειας και ποιότητας, έχουν θεσπισθεί και εφαρμόζονται κατάλληλες διαδικασίες που διασφαλίζουν ότι μόνο τα τρόφιμα που πληρούν τις απαιτήσεις της Εθνικής και Κοινοτικής Νομοθεσίας, διατίθενται στην αγορά.

Η αύξηση κρουσμάτων τροφιμογενών λοιμώξεων και δηλητηριάσεων, κυρίως στη δεκαετία του 1980, οδήγησε τα κράτη μέλη της **Ευρωπαϊκής Ένωσης** να

υιοθετήσουν αυστηρούς ελέγχους στην υγιεινή και ασφάλεια των τροφίμων τόσο για τα εγχώρια, όσο και για τα εισαγόμενα προϊόντα. Ο Κανονισμός 852/2004 για την υγιεινή των τροφίμων απαιτεί οι επιχειρήσεις τροφίμων να επισημαίνουν κάθε στάδιο στις δραστηριότητές τους, που είναι κρίσιμο για την εξασφάλιση της ασφάλειας των τροφίμων και να μεριμνούν για την εφαρμογή καταλλήλων διαδικασιών για την ασφάλεια αυτών, οι οποίες τηρούνται και αναθεωρούνται στη βάση των επτά αρχών, που χρησιμοποιούνται στην ανάπτυξη του συστήματος HACCP.

Η εφαρμογή ενός συστήματος HACCP, εκτός από την εγγύηση για την ασφάλεια του τροφίμου, συμβάλλει στην καλύτερη αξιοποίηση των οικονομικών πόρων μιας επιχείρησης και στην αποτελεσματικότερη ανταπόκριση σε πιθανά προβλήματα. Επιπλέον, μπορεί να συμβάλλει στη διευκόλυνση της διαδικασίας ελέγχου από τις αρμόδιες κρατικές αρχές αλλά και στη αύξηση της εμπιστοσύνης στον τομέα της ασφάλειας της παγκόσμιας εμπορίας τροφίμων.

1.6.1 Ανασκόπηση και κατηγορίες των κινδύνων στο κρέας

Οι σημαντικότεροι βιολογικοί, φυσικοί και χημικοί κίνδυνοι που απαντώνται στο κρέας στα πουλερικά και τα προϊόντα τους παρατίθενται στους παρακάτω πίνακες:

Πίνακας 1.2. Βιολογικοί κίνδυνοι στο κρέας

ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΙ ΚΙΝΔΥΝΟΙ	
Οι τροφιμογενείς λοιμώξεις μετά από τη κατανάλωση νοπού ακατέργαστου κρέατος και πουλερικών οφείλονται συνήθως στους παρακάτω μικροοργανισμούς:	
Είδος	Συμπτώματα
Μικροοργανισμού	
<i>Escherichia coli</i>	Ήπια έως έντονη διάρροια, εμετός, σπασμοί
<i>Escherichia coli</i> <i>O157:H7</i>	Προκαλεί αιμορραγική κολίτιδα. Ενοχοποιήθηκαν ωμά μπιφτέκια, προϊόντα κρέατος και απαστερίωτο γάλα
<i>Listeria monocytogenes</i>	Προκαλεί λιστερίωση. Έχει τη δυνατότητα να πολλαπλασιάζεται σε χαμηλές θερμοκρασίες (ψύξης 3°C)
<i>Salmonella spp.</i>	Προκαλεί τυφοειδή, παρατυφοειδή πυρετό (<i>Salmonella typhi</i> , <i>S. paratyphi</i> A B), γαστρεντερίτιδα (<i>S. typhimurium</i> , <i>S. enteritidis</i> , <i>S. infantis</i> κλπ) Οι <i>Salmonella</i> spp. βρίσκονται κυρίως στον πεπτικό σωλήνα των ζώων.
<i>Staphylococcus aureus</i>	Παράγει θερμοανθεκτική τοξίνη η οποία προκαλεί τροφодηλητηρίαση, εντερίτιδα, τοξικό σοκ.
<i>Clostridium botulinum</i>	Προκαλεί αλλαντίαση μετά από κατανάλωση της τοξίνης, με υψηλό

	ποσοστό θνησιμότητας
<i>Clostridium perfringens</i>	Κατά τη σπορογονία του στο πεπτικό σύστημα παράγεται εντεροτοξίνη που προκαλεί έντονη διάρροια και σπάνια εμετό.
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Η νόσος είναι γαστροεντερική με συμπτώματα όπως διάρροια, πυρετό, κοιλιακό πόνο, εμετό.
<i>Trichinella spiralis</i>	Νηματώδες παράσιτο το οποίο εγκυστώνεται σε γραμμωτούς μύες ζώων (κυρίως χοίρων). Η νόσος στους ανθρώπους έχει κυρίως συμπτώματα «γρίπης» (διάρροια, πυρετός, μυϊκό άλγος, αναπνευστικά συμπτώματα). Βαριές περιπτώσεις οδηγούν στον θάνατο.
<i>Taenia saginata</i>	Η προνυμφική μορφή (<i>Cysticercus bovis</i>) εγκυστώνεται σε ιστούς βοοειδών. Άψητο ή ατελώς ψημένο κρέας βοοειδών ενοχοποιείται για τη μετάδοση του παρασίτου
<i>Campylobacter jejuni</i>	Προκαλεί κυρίως εντερίτιδες και διάρροιες. Όλα τα σφάγια των πουλερικών θεωρείται ότι είναι μολυσμένα με <i>Campylobacter</i>
<i>Taenia solium</i>	Η προνυμφική μορφή (<i>Cysticercus cellulosae</i>) εγκυστώνεται σε ιστούς χοίρων, σκύλων και ανθρώπων. Άψητο ή ατελώς ψημένο κρέας χοίρων ενοχοποιείται για τη μετάδοση του παρασίτου. Κύστεις στον άνθρωπο έχουν ανιχνευτεί σε υποδόριους ιστούς, μάτια και εγκέφαλο
<i>Toxoplasma gondii</i>	Το πρωτοζωικό παράσιτο εγκυστώνεται σε ιστούς χοίρων και άλλων θηλαστικών. Η νόσος στους ανθρώπους έχει κυρίως συμπτώματα «γρίπης», αποβολές σε εγκύους συγγενείς ανωμαλίες σε έμβρυα. Άψητο ή ατελώς ψημένο κρέας χοίρων ενοχοποιείται για τη μετάδοση του
<i>Balantidium coli</i>	Το πρωτόζωο βρίσκεται σε χοίρους. Η νόσος στους ανθρώπους έχει κυρίως συμπτώματα αιμορραγικής δυσεντερίας, αφυδάτωση και σπάνια οδηγεί σε θάνατο. Άψητο ή ατελώς ψημένο κρέας χοίρων, με εντερική επιμόλυνση ενοχοποιείται για τη μετάδοση του.
<i>Cryptosporidium</i> spp.	Μολυσματική ηπατίτιδα Α, Λοιμώδης γαστρεντερίτιδα
Ιώσεις	Παθολογική πρωτεΐνη (prion) που προκαλεί τη νόσο vCJ (νόσος νευρικού συστήματος με μοιραία για τον άνθρωπο κατάληξη)
Σπογγόμορφη εγκεφαλοπάθεια των βοοειδών (BSE)	

Πηγή: Οδηγός υγιεινής για κρεοπωλεία/ Υπουργείο Ανάπτυξης

Πίνακας 1.3. Φυσικοί κίνδυνοι στο κρέας

ΦΥΣΙΚΟΙ ΚΙΝΔΥΝΟΙ	
Είδος	Προέλευση
Γυαλί	Φωτιστικά, εργαλεία, θερμόμετρα
Μέταλλα	Βίδες, μπουλόνια, καρφιά, σύρμα, άγκιστρα, σφαίρες, βελόνες
Κοσμήματα	Προσωπικό
Πλαστικά	Υλικά συσκευασίας, πρώτες ύλες
Τεμαχίδια οστών	Πρώτες ύλες, ακατάλληλη επεξεργασία

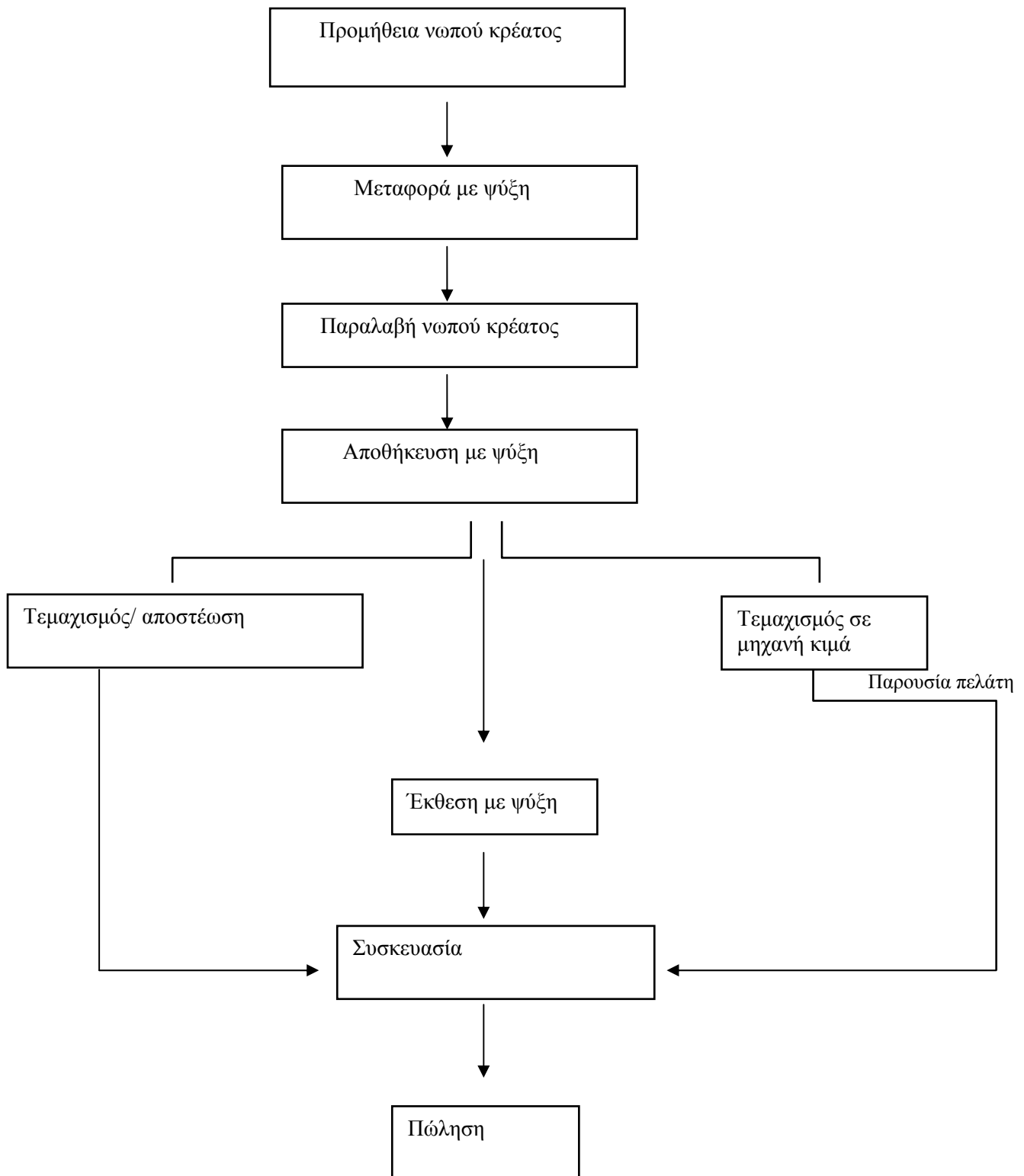
Πηγή: Οδηγός υγιεινής για κρεοπωλεία/ Υπουργείο Ανάπτυξης

Πίνακας 1.4. Χημικοί κίνδυνοι στο κρέας

ΧΗΜΙΚΟΙ ΚΙΝΔΥΝΟΙ	
Είδος	Προέλευση
Φυτοφάρμακα, αντιβιοτικά, ορμόνες, τοξίνες, λιπάσματα, παρασιτοκτόνα, βαρέα μέταλλα, ραδιενεργές ουσίες	Γεωργικά και κτηνιατρικά φάρμακα, περιβάλλον, υλικά συσκευασίας, νερά πλυσίματος και καθαρισμού
Χρωστικές, πολυμερή	Υλικά συσκευασίας
Λιπαντικά, χρώματα	Εξοπλισμός και μεταφορικά μέσα
Απορρυπαντικά, απολυμαντικά	Ανεπαρκής καθαρισμός, τυχαία επιμόλυνση, λανθασμένη αποθήκευση
Εντομοκτόνα, σκευάσματα καταπολέμησης τρωκτικών	Ουσίες από καταπολέμηση τρωκτικών και εντόμων
Πολυχλωριωμένα δυφαινύλια (BCBs)- Διοξίνες	Ουσίες που δημιουργούνται από φυσικές διεργασίες στο περιβάλλον ή είναι προϊόντα βιομηχανικών δραστηριοτήτων.

Πηγή: Οδηγός υγιεινής για κρεοπωλεία/ Υπουργείο Ανάπτυξης

1.6.2 Διάγραμμα ροής εμπορίας νωπού κρέατος



Σχήμα 1.2 Διάγραμμα ροής εμπορίας νωπού κρέατος

1.6.3 Σημεία ελέγχου για κρεοπωλεία

Τα σημεία ελέγχου, οι κίνδυνοι, τα προληπτικά μέτρα και η παρακολούθηση φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 1.5 Σημεία ελέγχου, κίνδυνοι, προληπτικά μέτρα και παρακολούθηση για τα κρεοπωλεία

<i>Σημεία Ελέγχου</i>	<i>Κίνδυνος</i>	<i>Προληπτικά μέτρα ελέγχου</i>	<i>Παρακολούθηση</i>
Προμήθεια	<ul style="list-style-type: none"> • Η προμήθεια προϊόντων ακατάλληλων για κατανάλωση, που έχουν μιανθεί με μικροοργανισμούς, χημικές ουσίες ή ξένες ύλες. 	<ul style="list-style-type: none"> • Προμήθεια από αξιόπιστους προμηθευτές/εγκεκριμένα σφαγεία/τεμαχιστήρια 	<ul style="list-style-type: none"> • Έλεγχοι κατά τη παραλαβή : ⇒ Πιστοποιητικού καταλληλότητας / κτηνιατρικού – υγειονομικού ελέγχου / εγγράφων που συνοδεύουν τα εισαγόμενα κρέατα ⇒ Έλεγχος θερμοκρασίας νωπού κρέατος ⇒ Οργανοληπτικός έλεγχος κρέατος ⇒ Έλεγχος ακεραιότητας συσκευασίας (για τα συσκευασμένα τεμάχια κρέατος και πουλερικών) ⇒ Έλεγχος σφραγίδας / επισήμανσης/ ετικέτας
Μεταφορά	<ul style="list-style-type: none"> • Μίανση από το μεταφορικό μέσο ή τον εξοπλισμό ή αλλοίωση λόγω ακατάλληλης θερμοκρασίας μεταφοράς 	<ul style="list-style-type: none"> • Αποτελεσματικός καθαρισμός και απολύμανση μεταφορικών μέσων και εξοπλισμού. • Καθορισμένες συνθήκες μεταφοράς κρέατος (ψύξη να εξασφαλίζεται σε όλη τη διάρκεια της μεταφοράς θερμοκρασία $\leq 4^{\circ}\text{C}$ για τα ψυγμένα και $\leq -18^{\circ}\text{C}$ για τα βαθιάς καταψύξεως κρέατα με ισόθερμα οχήματα) • Για τα πουλερικά, μεταφορά υπό ψύξη ή υπό κατάψυξη 	<ul style="list-style-type: none"> • Έλεγχος των θερμοκρασιών μεταφοράς, ή των θερμοκρασιών των προϊόντων • Έλεγχος μεταφορικών μέσων κατά τη παραλαβή για την εφαρμογή κανόνων υγιεινής

Παραλαβή	<ul style="list-style-type: none"> • Μικροβιολογική μίανση κατά τη παραλαβή λόγω λάθος χειρισμών προσωπικού και παρατεταμένου χρόνου παραλαβής και παραμονής των κρεάτων εκτός ψύξης 	<ul style="list-style-type: none"> • Εκπαίδευση του προσωπικού • Ορθοί χειρισμοί κατά την παραλαβή • Αποφυγή καθυστερήσεων 	<ul style="list-style-type: none"> • Έλεγχος των χειρισμών κατά την παραλαβή • Έλεγχος προϊόντων κατά την παραλαβή
Αποθήκευση προϊόντων με ψύξη	<ul style="list-style-type: none"> • Αύξηση των μικροοργανισμών λόγω μη κατάλληλων συνθηκών αποθήκευσης: <ul style="list-style-type: none"> - Θερμοκρασίας - παρατεταμένου χρόνου αποθήκευσης. • Επιμόλυνση από τον εξοπλισμό ή τους ψυκτικούς θαλάμους 	<ul style="list-style-type: none"> • Διατήρηση σφαγίων και τεμαχίων νωπού κρέατος σε θ/α <7° C • Διατήρηση παραπροϊόντων νωπού κρέατος σε θ/α <3° C. • Διατήρηση νωπού κρέατος πουλερικών σε θ/α 4° C. • Αποθήκευση για περιορισμένο χρονικό διάστημα και ορθή διακίνηση (first in- first out) • Καθαρισμός ψυκτικών θαλάμων (δάπεδο, τοίχοι κλπ) και των τσιγκελιών ή των ραφιών 	<ul style="list-style-type: none"> • Έλεγχος θερμοκρασίας των χώρων αποθήκευσης • Έλεγχος λειτουργίας θερμομέτρων • Έλεγχος σωστής τοποθέτησης στους ψυκτικούς χώρους • Έλεγχος σωστής διακίνησης • Οπτικός έλεγχος καθαριότητας
Τεμαχισμός σε μηχανή κιμά	<ul style="list-style-type: none"> • Μικροβιακή μίανση (παθογόνοι μικροοργανισμοί) / διασταυρούμενη επιμόλυνση από τον εξοπλισμό (μηχανές) τα εργαλεία το προσωπικό 	<ul style="list-style-type: none"> • Καθορισμός και εφαρμογή κανόνων υγιεινής για τον εξοπλισμό (καθαρισμός μηχανών κοπής κιμά) τα εργαλεία (καθαρισμός) το προσωπικό (αυστηροί κανόνες ατομικής υγιεινής, χρήση γαντιών) • Εκπαίδευση προσωπικού στους κανόνες υγιεινής 	<ul style="list-style-type: none"> • Έλεγχος τήρησης των κανόνων υγιεινής με επιθεώρηση <ul style="list-style-type: none"> - του εξοπλισμού - των εργαλείων - του προσωπικού
Τεμαχισμός/ αποστέωση κρέατος	<ul style="list-style-type: none"> • Μικροβιολογική διαμίανση από τον εξοπλισμό (πάγκοι κοπής κρέατος) τα μαχαίρια το προσωπικό 	<ul style="list-style-type: none"> • Καθορισμός και εφαρμογή κανόνων υγιεινής για τον εξοπλισμό (χρήση κατάλληλων επιφανειών κοπής, καθαρισμός επιφανειών) τα μαχαίρια (καθαρισμός μαχαιριών, αποκλειστική χρήση) το προσωπικό (αυστηροί κανόνες ατομικής υγιεινής) 	<ul style="list-style-type: none"> • Έλεγχος τήρησης των κανόνων υγιεινής με επιθεώρηση <ul style="list-style-type: none"> - του εξοπλισμού - των εργαλείων - του προσωπικού • Έλεγχος τακτικού καθαρισμού και απολύμανσης των χεριών με απορρυπαντικό και απολυμαντικό, σε ειδικό νιπτήρα.

Έκθεση νωπού κρέατος/ νωπών πουλερικών με ψύξη	<ul style="list-style-type: none"> • Αύξηση μικροοργανισμών λόγω ακατάλληλης θερμοκρασίας έκθεσης • Διαμείανση από άλλα προϊόντα/ κρέατα • Μείανση από τους καταναλωτές 	<ul style="list-style-type: none"> • Έκθεση σε ψυχόμενες επιφάνειες/ βιτρίνες θ/ας <7° C για το νωπό κρέας, και <4° C για το νωπό κρέας πουλερικών . • Χρήση καθαρού εξοπλισμού • Έκθεση των τροφίμων με κάλυμμα (βιτρίνες), όπου είναι δυνατό • Διαχωρισμός προϊόντων όπου αυτό είναι δυνατό 	<ul style="list-style-type: none"> • Έλεγχος της θερμοκρασίας έκθεσης • Έλεγχος της τήρησης των κανόνων υγιεινής κατά την έκθεση
Συσκευασία	<ul style="list-style-type: none"> • Μείανση μικροβιακή / φυσική / χημική από <ul style="list-style-type: none"> - το υλικό συσκευασίας - το προσωπικό 	<ul style="list-style-type: none"> • Υγιεινή συσκευασία, σε κατάλληλο υλικό • Τήρηση κανόνων υγιεινής για τους χειρισμούς του προσωπικού • Εκπαίδευση προσωπικού 	<ul style="list-style-type: none"> • Έλεγχος καθαριότητας υλικού συσκευασίας • Έλεγχος για την τήρηση των κανόνων υγιεινής στους χειρισμούς, τη συμπεριφορά, και την ενδυμασία του προσωπικού

Πηγή: Οδηγός υγιεινής για κρεοπωλεία/ Υπουργείο Ανάπτυξης

2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ



2.1 Χρησιμοποιούμενα υλικά

Για τις ανάγκες της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκαν ανόργανα και οργανικά χημικά αντιδραστήρια, θρεπτικά συστατικά μέσω καλλιέργειας, αλλά και σύνθετα υποστρώματα υλικά (culture media).

2.1.1. Ανόργανα και οργανικά χημικά αντιδραστήρια

Από ανόργανα χημικά αντιδραστήρια, χρησιμοποιήθηκε το χλωριούχο νάτριο (sodium chloride) (sds 1380517, Peypin, France), κιτρικό άλας σιδήρου (ferric citrate) (Ferak 30 683), (θειοθειικό νατρίου) (sodium thiosulfate) (Merck 6516), υπεροξείδιο του υδρογόνου (peroxide of hydrogen) (Malinckrodt UN 2014), κρυσταλλικό ιώδες (crystal violet) (Merck 1.11882), σαφρανίνη (safranine) (Merck 1.09217), μπλε της βρωμοκρεσόλης (purple bromocresol) (Merck 103025), οξικό κάλιο, (potassium acetate) (Applichem A1498).

Εξάλλου, από οργανικά χημικά αντιδραστήρια χρησιμοποιήθηκαν τα:

1. αγαρόζη χαμηλού (agarose) (Applichem A2114)
2. αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό (EDTA) (Merck 1.00944.1000)
3. α-μεθυλο- D-μαννόζη (methyl-a-D-mannopyranoside) (Sigma-Aldrich M-6882)
4. βρωμιούχο αιθίδιο (ethidium bromide) (Applichem A0805)
5. γλυκερόλη (glycerol) (SERVA 231176)
6. δείκτης μοριακών βαρών (size marker) (Fermentas Generuler 1kb)
8. D-μαννιτόλη (D-mannitol) (Merck 1.05983)
9. D-ξυλόζη (D-xylose) (Merck 7507500)
10. ισοπροπανόλη (isopropanol) (Applichem A3928)
11. L-ραμνόζη (L-rhamnose) (Alfa Aesar A16166)
12. σορβιτόλη (sorbitol) (Applichem A2222)
13. τρις-υδροχλώριο (Tris-HCL) (Applichem A1086)

2.1.2. Συστατικά θρεπτικών υποστρωμάτων

Τα θρεπτικά συστατικά υλικών ανάπτυξης αφορούσαν κατά βάση οργανικές μορφές αζώτου. Έτσι, χρησιμοποιήθηκε πεπτόνη σόγιας (soy peptone) (Biolife 4123252), η οποία προέρχεται από την πρωτεολυτική διάσπαση της πλούσιας σε πρωτεΐνη σόγιας, πεπτόνη καζεΐνης (casein peptone) (Sigma T-9410), πεπτόνη κρέατος (meat peptone) (Merck 1.07214), πεπτόνη G (pancreatic digest of gelatin) (Merck 1.07284). Τέλος, χρησιμοποιήθηκε και εκχύλισμα ζύμης (yeast extract) (Biolife 412220) καθώς και εκχύλισμα κρέατος (beef extract) (Biolife 411125).

2.1.3 Θρεπτικά υποστρώματα

Στην ακολουθούμενη πειραματική διαδικασία εμπλέκονται τα παρακάτω θρεπτικά υποστρώματα:

- ALOA εξειδικευμένο θρεπτικό υπόστρωμα Agar Listeria Ottaviani (Biolife 4016052)
- BHI γενικό θρεπτικό υπόστρωμα Brain Heart Infusion (Biolife 4012352),
- BPA εξειδικευμένο θρεπτικό υπόστρωμα που περιέχει την ουσία egg yolk tellurite emulsion (Biolife 4011172)
- Chromocult εξειδικευμένο θρεπτικό υπόστρωμα Chromocult Coliform Agar (Merck 110426)
- CFC εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα Pseudomonas Agar Base που περιέχει αντιβιοτικό Ceftrimide Fucidin Cephaloridine (LABM 108-B5)
- MRS εξειδικευμένο θρεπτικό υπόστρωμα (Biolife 4017284)
- PALCAM εξειδικευμένο θρεπτικό υπόστρωμα Listeria agar base που περιέχει το αντιβιοτικό polymyxin B (Biolife 401604)
- PCA μη εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα Plate Count Agar (Merck 105463)
- RAPID L'Mono εκλεκτικό χρωμογόνο υπόστρωμα για την απομόνωση *Listeria monocytogenes* (Bio-RAD 3563694)
- STAA εξειδικευμένο θρεπτικό υπόστρωμα STAA Agar Base που περιέχει αντιβιοτικό streptomycin thallos acetate actidione (Biolife 4020791)
- TSAYE μη επιλεκτικό υπόστρωμα

- VRBGA εξειδικευμένο θρεπτικό υπόστρωμα Violet Red Glucose Agar περιέχει την ουσία crystal violet (Biolife 4021882)
- YGC εξειδικευμένο θρεπτικό υπόστρωμα Tryptone Glucose Yeast Extract Agar (Biolife 4021452)

2.2 Χρησιμοποιούμενος εργαστηριακός εξοπλισμός

Σε όλα τα στάδια της πειραματικής διαδικασίας υπεισήλθε η χρήση ενός ή περισσοτέρων από τα όργανα ή/και σκεύη που περιγράφονται παρακάτω.

2.2.1 Όργανα και συσκευές

Για την εκτέλεση του πειράματος έγινε χρήση των οργάνων και συσκευών που παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.1.

2.2.2 Σκεύη

Τα σκεύη τα οποία ενεπλάκησαν στην εκτελούμενη πειραματική διαδικασία ήταν μεταξύ άλλων:

1. γυάλινες φιάλες duran
2. γυάλινα φιαλίδια universal
3. δοκιμαστικοί σωλήνες
4. καλυπτρίδες
5. κωνικές φιάλες
6. λαβίδες
7. λύχνος Bunsen
8. μαγνήτες αναδέυσεως (διαφόρων μεγεθών)
9. μικροβιολογικός κρίκος
10. μικροβιολογικό τρίγωνο
11. μικροβιολογική βελόνα
12. ογκομετρικοί κύλινδροι
13. πλαστικοί περιέκτες erpendorf (χωρητικότητας 1,5 ml)
14. ποτήρια ζέσεως

15. ρύγχη (tips) των 100 μl (=0,1 ml), 1000 μl (=1 ml) και 10 ml για τις πιπέττες μεταβλητού όγκου
16. σκεύος χρώσης
17. στατό δοκιμαστικών σωλήνων
18. υδροβολέας

Πίνακας 2.1 : Χρησιμοποιούμενα εργαστηριακά όργανα και συσκευές

<i>No</i>	<i>Όργανο-συσκευή</i>	<i>Μοντέλο</i>	<i>Εταιρεία</i>
1	Αναλυτικοί ζυγοί	Mark (0,01g) BP 3105 (0,001g)	BEL ENGINEERING Sartorius
2	Επωαστικοί θάλαμοι	BE 500	Memmert
3			
4	Θάλαμος κάθετης νηματικής ροής	NU-425-400E	NuAire
5	Κλίβανος αποστείρωσης	OT 4060	nüve
6	Μετρητής αποικιών	C5	Stuart Scientific
7	Πεχάμετρο	pH 526	WTW
8	Πιπέττες μεταβλητού όγκου	Labopette (20-200 μl) (100-1000 μl) HC (1-10 ml)	HIRSCHMANN LABORGERÄTE LABMATE+
9	Συσκευή ανάμιξης	K-550-GE	Vortex-GENIE
10	Συσκευή ηλεκτροφόρησης	Protean II	BIO-RAD
11	Συσκευή ανάδευσης με θέρμανση	ARE	VELP Scientifica
12	Συσκευή ομογενοποίησης	Stomacher 400	Seward
13	Συσκευή τροφοδοσίας συνεχούς ρεύματος ηλεκτροφόρησης	Power Pac 1000	BIO-RAD
14	Συσκευή σάρωσης-μέτρησης οπτικής Πυκνότητας πηκτών ηλεκτροφόρησης	GS-800	BIO-RAD
15			
16	Υδατόλουτρο	WB 14	Memmert
17	Φυγόκεντροι	Megafuge 1.0 R Mini Spin Eppendorf	Heraeus instruments Milian

2.3 Χρησιμοποιούμενοι μικροοργανισμοί

Για το πειραματικό μέρος αυτής της μελέτης χρησιμοποιήθηκαν τα βακτηριακά είδη: *L. monocytogenes*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. innocua* με κωδικούς 15014, 15024, 15002, 15020 αντίστοιχα, τα οποία είναι αποθηκευμένα στο εργαστήριο ποιοτικού ελέγχου και υγιεινής τροφίμων στους , στους -22°C .

2.4 Πειραματική διαδικασία

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε παρουσιάζεται συνοπτικά στο σχετικό διάγραμμα ροής (Σχήμα 2.1). Στο σχήμα, η πειραματική διαδικασία που χρωματίζεται με κόκκινο χρώμα έχει σκοπό την αρίθμηση συγκεκριμένων μικροβιακών πληθυσμών (OMX, ζύμες και μύκητες, οξυγαλακτικά βακτήρια, εντεροβακτήρια, H_2S παραγωγικά βακτήρια, Pseudomonads, Staphylococci, *Brochothrix thermosphacta*) ενώ η πειραματική διαδικασία που χρωματίζεται με μπλε και γκρι χρώμα έχει σκοπό τον έλεγχο της παρουσίας της *Listeria monocytogenes* στα δείγματα χοιρινού κιμά. Στη συνέχεια, παρατίθεται αναλυτική περιγραφή των κυριότερων σταδίων αυτής. Εξυπακούεται ότι όλοι οι περιγραφόμενοι μικροβιακοί χειρισμοί διενεργούνται υπό ασηπτικές συνθήκες.

2.4.1 Δειγματοληψία

- ◆ Πενήντα (50) δείγματα νωπού χοιρινού κιμά, παρασκευασμένα παρουσία πελάτη από αυτούσια τεμάχια κρέατος, λαμβάνονται από κρεοπωλεία και υπεραγορές.
- ◆ Τα δείγματα μεταφέρονται εντός ισοθερμικών περιεκτών στο εργαστήριο, όπου και αποθηκεύονται υπό ψύξη ($4\pm 2^{\circ}\text{C}$) μέχρι να λάβει χώρα η μικροβιολογική ανάλυση τους.

2.4.2 Ομογενοποίηση δείγματος

- ◆ Ποσότητα 25g από κάθε δείγμα, αντιπροσωπευτική όλων των επιπέδων της μάζας του δείγματος (500g κιμά), μεταφέρονται υπό ασηπτικές συνθήκες εντός πλαστικού περιέκτη stomacher

- ◆ Στη συνέχεια προσθέτονται 225 ml αποστειρωμένου διαλύματος MRD (Maximum Recovery Diluent)
- ◆ Η σακούλα τοποθετείτε στη συσκευή stomacher.
- ◆ Η ποσότητα του δείγματος υφίστατο ομογενοποίηση για συνολικό χρόνο 1.5 min (1 min σε χαμηλή ταχύτητα και 30 sec σε υψηλή ταχύτητα)



Εικόνα 2.1. Ομογενοποιημένο δείγμα

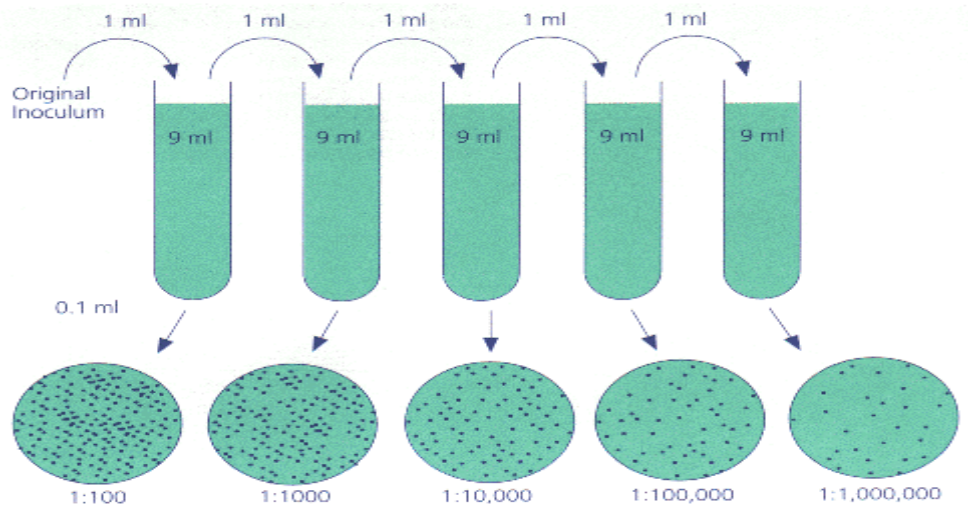
2.4.3 Μέτρηση pH

Το pH κάθε δείγματος μετρήθηκε με pHμετρο. Η μέτρηση γινόταν με εμβάπτιση του ηλεκτροδίου στο ομογενοποιημένο κρέας μετά το τέλος κάθε μικροβιολογικής ανάλυσης.

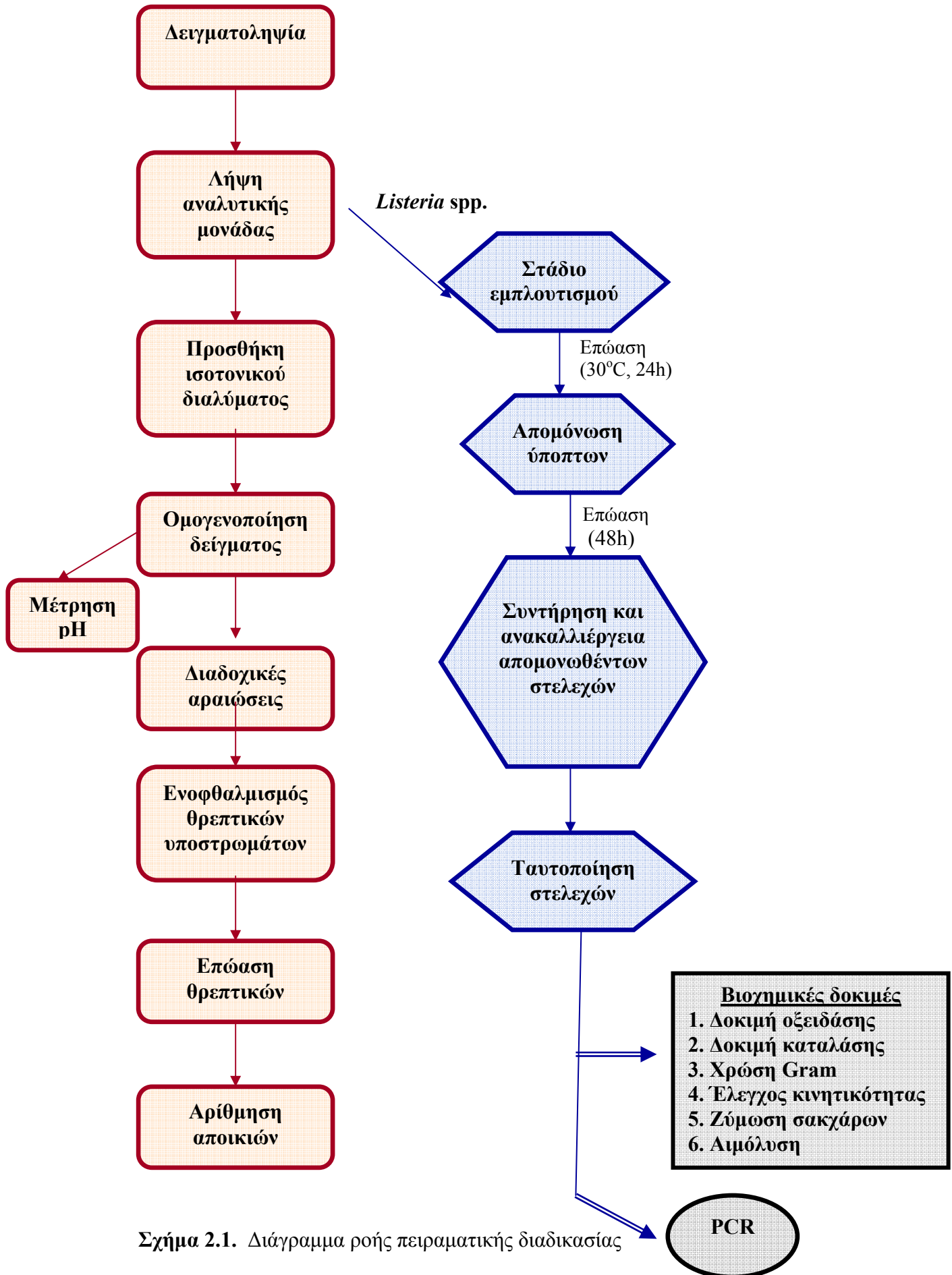
2.4.4 Διαδοχικές αραιώσεις

Κάθε τρόφιμο μπορεί να περιέχει από χίλια έως εκατοντάδες εκατομμύρια βακτηριακά κύτταρα ανά όγκο. Ο προσδιορισμός του μικροβιακού φορτίου χρειάζεται μια διαδικασία διαχωρισμού των βακτηρίων, ώστε όταν καλλιεργηθούν σε ένα στερεό θρεπτικό υλικό, να σχηματίζουν μεμονωμένες και ευκρινείς αποικίες.

- ◆ Σε 4 δοκιμαστικούς σωλήνες προσθέτονται 9ml ισοτονικού διαλύματος MRD και επισημαίνουμε τους συντελεστές αραιώσης.
- ◆ Μεταφέρουμε ασηπτικά 1 ml από το ομογενοποιημένο δείγμα (αραίωση -1) στον πρώτο δοκιμαστικό σωλήνα (αραίωση -2).
- ◆ Αναδεύουμε με περιστροφικό αναδευτήρα προκειμένου να επιτύχουμε επαρκή διασπορά.
- ◆ Με τον ίδιο τρόπο συνεχίζουμε και με τους υπόλοιπους δοκιμαστικούς σωλήνες.



Εικόνα 2.2. Μέθοδος διαδοχικών αραιώσεων



Σχήμα 2.1. Διάγραμμα ροής πειραματικής διαδικασίας

2.4.5 Ενοφθαλμισμός θρεπτικών υποστρωμάτων

Ο ενοφθαλμισμός ενός βακτηριακού εναιωρήματος σε στερεό υπόστρωμα γίνεται με δυο ποσοτικές τεχνικές : με την τεχνική της επιφανειακής εξάπλωσης (spread plate technique) και με την τεχνική της ενσωμάτωσης (pour plate technique).

Τεχνική της επιφανειακής επίστρωσης

Στην τεχνική της επιφανειακής διασποράς γίνεται διασπορά μικρού γνωστού όγκου από το αραιωμένο δείγμα στην επιφάνεια στερεοποιημένου θρεπτικού υποστρώματος σε τριβλίο. Με ομοιόμορφη διασπορά του αιωρήματος στην επιφάνεια του στερεού υποστρώματος, και έπειτα από επώαση σε κατάλληλες συνθήκες, σχηματίζονται ευδιάκριτες αποικίες οι οποίες μπορεί να μετρηθούν. Η τεχνική της επιφανειακής διασποράς (spread plate technique) προτιμάται στις περιπτώσεις υποχρεωτικά αερόβιων μικροοργανισμών.

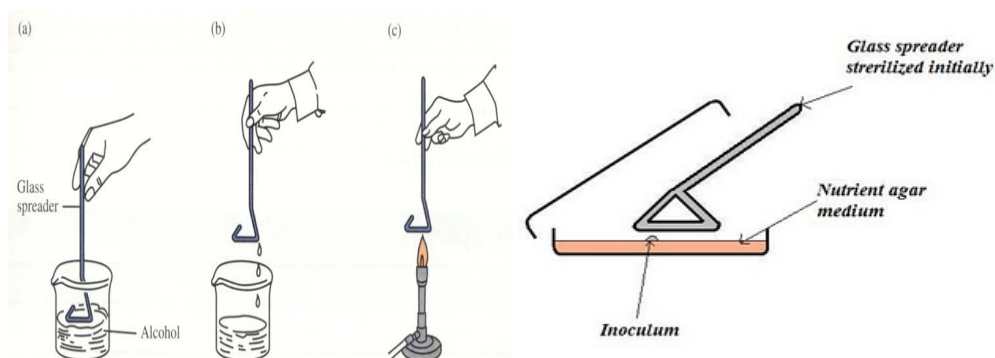
- ◆ Η βάση των τριβλίων επισημαίνεται με τους συντελεστές αραιώσης με τους οποίους θα ενοφθαλμιστεί το θρεπτικό υπόστρωμα.
- ◆ Τοποθετούμε, στο κέντρο του τριβλίου με το στερεοποιημένο θρεπτικό υλικό, 0,1 mL βακτηριακού εναιωρήματος από τους δοκιμαστικούς σωλήνες με την αντίστοιχη αναγραφόμενη αραιώση.
- ◆ Με τη μικροβιολογική τριγωνική ράβδο εξαπλώνεται το βακτηριακό εναιώρημα σε όλη την επιφάνεια του θρεπτικού υλικού με κυκλικές κινήσεις.
- ◆ Τα τρυβλία αναποδογυρίζονται και τοποθετούνται προς επώαση στην κατάλληλη θερμοκρασία.

Στη περίπτωση των εξειδικευμένων θρεπτικών για τη *Listeria* spp.: 1ml από την πρώτη αραιώση εξαπλώνονται ισόποσα σε 3 τρυβλία με το ίδιο θρεπτικό υλικό(η απαρίθμηση των αποικιών της *Listeria* spp. θα προκύψει αθροιστικά από τα 3 τρυβλία)

Τεχνική της ενσωμάτωσης

Στην τεχνική της ενσωμάτωσης, οι μικροοργανισμοί διασπείρονται ομοιόμορφα στην μάζα ρευστού θρεπτικού υποστρώματος το οποίο αφήνεται στην συνέχεια να στερεοποιηθεί. Η τεχνική της ενσωμάτωσης προτιμάται σε περιπτώσεις προαιρετικά αναερόβιων μικροοργανισμών.

- ◆ Η βάση των τριβλίων επισημαίνεται με τους συντελεστές αραίωσης με τους οποίους θα ενοφθαλμιστεί το θρεπτικό.
- ◆ Τοποθετούμε σε κενό τριβλίο 1 ml από την από τους δοκιμαστικούς σωλήνες με την αντίστοιχη αναγραφόμενη αραίωση.
- ◆ Αποχύνουμε ποσότητα θρεπτικού υλικού στα τρυβλία με τα ενοφθαλμίσιμα.
- ◆ Ήπια ανάδευση.
- ◆ Αφού στερεοποιηθεί το υλικό γίνεται επικάλυψη του ενοφθαλμισμένου μέσου με το ίδιο θρεπτικό.
- ◆ Μετά την στερεοποίηση του υλικού τα τρυβλία αναποδογυρίζονται και τοποθετούνται προς επώαση στην κατάλληλη θερμοκρασία.



Εικόνα 2.3. Τεχνική της επιφανειακής εξάπλωσης

2.4.6 Επώαση θρεπτικών υποστρωμάτων

Οι συνθήκες επώασης πρέπει να εξασφαλίζουν την βέλτιστη μικροβιακή αύξηση. Εκτός από η χρήση του κατάλληλου μέσου αύξησης και τη κατάλληλη ατμόσφαιρα, οι υπόλοιπες απαιτούμενες συνθήκες είναι η θερμοκρασία και ο χρόνος επώασης.

Πίνακας 2.2. Θρεπτικό μέσο ανάπτυξης, μικροοργανισμοί που αναπτύσσονται σε αυτά, τεχνική ενοφθαλμισμού τους και συνθήκες επώασης

Θρεπτικό μέσο ανάπτυξης	Μικροοργανισμοί που αναπτύσσονται	Τεχνική ενοφθαλμισμού	Θερμοκρασία επώασης (°C)	Χρόνος επώασης
PCA	OMX	S	25	72 ώρες
YGC	Ζύμες και μύκητες	S	25	5 ημέρες
MRS	Lactobacilli	P	30	72 ώρες
CFC	Pseudomonads	S	25	48 ώρες
Iron Agar*	H ₂ S παράγωγα	P	25	48 ώρες
BPA	Staphylococci	S	37	48 ώρες
VRBGA	Enterobacteriaceae	P	37	24 ώρες
STAA	<i>Brochothrix thermosphacta</i>	S	25	48 ώρες
Chromocult Coliform	Total coliforms	P	37	24 ώρες
PALCAM	<i>Listeria</i> spp.	S	30	48 ώρες
ALOA	<i>Listeria monocytogenes</i>	S	37	48 ώρες
RAPIDL'Mono	<i>Listeria monocytogenes</i>	S	37	48 ώρες

S: spread plate technique, P: pour plate technique

*Η σύσταση του Iron Agar φαίνεται στον πίνακα 4.3 του Παραρτήματος.

2.4.7 Αρίθμηση αποικιών

Η πιο συνηθισμένη μέθοδος προσδιορισμού του μικροβιακού φορτίου ενός προϊόντος αποτελεί η αρίθμηση των αποικιών (colony count) που σχηματίζονται σε ενοφθαλμισμένο στερεό θρεπτικό υλικό. Στηρίζεται στη θεωρία ότι ένα βακτηριακό κύτταρο ή μια ομάδα κυττάρων δημιουργούν μια αποικία. Έτσι ο αριθμός των αποικιών που αναπτύσσονται σε ένα ήδη ενοφθαλμισμένο θρεπτικό υλικό αντιπροσωπεύει τον πραγματικό μικροβιακό πληθυσμό.

◆ Η μέτρηση των αποικιών ανά τρυβλίο πραγματοποιείται με γυμνό μάτι και με τη χρήση εργαστηριακού οργάνου μέτρησης αποικιών

◆ Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε cfu/g μετά την επεξεργασία τους μέσω αριθμητικών τύπων

2.4.8 Στάδιο εμπλουτισμού

Για τον προσδιορισμό (απουσία/παρουσία) του παθογόνου *Listeria monocytogenes* ακολουθήθηκε η τεχνική του εμπλουτισμού δειγμάτων.

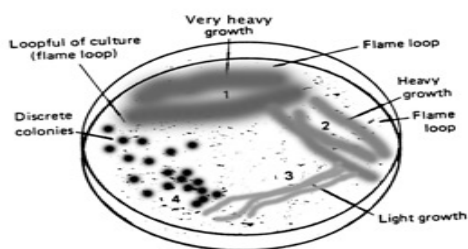
- ◆ Ενοφθαλμισμός του δείγματος σε Fraser Broth Half (Biolife) σε αναλογία 1:10 (25g δείγμα +225 ml διάλυμα εμπλουτισμού)
- ◆ Επώαση στους 30°C για 24h.

2.4.9 Απομόνωση ύποπτων αποικιών του *Listeria monocytogenes*

- ◆ Τα ύποπτα δείγματα (μαύρος χρωματισμός) λαμβάνονται με μικροβιολογικό κρίκο από το εμπλουτισμένο υλικό και πραγματοποιείται ενοφθαλμισμός της επιφάνειας (steaking) σε τρία εκλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα (PALCAM, ALOA, RAPIDL'Mono)
- ◆ Επώαση για 48h στους 30,37 και 37°C αντίστοιχα

2.4.10 Συντήρηση και ανακαλλιέργεια απομονωθέντων στελεχών

- ◆ Οι ύποπτες αποικίες για *Listeria monocytogenes* απομονώνονται με μικροβιακό κρίκο και ενοφθαλμίζονται σε 5ml υγρού θρεπτικού BH (αν πρόκειται να αποθηκευτούν στη κατάψυξη, προστίθεται 20% γλυκερόλη).
- ◆ Επώαση σε θερμοκρασία 37°C για 24 h.
- ◆ Πραγματοποιείται γραμμωτή ράβδωση σε μη επιλεκτικό θρεπτικό υλικό, TSAYE.
- ◆ Επώαση σε θερμοκρασία 37°C για 24 h.



Εικόνα 2.4. Τεχνική ενοφθαλμισμού (streaking)

2.4.11 Ταυτοποίηση στελεχών

Η ταυτοποίηση της *Listeria monocytogenes* έγινε με βιοχημικές δοκιμές καθώς και με τη μοριακή τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης(PCR)

2.4.11.1 Δοκιμή οξειδάσης

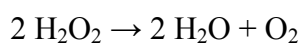
Η αρχή της δοκιμής βασίζεται στην παρουσία ενός ενδοκυττάριου συστήματος οξειδάσης κυτοχρώματος, το οποίο ενεργοποιεί την οξείδωση του ανηγμένου κυτοχρώματος από το μοριακό οξυγόνο. Το κυτόχρωμα χρησιμεύει ως δέκτης ηλεκτρονίων στο τελικό στάδιο του συστήματος μεταφοράς ηλεκτρονίων.

Οι μικροοργανισμοί που παράγουν το ένζυμο της οξειδάσης, το οποίο παρουσία ατμοσφαιρικού οξυγόνου, του κυτοχρώματος c και του αντιδραστήριου οξειδάσης (μονοϋδρωχλωρική p- αμινοδιμεθυλανιλίνη) οξειδώνουν το αντιδραστήριο για το σχηματισμό μιας έγχρωμης ένωσης, της ινδοφαινόλης. Η αντίδραση γίνεται αντιληπτή, συνήθως εντός 10 δευτερολέπτων, με την παραγωγή βαθύ μωβ χρώματος (MacFaddin, 2000).

- ◆Κάτω από ασηπτικές συνθήκες, παίρνεται ποσότητα κυττάρων από το επωασμένο τρυβλίο με τη βοήθεια μικρής ξύλινης ράβδου.
- ◆Το δείγμα των κυττάρων εξαπλώνεται στην εμποτισμένη με οξειδάση περιοχή.
- ◆Μετά από σχεδόν 10-30 δευτερόλεπτα, γίνεται παρατήρηση της περιοχής για τυχόν αλλαγή χρώματος.

2.4.11.2 Δοκιμή καταλάσης

Τα περισσότερα αερόβια βακτήρια παράγουν το ένζυμο, καταλάση. Αυτό το ένζυμο αποικοδομεί τα τοξικά υπεροξειδία και με αυτό τον τρόπο ο μικροοργανισμός αυτοπροστατεύεται. Η αρχή της δοκιμής βασίζεται στη διάσπαση του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε ύδωρ και οξυγόνο:



Όταν η καλλιέργεια (συνήθως μια αποικία) αναμιγνύεται με διάλυμα υπεροξειδίου του υδρογόνου, το ένζυμο που είναι παρόν στους θετικούς στην

καταλάση μικροοργανισμούς, μπορεί να γίνει αντιληπτό με την απελευθέρωση φυσαλίδων και τον αφρισμό. Η απουσία παραγωγής φυσαλίδων εντός μερικών δευτερολέπτων δείχνει αρνητικούς στην καταλάση μικροοργανισμούς. (Bell, 2005)

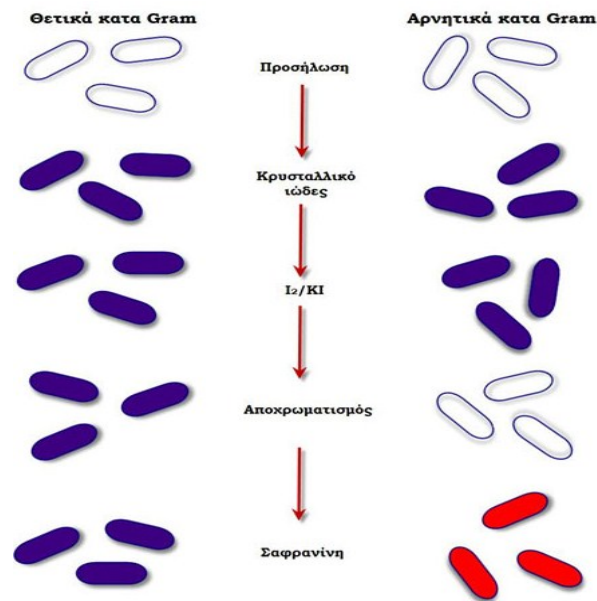
- ◆ Με πιπέτα μεταβλητού όγκου, διαβρέχεται, (σταγόνα –σταγόνα) το επωασμένο τρυβλίο με διάλυμα 3% H₂O₂.
- ◆ Παρατήρηση αφρισμού ή όχι

2.4.11.3 Χρώση κατά Gram

Η χρώση των κυττάρων κατά Gram αποτελεί ένα από τους σημαντικότερους ταξινομικούς παράγοντες των μικροοργανισμών. Ανήκει στις λεγόμενες διαφορικές χρώσεις επειδή τα κύτταρα δεν χρωματίζονται κατά τον ίδιο τρόπο. Έτσι ανάλογα με την αντίδραση που παρουσιάζουν τα βακτήρια στη χρώση Gram διακρίνονται σε δυο μεγάλες ομάδες α) τα Gram-θετικά και β) Gram-αρνητικά βακτήρια. Αυτή η διαφοροποίηση οφείλεται στην διαφορετική δομή του κυτταρικού τοιχώματος στις δύο ομάδες βακτηρίων.

- ◆ Μια σταγόνα απιονισμένου νερού τοποθετείται σε αντικειμενοφόρο πλάκα. Κύτταρα βακτηρίων από το επωασμένο τρυβλίο μεταφέρονται ασηπτικά με βακτηριολογικό κρίκο και δημιουργείται κατά το δυνατόν ομοιογενές γαλάκτωμα. Στη συνέχεια η σταγόνα εξαπλώνεται στην κεντρική περιοχή της αντικειμενοφόρου πλάκας με τη βοήθεια βακτηριολογικού κρίκου.
- ◆ Το παρασκεύασμα προσηλώνεται περνώντας την αντικειμενοφόρο πλάκα πάνω από τη φλόγα λύχνου, χωρίς όμως να υπερθερμανθεί. Η προσήλωση ολοκληρώνεται όταν το παρασκεύασμα στεγνώσει.
- ◆ Επί του παρασκευάσματος προστίθενται μερικές σταγόνες κρυσταλλικού ιώδους και η χρωστική επαφίεται να δράσει για 1 min.
- ◆ Στη συνέχεια απομακρύνεται η περίσσεια της χρωστικής με νερό και το παρασκεύασμα επεξεργάζεται για 3 min με διάλυμα I₂/KI. Το παρασκεύασμα ξεπλένεται με αλκοόλη (σταγόνα-σταγόνα για 1-3 min) και στη συνέχεια με άφθονο νερό (επίσης σταγόνα-σταγόνα).

- ♦ Το παρασκεύασμα καλύπτεται με σαφρανίνη (για 1-2 min) και στη συνέχεια ξεπλένεται η περίσσεια της χρωστικής με νερό.
- ♦ Η περίσσεια του νερού απομακρύνεται με απορροφητικό χαρτί, χωρίς αυτό να σύρεται στην επιφάνεια της πλάκας. Ακολουθεί μικροσκοπική παρατήρηση σε μεγέθυνση X100 (με ελαιοκατάδυση).



Εικόνα 2.5. Τεχνική χρώσης κατά Gram

2.4.11.4 Έλεγχος ικανότητας κίνησης

Η βακτηριακή κινητικότητα παρατηρείται μακροσκοπικά από την εξάπλωση της ζώνης ανάπτυξης σε σχέση με τη γραμμή του ενοφθαλμισμού. Σκοπός της δοκιμής είναι να καθοριστεί αν ο οργανισμός παρουσιάζει κινητικότητα μέσω των μαστιγίων σε μια δεδομένη θερμοκρασία.

Θετικά Τα βακτήρια που "μεταναστεύουν" μέσω διάχυσης και προκαλούν θολότητα και προεκβολές γύρω από τη γραμμή ενοφθαλμισμού.

Αρνητικά Τα βακτήρια που η ανάπτυξή τους περιορίζεται στην γραμμή ενοφθαλμισμού.

- ♦ Με εργαστηριακή βελόνα παίρνεται ποσότητα κυττάρων από το επωασμένο τρυβλίο και ενοφθαλμίζεται κατά μήκος του κέντρου.

- ◆ Τοποθέτηση δοκιμαστικών σωλήνων σε θάλαμο επώασης σε θερμοκρασία 25°C για 48 ώρες.
- ◆ Παρατήρηση αποτελέσματος.

* Η σύσταση του θρεπτικού μέσου που χρησιμοποιήθηκε φαίνεται στον πίνακα 4.1 του Παραρτήματος.

2.4.11.5 Ζύμωση σακχάρων

Μερικοί μικροοργανισμοί μπορούν να χρησιμοποιήσουν ένα ή περισσότερα σάκχαρα ως πηγή ενέργειας με σκοπό την παραγωγή ATP. Τα βακτήρια ανάλογα με τα ένζυμα που παράγουν μπορούν να ζυμώνουν και διαφορετικά σάκχαρα. Από την ζύμωση αυτή των σακχάρων παράγεται οξύ. Για τον εντοπισμό οξείδωσης και ζύμωσης των σακχάρων προσθέεται δείκτης pH, την συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήθηκε μπλε της βρωμοκρεζόλης. Η θετική αντίδραση γίνεται αντιληπτή με την αλλαγή χρώματος, από μωβ δε κίτρινο.

Οι χρησιμοποιούμενες βιοχημικές δοκιμές για τον διαχωρισμό των *Listeria* spp. εμπλέκουν την παραγωγή οξέος από διαφορετικές πηγές άνθρακα, όπως D-ξυλόζη, L-ραμνόζη, α-μεθυλο-D-μαννόζη και D-μαννιτόλη. Η βιοχημική ταυτοποίηση των διαφόρων ειδών του γένους *Listeria* βάσει των προηγούμενων πηγών άνθρακα, φαίνεται στον Πίνακα 2.3.

Πίνακας 2.3: Βιοχημικός διαχωρισμός των ειδών του γένους *Listeria* (Allerberger, 2007)

	L. monocytogenes	L. seeligeri	L. ivanovii	L. innocua	L. welshimeri	L. grayi
D-ξυλόζη	-	+	+	-	+	-
L-ραμνόζη	+	-	-	V	V	V
α-μεθυλο- D-μαννόζη	+	-	-	+	+	+
D-μαννιτόλη	-	-	-	-	-	+

+: θετική αντίδραση, -: αρνητική αντίδραση, V: μεταβλητή (variable) αντίδραση

- ◆ Γυάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες γεμίζονται με 9ml μωβ υγρού βασικού διαλύματος (η σύσταση του φαίνεται στον Πίνακα.4.2 του Παραρτήματος)

- ◆ Προσθήκη 1 ml σακχάρου στους παραπάνω δοκιμαστικούς σωλήνες.
- ◆ Ενοφθαλμισμός σωλήνων με κύτταρα από επωασμένο τρυβλίο.
- ◆ Επώαση σε θερμοκρασία 37 °C για 48 ώρες.
- ◆ Παρατήρηση αποτελέσματος.

2.4.11.6 Αιμόλυση

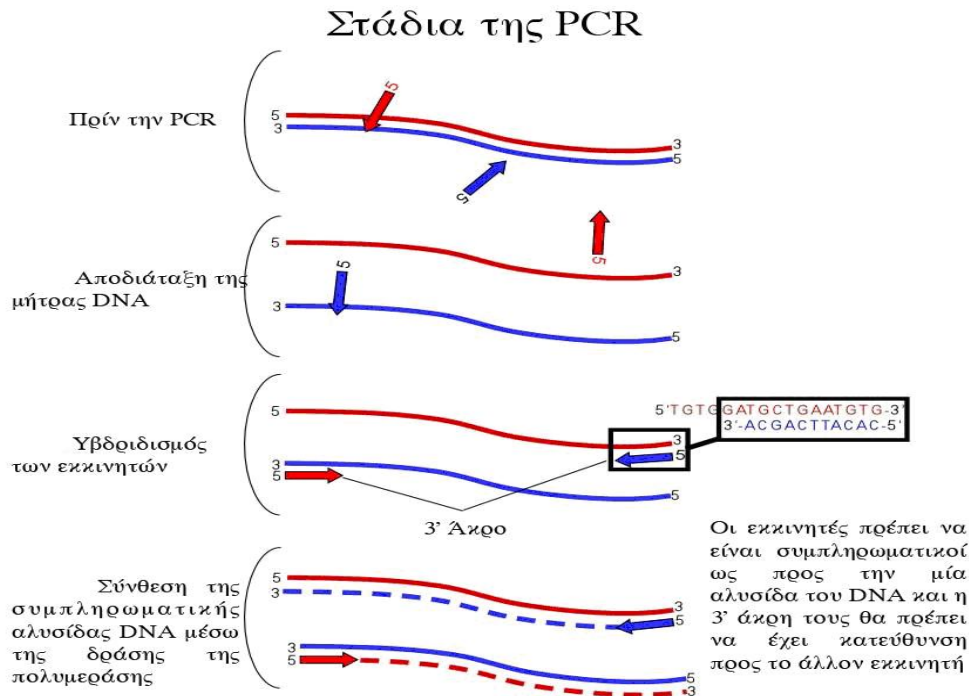
Ως αιμόλυση χαρακτηρίζεται η ικανότητα βακτηρίων να προκαλούν καταστροφή ή «λύση» σε ερυθρά αιμοσφαίρια. Όταν σε μέσο με άγαρ ενσωματωθεί αίμα το αποτέλεσμα είναι να χρωματιστεί κόκκινο. Εάν τα βακτήρια προκαλούν αιμόλυση, τότε γύρω και κάτω από την αποικία εμφανίζεται μια ζώνη αποχρωματισμένη όπου τα κύτταρα έχουν καταστραφεί. Η *L. monocytogenes* προκαλεί β-αιμόλυση.

- ◆ Σε τρυβλίο με θρεπτικό στο οποίο είναι ενσωματωμένο αίμα αλόγου, ενοφθαλμίζεται με κύτταρα από επωασμένο τρυβλίο.
- ◆ Επώαση σε θερμοκρασία 37 °C για 18-24 ώρες.
- ◆ Παρατήρηση αποτελέσματος.

2.4.11.7 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η PCR (αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης) αποτελεί μέθοδο της μοριακής βιολογίας η οποία μπορεί να πολλαπλασιάσει ένα μόριο DNA μέχρι και ένα δισεκατομμύριο φορές, δίνοντας τεράστιες ποσότητες συγκεκριμένων γονιδίων. Χρησιμοποιείται για την αξιόπιστη, γρήγορη, οικονομική ταυτοποίηση της *Listeria monocytogenes*. Η ενίσχυση τμημάτων DNA γίνεται με τη χρήση ειδικά σχεδιασμένων εκκινήτων. Οι εκκινήτες είναι σχεδιασμένοι, έτσι ώστε να είναι συμπληρωματικοί αλληλουχιών που εντοπίζονται σε διαφορετικές αλυσίδες της μήτρας αντιγραφής και εκατέρωθεν της ακολουθίας που πρόκειται να ενισχυθεί. Οι ακριβείς συνθήκες πραγματοποίησης μιας τυπικής αντίδρασης PCR προσαρμόζονται κάθε φορά στις απαιτήσεις του συγκεκριμένου πειράματος.

Τα βήματα για τον πολλαπλασιασμό του DNA με PCR φαίνονται στην παρακάτω εικόνα:



Εικόνα 2.6. Στάδια της PCR

Απομόνωση DNA

1. Ανανέωση στελέχους σε 5 ml κατάλληλου θρεπτικού ζωμού (π.χ. BHI, MRS) για τουλάχιστον 24 h σε αντίστοιχα κατάλληλη θερμοκρασία, αναλόγως του μικροοργανισμού.
2. Φυγοκέντρηση (3500 rpm x 10 min, 4°C) και παραλαβή ιζήματος.
3. Έκπλυση κυττάρων με 5 ml NaPBS.
4. Φυγοκέντρηση (3500 rpm x 10 min, 4°C).
5. Απόρριψη υπερκείμενου και επαναιώρηση σε 1 ml διαλύματος 1 M σορβιτόλης και 0.1 M EDTA, pH 7.5.
6. Λύση κυττάρων με υπέρηχους (4 min).
7. Φυγοκέντρηση (13400 rpm x 10 min).
8. Απόρριψη υπερκείμενου και διάλυση ιζήματος σε 0.5 ml διαλύματος 50 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA, pH 7.4.
9. Ισχυρή ανάδευση (vortex).
10. Προσθήκη 50 μl SDS 10% και επώαση στους 65°C για 30 min (Thermolyne ή υδατόλουτρο).

11. Προσθήκη 0.2 ml οξικού καλίου 5 M και άμεση πτώση της θερμοκρασίας (πάγος) για 30 min.
12. Φυγοκέντρηση (13400 rpm x 10 min).
13. Παράλληλα με το βήμα 12 τοποθετούμε σε καθαρό eppendorf 1 ml ισοπροπανόλης.
14. Γρήγορη προσθήκη υπερκείμενου στην ποσότητα ισοπροπανόλης και καλή ανάδευση με πιπέτα.
15. Παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min.
16. Φυγοκέντρηση (14000 rpm x 10 min) και απόρριψη υπερκείμενου.
17. Αφήνουμε για 5-10 min ώστε η ισοπροπανόλη να εξατμιστεί τελείως
18. Προσθήκη 0.5 ml αιθανόλης (70%).
19. Φυγοκέντρηση (14000 rpm x 5 min) και απόρριψη υπερκείμενου.
20. Όμοια με το βήμα 17 ώστε να εξατμιστεί τελείως η αιθανόλη, η οποία δρα παρεμποδιστικά στην PCR.
21. Προσθήκη 50 μl δις απεσταγμένου H₂O και διάλυση ιζήματος με πιπέτα.
22. Αποθήκευση σε θερμοκρασία -20°C.

Ανάλυση DNA σε πηκτή αγαρόζης

Για τη διαπίστωση της επιτυχούς απομόνωσης DNA σύμφωνα με τα παραπάνω, πραγματοποιούμε οριζόντια ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης η οποία περιλαμβάνει τα εξής:

1. Πιάνουμε με χαρτοταινία τα πλαϊνά της βάσης της πηκτής και τοποθετούμε το χτενάκι(α) συνήθως στη μέση.
2. Προετοιμάζουμε το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροδίων (electrode or running buffer) προσθέτοντας 4.6 ml Tris-Acetate-EDTA 50x μέχρι τελικού όγκου 230 ml (συμπληρώνοντας με dH₂O).
3. Παρασκευή πηκτής αγαρόζης 1.5% T, με προσθήκη 0.45 g αγαρόζης σε 30 ml ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροδίων και θερμαίνεται στο φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να λιώσει.
4. Στη ρευστοποιημένη αγαρόζη προστίθεται 10 μl βρωμιούχου αιθιδίου (ethidium bromide)
5. Περιμένουμε έως ότου σχηματιστεί η πηκτή.
6. Αραίωση 5 μl δείγματος σε 1 μl χρωστικής φόρτωσης (loading dye).

7. Τοποθέτηση 5 μl καθενός δείγματος ανά κελί.
8. Τρέξιμο ηλεκτροφόρησης με σταθερή παροχή ρεύματος 60 V για περίπου 30 min.



Εικόνα 2.7 Συσκευή ηλεκτοφόρησης

Ενίσχυση ακολουθιών DNA με τη χρήση της τεχνικής PCR

1. Σε ειδικό σωλήνα erpendorf προστίθενται τα παρακάτω:

Μήτρα DNA	2 μl	} → Όγκος master mix
Εκκινητής 1	1 μl	
Εκκινητής 2	1 μl	
Μίγμα dNTP's	1 μl	
Buffer	5 μl	
Taq DNA πολυμεράση	0.25 μl	
ddH ₂ O	40.75 μl	

2. Τοποθετούμε τα erpendorfs στην συσκευή PCR και τρέχουμε το κατάλληλο πρόγραμμα .
3. Ακολουθεί νέα οριζόντια ηλεκτροφόρηση .

Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα που χρησιμοποιείται για την ενίσχυση του DNA είναι:

1. Αρχική αποδιάταξη 94 °C για 2 λεπτά
2. Αποδιάταξη 94 °C για μισό λεπτό
3. Υβριδισμός εκκινητών 55 °C για μισό λεπτό
4. Επιμήκυνση 74 °C για 1 λεπτό
5. Τελική επιμήκυνση 72 °C για 5 λεπτά

Τα στάδια 2,3,4 επαναλαμβάνονται 40 φορές.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ & ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1 Αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί

Οι φυσικοχημικές αλλαγές που λαμβάνουν χώρα κατά την αλλοίωση του κρέατος είναι πολύπλοκες και στενά συνδεδεμένες με τις μεταβολές της μικροβιακής χλωρίδας, με άλλα λόγια η εξέλιξη των μικροοργανισμών στο κρέας επηρεάζει αλλά ταυτόχρονα επηρεάζεται από αλλαγές που συμβαίνουν στην σύσταση (είδος και διαθεσιμότητα πηγών ενέργειας, είδος μεταβολιτών και το pH του οικοσυστήματος. Οι μεταβολές στις μικροβιολογικές και φυσικοχημικές ιδιότητες του κρέατος είναι δυναμικές και εξελίσσονται στον χωροχρόνο. Είναι πια κοινώς αποδεκτό ότι οι φυσικοχημικές αλλαγές ανιχνεύονται στην υδατική φάση του κρέατος, μέσα στην οποία περιλαμβάνονται γλυκόζη, γαλακτικό οξύ, αμινοξέα, νουκλεοτίδια, ουρία και υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες, συστατικά δηλαδή τα οποία καταβολίζονται από σχεδόν όλα τα βακτήρια της μικροχλωρίδας του κρέατος (Nychas et al., 2008))

Οι κατανομές των πληθυσμών των μικροοργανισμών, που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία, και είναι σε θέση να προκαλέσουν αλλοίωση του νωπού χοιρινού κιμά δίνονται συνοπτικά στον Πίνακα 3.1. Στην εικόνα 3.1 φαίνεται η μορφή των αποικιών μερικών από τους μικροοργανισμούς που μελετήθηκαν.

Πίνακας 3.1 Κατανομές δυνητικά αλλοιογόνων μικροοργανισμών χοιρινού κιμά

<i>Μικροοργανισμός</i>	<i>Μέση τιμή (log cfu/g)</i>	<i>Τοπική απόκλιση (log cfu/g)</i>
OMX	6.84	0.76
Ψευδομονάδες	6.55	1.08
<i>Br. thermosphacta</i>	5.86	0.97
Οξυγαλακτικά βακτήρια	5.82	0.77
Ζύμες-Μύκητες	4.59	0.65
H ₂ S-παραγωγα βακτήρια	4.46	1.21

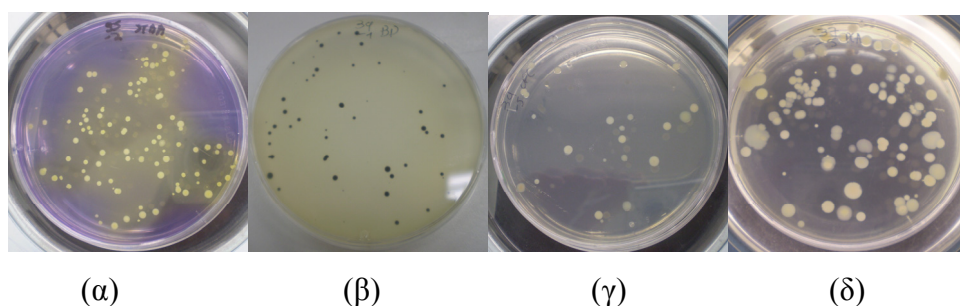
Όπως φαίνεται οι ψευδομονάδες, ο *Br. thermosphacta* και τα οξυγαλακτικά βακτήρια αποτελούν κατά σειρά κυριαρχίας τις τρεις πολυπληθέστερες ομάδες δυνητικά αλλοιογόνων μικροοργανισμών του νωπού κιμά. Πιο συγκεκριμένα οι ψευδομονάδες κυριαρχούν στο κρέας σε σχέση με τους υπόλοιπους

μικροοργανισμούς, γεγονός το οποίο οφείλεται στον γρήγορο ρυθμό ανάπτυξης των βακτηρίων αυτών (Koutsoumanis et al., 2004). Έρευνες, σε κιμά έδειξαν ότι οι ψευδομονάδες κυριαρχούν του *Br. thermosphacta* σε αερόβιες συνθήκες (Koutsoumanis, 2008). Έχει βρεθεί ότι τρία είναι τα πιο σημαντικά είδη ψευδομονάδων για κρέατα που συντηρούνται κάτω από αερόβιες συνθήκες (*P. fragi*, *P. fluorescens*, *P. lundensis*). Κατα τη διάρκεια της αλλοίωσης παρατηρείται μείωση στη συγκέντρωση των δυο τελευταίων με το *fragi* να γίνεται το κυρίαρχο είδος (Drosinos and Board, 1995a).

Τα Gram θετικά βακτήρια (οξυγαλακτικά και *Br. thermosphacta*) είναι κύρια αιτία αλλοίωσης σε τροποποιημένες ατμόσφαιρες (Nychas, 1999). Σε τροποποιημένες ατμόσφαιρες και σε κενό παρατείνεται ο χρόνος ζωής του κιμά αναστέλλοντας τις ψευδομονάδες και ευνοώντας τα οξυγαλακτικά και το *Br. thermosphacta*, λόγω αναερόβιων συνθηκών. Η αναστολή των ψευδομονάδων έχει αποδειχτεί ιδιαίτερα ευνοική για τη βιομηχανία, αφού τα τελικά προϊόντα των οξυγαλακτικών και του *Br. thermosphacta* είναι λιγότερο δύσοσμα σε σχέση με τους μεταβολίτες του *Pseudomonas* (Skandamis and Nychas, 2001a).

Η συμβολή των μυκήτων και ζυμών στην αλλοίωση του κρέατος δεν έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, λόγω της μικρής συμβολής τους. Οι ζύμες και οι μύκητες δεν ξεπερνούν τα βακτήρια στο κρέας, εκτός αν παρουσιαστεί κάποιος βακτηριοστατικός παράγοντας (Drosinos, 1999)

Επιπρόσθετα, σύμφωνα με τον Κανονισμό (ΕΚ) 1441/2007 της Ε.Ε. περί μικροβιολογικών κριτηρίων για τα τρόφιμα, η υγειονομολογική κατάσταση των δειγμάτων χοιρινού κιμά σε σχέση με την OMX ($6.84 \pm 0.76 \log \text{cfu/g}$) είναι μη αποδεκτή ($5 \times 10^5 - 5 \times 10^6 \text{ cfu/g}$ ή $5.70 - 6.70 \log \text{cfu/g}$).



Εικόνα 3.1 Μορφή αποικιών στα θρεπτικά υποστρώματα (α) STAA, (β) BPA, (γ)CFC, (δ)PCA

3.2 Δείκτες υγιεινής

Οι μικροοργανισμοί δείκτες αντανακλούν τη μικροβιολογική ποιότητα των τροφίμων σε σχέση με τη διάρκεια συντηρήσεως τους ή την ασφάλεια των τροφίμων από τους παθογόνους μικροοργανισμούς. Όταν η παρουσία τους υπερβαίνει ορισμένα προκαθορισμένα όρια για κάθε είδος τροφίμου, θεωρείται ένδειξη παραμονής του τροφίμου σε συνθήκες στις οποίες είναι πιθανή η μίανση του με παθογόνους μικροοργανισμούς ή ευνοείται η αύξηση των παθογόνων μικροοργανισμών. Οι κατανομές των πληθυσμών των μικροοργανισμών που μελετήθηκαν και χρησιμοποιούνται ως δείκτες υγιεινής δίνονται συνοπτικά στον Πίνακα 3.2.

Πίνακας 3.2. Κατανομές δεικτών υγιεινής

<i>Μικροοργανισμός</i>	<i>Μέση τιμή</i> <i>(log cfu/g)</i>	<i>Τυπική απόκλιση</i> <i>(log cfu/g)</i>
Εντεροβακτήρια	3.41	1.05
Ολικά κολοβακτηριοειδή	2.95	0.99
<i>E.coli</i>	1.14	0.45
<i>Staphylococcus</i> spp	4.37	1.00
<i>Staphylococcus . aureus</i>	2.39	1.13

Πιο συγκεκριμένα, οι παραπάνω κατανομές των δεικτών υγιεινής αφορούν το 98, 84 και 22% των δειγμάτων που βρέθηκαν θετικά, για τα εντεροβακτήρια, τα ολικά κολοβακτηριοειδή, το *E.coli* αντίστοιχα. Όσο αφορά την καταμέτρηση του πληθυσμού *St. aureus* προκύπτει από 11 από τα 50 δείγματα (22%) που ανιχνεύτηκε.

Ο πληθυσμός των τριών παραπάνω δεικτών υγιεινής σε σχέση με τον πληθυσμό των αλλοιογόνων μικροοργανισμών που μελετήθηκαν είναι μικρότερος. Τα μέλη της οικογένειας *Enterobacteriaceae* μαζί με τα οξυγαλακτικά βακτήρια παίζουν ρόλο στην αλλοίωση σε κρέας υπό κενό.

Επιπρόσθετα, σύμφωνα με τον Κανονισμό (ΕΚ) 1441/2007 της Ε.Ε. περί μικροβιολογικών κριτηρίων για τα τρόφιμα, η υγειονομική κατάσταση των δειγμάτων χοιρινού κιμά σε σχέση με τον δείκτη κοπρανώδους μόλυνσης *E.coli* ήταν εντός των επιτρεπτών ορίων (50-500 cfu/g ή 1.70-2.70 log cfu/g).

Οι συντελεστές συσχέτισης κατά Pearson κατέδειξαν ότι η μεγαλύτερη συσχέτιση (0.75) υφίσταται μεταξύ OMX και ψευδομονάδων, ενώ η μικρότερη

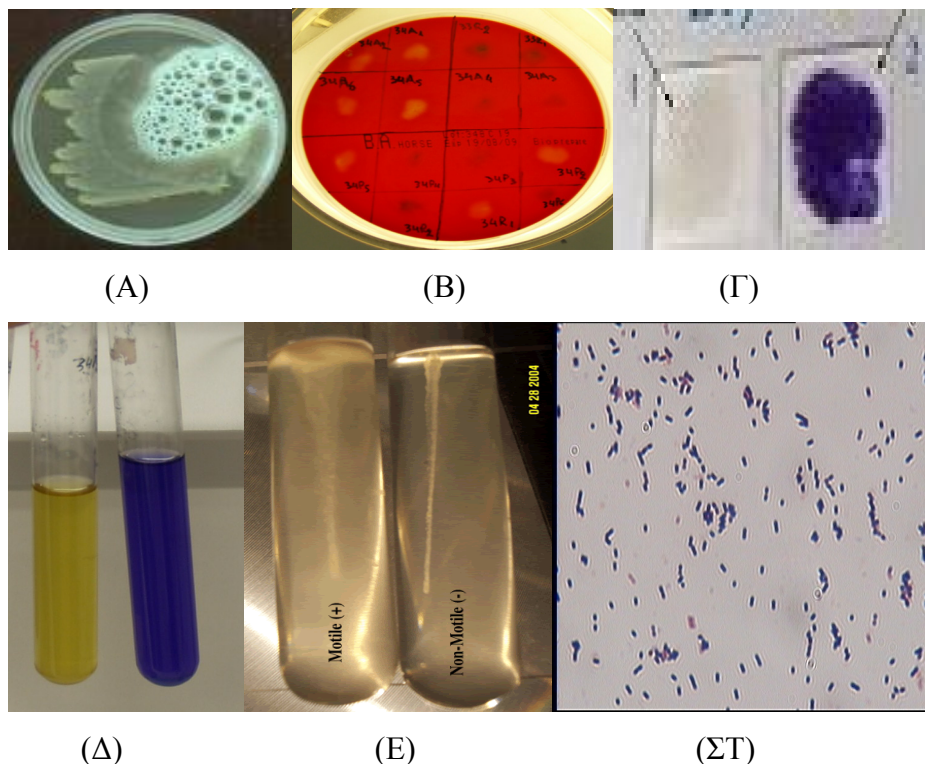
συσχέτιση (0.27) υπάρχει μεταξύ ψευδομονάδων και ολικών κολοβακτηριοειδών. Τα παραπάνω αποτελέσματα, δικαιολογούνται δεδομένου ότι οι δυο τελευταίες ομάδες βακτηρίων, παρέχουν διαφορετικού είδους πληροφορίες σχετικά με το προϊόν. Πιο συγκεκριμένα, οι ψευδομονάδες σχετίζονται με τον χρόνο ζωής/εμπορίας των τροφίμων ενώ τα ολικά κολοβακτηριοειδή με τις συνθήκες υγιεινής.

3.3 *Listeria monocytogenes*

Πρώτα έγινε έλεγχος των εκατό (100) δειγμάτων ως προς την πιθανή παρουσία του μικροοργανισμού *L. monocytogenes* με εφαρμογή κλασικών μικροβιολογικών μεθόδων, οι οποίες περιλαμβάνουν την καλλιέργεια σε χρωμογόνα στερεά επιλεκτικά υποστρώματα, όπως είναι τα ALOA και RAPID'L.mono καθώς και σε μη χρωμογόνα στερεά επιλεκτικά υποστρώματα, όπως είναι το PALCAM ,το οποίο όμως ανιχνεύει *Listeria* spp. Ειδικότερα, η ανίχνευση και η αρίθμηση του μικροοργανισμού-στόχου *L. monocytogenes* έγινε σύμφωνα με τα πρότυπα ISO 11290-1:1996 και ISO 11290-2:1998 αντίστοιχα. Ακολούθησε η επιβεβαίωση της ύπαρξης του παθογόνου με διεξαγωγή σειράς κατάλληλων βιοχημικών δοκιμών αλλά και χρήση της μεθόδου αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). Συγκεκριμένα, για την επιβεβαίωση του γένους *Listeria* χρησιμοποιήθηκαν οι εξής δοκιμές: ικανότητα κίνησης, χρώση κατά Gram, αντίδραση στην καταλάση και στην οξειδάση ενώ για την επιβεβαίωση του είδους *L. monocytogenes* χρησιμοποιήθηκαν οι δοκιμές: β-αιμόλυση και ζύμωση των σακχάρων ραμνόζης, ξυλόζης,μανιτόλης και α-μεθυλ-D-μανοπυρανοζιδίου). Για την PCR ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο που περιγράφηκε από τους D'Agostino et al.

Από την καλλιέργεια στα τρυβλία για την αρίθμηση αποικιών του μικροοργανισμού *L. monocytogenes*, προέκυψε ότι η συγκέντρωση του παθογόνου στα δείγματα χοιρινού κιμά ήταν κάτω του ορίου αρίθμησης της μεθόδου (<10 cfu/g). Ο εμπλουτισμός είχε ως αποτέλεσμα την ανίχνευση του παθογόνου σε ποσοστό δειγμάτων 16% (PALCAM), 19% (ALOA) και 26% (RAPID'L.mono). Ως εκ τούτου απομονώθηκαν συνολικά 296 χαρακτηριστικές αποικίες του μικροοργανισμού-στόχου. Οι βιοχημικές δοκιμές (Εικόνα 3.2) και η PCR κατέδειξαν την ύπαρξη ψευδώς θετικών (false-positive) και ψευδώς αρνητικών (false-negative) δειγμάτων. Τελικά, η παρουσία *L. monocytogenes* επιβεβαιώθηκε σε 22 από τα 34 αρχικώς

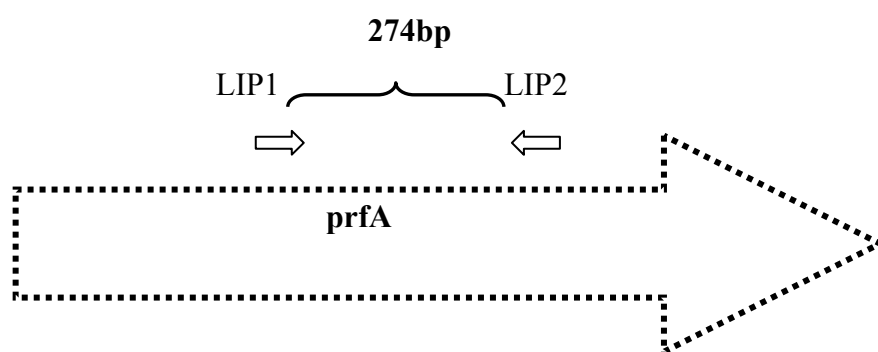
ύποπτα δείγματα, συνδυάζοντας τα αποτελέσματα επιβεβαίωσης των τριών χρησιμοποιούμενων υποστρωμάτων.



Εικόνα 3.2 Βιοχημικές δοκιμές. (Α) Δοκιμή καταλάσης (Β) Αιμόλυση (Γ) Δοκιμή οξειδάσης (Δ) Ζύμωση σακχάρων (Ε) Έλεγχος ικανότητας κίνησης (ΣΤ) Χρώση κατά Gram

Πιο συγκεκριμένα για την διεξαγωγή της PCR λήφθηκαν υπόψη τα ακόλουθα. Όλα τα γονίδια παθογένειας στη *Listeria monocytogenes* βρίσκονται υπό τον έλεγχο της ενεργοποιού πρωτεΐνης prfA. Αυτή η πρωτεΐνη είναι μέλος της CAP/FnR οικογένειας των μεταγραφικών ρυθμιστών και η αλληλουχία της είναι χαρακτηριστική για τη *Listeria monocytogenes*. Έτσι προκειμένου να γίνει ταυτοποίηση του παθογόνου μικροοργανισμού, πραγματοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) για τα δείγματα που προέκυψαν ως θετικά από τις βιοχημικές δοκιμές, για την περαιτέρω επιβεβαίωση της ύπαρξης του παθογόνου.

Πιο συγκεκριμένα, οι εκκινητές lip1 και lip2 κατευθύνονται με αντίθετη φορά, υβριδίζοντας στην χαρακτηριστική αλληλουχία του γονιδίου prfA από το νουκλεοτίδιο 634 στο 654 και από το 886 στο 907 αντίστοιχα (Πίνακας 3.3). Επομένως στην περίπτωση παρουσίας *Listeria monocytogenes*, με την εφαρμογή της PCR θα ενισχυθεί αλληλουχία του συγκεκριμένου γονιδίου, μεγέθους 274 bp (Σχήμα 3.1).



Σχήμα 3.1 Η θέση των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης να ενισχυθεί χαρακτηριστική αλληλουχία του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes*

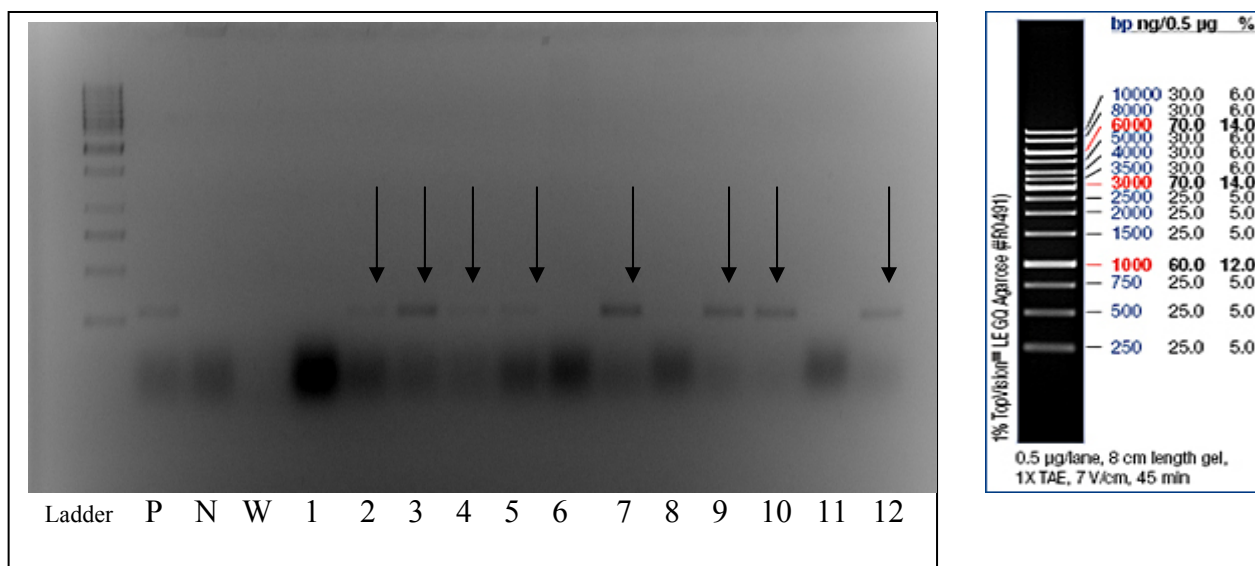
Στην Εικόνα 3.3.A παρουσιάζονται ενδεικτικά αποτελέσματα, ορισμένων από τα δείγματα, από την ανάλυση των προϊόντων της PCR αντίδρασης, σε πηκτή αγαρόζη, με τη χρήση των lip1 και lip2 εκκινητών. Τα κατά προσέγγιση μεγέθη των προϊόντων των αντιδράσεων PCR, υπολογίστηκαν με τη βοήθεια μάρτυρα μοριακών μεγεθών, του οποίου τα μεγέθη των ζωνών παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.3.B και είναι μεγέθους περίπου 10000 βάσεων.

Προκύπτουν τα ακόλουθα: τα δείγματα 2,3,4,5,7,9,10,12 φέρουν το χαρακτηριστικό γονίδιο της *Listeria monocytogenes*, υπεύθυνο για τη λοιμογόνο δράσης της αφού φέρουν ζώνη μεγέθους περίπου 250 bp ενώ τα δείγματα 1,6,8,11 είναι αρνητικά, Εικόνα 3.3.A.

Με τον τρόπο αυτό επιβεβαιώθηκαν 22 δείγματα ως θετικά για την παρουσία *Listeria monocytogenes*. Οπότε ο επιπολασμός του μικροοργανισμού είναι 22%.

Πίνακας 3.3. Γονίδιο στόχος, αλληλουχίες εκκινητών της PCR, μέγεθος προϊόντος

Στόχος	Εκκινητής	Κατεύθυνση	Αλληλουχία(5'→3')	Μέγεθος
prfA	Lip1	Forward	GATACAGAAACATCGGTTGGC	Lip1-Lip2
	Lip 2	Reverse	GTGTAAC TTGATGCCATCAGG	274bp



P: positive marker, N: negative marker, W: water

(A)

(B)

Εικόνα 3.3 (A) Ανάλυση σε πηκτή αгарόζης (1,7%) των προϊόντων της PCR αντίδρασης με την χρήση των lip1 και lip2 εκκινητών και μήτρα DNA από τα δείγματα 1-12. (B) Μάρτυρας μοριακών μεγεθών.

Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων ανίχνευσης του παθογόνου μικροοργανισμού *L. monocytogenes* στον κιμά, περιελάμβανε την εφαρμογή προχωρημένων μεθόδων στατιστικής ανάλυσης (Bayesian inference) με τη χρήση του λογισμικού προγράμματος WinBUGS για την πρόβλεψη/εκτίμηση των παραμέτρων: επιπολασμός παθογόνου (p), ευαισθησία (Se) και ικανότητα εξειδίκευσης (S_p) μεθόδου. Επίσης, για την εκτίμηση της συγκέντρωσης (concentration, c) του βακτηρίου στο προϊόν, ένα ανάλογο μοντέλο κατά Bayesian αναπτύχθηκε στο Excel

και προσομοιώθηκε με το λογισμικό πρόγραμμα @Risk 4.5 για τη γραφική παράσταση της κατανομής του παθογόνου.

Στους Πίνακες 3.4 και 3.5 παρουσιάζονται για κάθε υπόστρωμα ξεχωριστά οι παρατηρούμενες και οι εκτιμώμενες από το μοντέλο τιμές των εξεταζόμενων παραμέτρων που αφορούν τον μικροοργανισμό *L. monocytogenes* (p , c) και τα τρία επικρατέστερα χρησιμοποιούμενα στερεά επιλεκτικά υποστρώματα (Se , Sp) για την ανίχνευσή του.

Πίνακας 3.4. Παρατηρούμενες τιμές παραμέτρων ανίχνευσης του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* σε νωπό χοιρινό κιμά, μετά από καλλιέργεια σε PALCAM, ALOA και RAPID'L.mono και επιβεβαίωση των ύποπτων αποικιών για κάθε υπόστρωμα ξεχωριστά

Θρεπτικά υποστρώματα			
Παράμετρος	PALCAM	ALOA	RAPID'L.mono
Επιπολασμός (p)*		22%	
Επιπολασμός (p)	16%	15%	17%
Συγκέντρωση (c)	<10 cfu/g	<10 cfu/g	<10 cfu/g
Ευαισθησία (Se)	72.7%	68.2%	77.3%
Ικανότητα εξειδίκευσης (Sp)	100%	94.9%	88.5%

* Η τιμή προέκυψε από το συνδυασμό των αποτελεσμάτων της ανίχνευσης και επιβεβαίωσης των ύποπτων αποικιών του κάθε υποστρώματος.

Πίνακας 3.5 Εκτιμώμενες τιμές παραμέτρων ανίχνευσης του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* σε νωπό χοιρινό κιμά, με μοντελοποίηση κατά Bayesian

Θρεπτικά υποστρώματα			
Παράμετρος	PALCAM	ALOA	RAPID'L.mono
Επιπολασμός (p)*		22.7% (CI: 14-33%)	
Επιπολασμός (p)	16.7% (CI: 10.1-24.4%)	19.6% (CI: 12.6-27.8%)	26.5% (CI: 18.6-35.4%)
Συγκέντρωση (c)	10.9 cfu/kg	13.9 cfu/kg	17.2 cfu/kg

	(CI: 5.9-17.9 cfu/kg)	(CI: 7.8-22.8 cfu/g)	(CI: 10.7-26.2 cfu/g)
Ευαισθησία (<i>Se</i>)	69.6% (CI: 49.8-86.2%)	65.0% (CI: 44.9-82.7%)	73.7% (CI: 54.2-89.2%)
Ικανότητα εξειδίκευσης (<i>Sp</i>)	98.7% (CI: 95.4-100%)	93.6% (CI: 87.4-97.9%)	87.3% (CI: 79.5-93.6%)

* Η τιμή προέκυψε από το συνδυασμό των αποτελεσμάτων της ανίχνευσης και επιβεβαίωσης των ύποπτων αποικιών του κάθε υποστρώματος.
CI: 95% διάστημα εμπιστοσύνης.

Από τη μελέτη των προηγούμενων πινάκων, φαίνεται ότι, αναφορικά με τις παραμέτρους που αφορούν τα χρησιμοποιούμενα υποστρώματα (*Se*, *Sp*), η διαφορά μεταξύ των παρατηρούμενων και των εκτιμώμενων από το μοντέλο τιμών ήταν αρκετά μικρότερη του αποδεκτού ορίου 20%.

Συμπερασματικά, τα δεδομένα που προκύπτουν από τη μικροβιολογική εξέταση δειγμάτων μπορεί να αποκλίνουν από την πραγματική τιμή, ανάλογα με το χρησιμοποιούμενο θρεπτικό υπόστρωμα αύξησης του μικροοργανισμού-στόχου. Επίσης, το μοντέλο πρόβλεψης που αναπτύχθηκε έδωσε αξιόπιστες εκτιμήσεις όσον αφορά τις εξεταζόμενες παραμέτρους. Έτσι, η παράλληλη χρήση τριών θρεπτικών υποστρωμάτων προσδίδει ιδιαίτερη αξία στην ανίχνευση του παθογόνου μικροοργανισμού *L. monocytogenes*, καθώς με χρήση προχωρημένων στατιστικών μεθόδων ανάλυσης (Bayesian inference) δύναται να εκτιμηθούν με αξιοπιστία οι πραγματικές τιμές των παραμέτρων, μειώνοντας την αβεβαιότητα (uncertainty) λόγω εμφάνισης ψευδώς θετικών ή/και ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων. Με τον τρόπο αυτό, τα δεδομένα των ερευνών μπορούν να αξιολογηθούν ορθότερα και να ερμηνευθούν αξιόπιστα, γεγονός που ενδιαφέρει ιδιαίτερα όταν πρόκειται για μελέτες αξιολόγησης κινδύνου (risk assessment studies). Σπουδαία είναι βεβαίως και η σημασία των παραπάνω αφού επιτυγχάνεται χρονική και οικονομική εξοικονόμηση.

Ακόμα οι μικροβιακές συσχετίσεις που προέκυψαν μεταξύ αλλοιογόνου γλωρίδας και ορισμένων μικροβιακών δεικτών υγιεινής χοιρινού κινμά, είναι απόλυτα λογικές.

Εν κατακλείδι, σχετικά με τις τιμές των πληθυσμών των μικροοργανισμών που μελετήθηκαν υπάρχει περιθώριο βελτίωσης. Κάτι τέτοιο μπορεί να επιτευχθεί με

βελτίωση των συνθηκών που επικρατούν κατά τη σφαγή, τον τεμαχισμό του σφάγιου, την επεξεργασία του νωπού κρέατος, τη συντήρηση και τη διανομή του προϊόντος, με το ζώο και το περιβάλλον του να εστιάζουν την μεγαλύτερη προσοχή. Ακόμα, καθίσταται απαραίτητη η εφαρμογή και τήρηση κανόνων ορθής βιομηχανικής/υγιεινής πρακτικής (GMP_S/GHP_S).

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίνακας 4.1 Σύσταση θρεπτικού μέσου που χρησιμοποιείται στη δοκιμή ικανότητας κίνησης

<i>Συστατικά</i>	<i>Ποσότητα</i>
Πεπτόνη καζεΐνης	20g
Πεπτόνη κρέατος	6,1g
Άγαρ	5g
Απιονισμένο νερό	1000 ml

Πίνακας 4.2 Σύσταση υγρού διαλύματος για τον έλεγχο ζύμωσης σακχάρων

<i>Συστατικά</i>	<i>Ποσότητα</i>
Πεπτόνη G	10g
Χλωριούχο νάτριο,	5g
Μπλε της βρωμοκρεζόλης	0,02g
Απιονισμένο νερό	1000 ml

Πίνακας 4.3 Σύσταση του θρεπτικού Iron Agar

<i>Συστατικά</i>	<i>Ποσότητα</i>
Πεπτόνη	20g
Πεπτόνη κρέατος	3g
Εκχύλισμα ζύμης	3g
Κιτρικό άλας σιδήρου	0,3g
Τρισουλφίδιο νατρίου	0,3g
Χλωριούχο νάτριο	5g
L-κυστεΐνη	0,6g
Άγαρ	12g
Απιονισμένο νερό	1000 ml

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ
ΠΙΝΑΚΩΝ-ΕΙΚΟΝΩΝ-ΣΧΗΜΑΤΩΝ
ΠΙΝΑΚΩΝ-ΕΙΚΟΝΩΝ-ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Πίνακας 1.1.	Θρεπτική αξία χοιρινού κρέατος	Σελ. 4
Πίνακας 1.2.	Βιολογικοί κίνδυνοι στο κρέας	Σελ. 27
Πίνακας 1.3.	Φυσικοί κίνδυνοι στο κρέας	Σελ. 29
Πίνακας 1.4.	Χημικοί κίνδυνοι στο κρέας	Σελ. 29
Πίνακας 1.5	Σημεία ελέγχου, κίνδυνοι, προληπτικά μέτρα και παρακολούθηση για τα κρεοπωλεία	Σελ. 31
Πίνακας 2.1	Χρησιμοποιούμενα εργαστηριακά όργανα και συσκευές	Σελ. 38
Πίνακας 2.2.	Θρεπτικό μέσο ανάπτυξης, μικροοργανισμοί που αναπτύσσονται σε αυτά, τεχνική ενοφθαλμισμού τους και συνθήκες επώασης	Σελ. 45
Πίνακας 2.3	Βιοχημικός διαχωρισμός των ειδών του γένους <i>Listeria</i> (Allerberger, 2007)	Σελ. 50
Πίνακας 3.1	Κατανομές δυνητικά αλλοιογόνων μικροοργανισμών χοιρινού κιμά	Σελ. 56
Πίνακας 3.2.	Κατανομές δεικτών υγιεινής	Σελ. 58
Πίνακας 3.3.	Γονίδιο στόχος, αλληλουχίες εκκινητών της PCR, μέγεθος προϊόντος	Σελ. 62
Πίνακας 3.4.	Παρατηρούμενες τιμές παραμέτρων ανίχνευσης του μικροοργανισμού <i>Listeria monocytogenes</i> σε νωπό χοιρινό κιμά, μετά από καλλιέργεια σε PALCAM, ALOA και RAPID'L.mono και επιβεβαίωση των ύποπτων αποικιών για κάθε υπόστρωμα ξεχωριστά	Σελ. 63
Πίνακας 3.5	Εκτιμώμενες τιμές παραμέτρων ανίχνευσης του μικροοργανισμού <i>Listeria monocytogenes</i> σε νωπό χοιρινό κιμά, με μοντελοποίηση κατά Bayesian	Σελ. 63
Σχήμα 1.1.	Μεταβολή στη προμήθεια χοιρινού κρέατος για την κάλυψη των αναγκών του ελληνικού πληθυσμού κατά την περίοδο 1960-2002 (kg/άτομο/έτος)	Σελ. 4
Σχήμα 1.2	Διάγραμμα ροής εμπορίας νωπού κρέατος	Σελ. 31
Σχήμα 2.1	Διάγραμμα ροής πειραματικής διαδικασίας	Σελ. 42
Εικόνα 2.1	Ομογενοποιημένο δείγμα	Σελ. 40
Εικόνα 2.2	Μέθοδος διαδοχικών αραιώσεων	Σελ. 41
Εικόνα 2.3	Τεχνική της επιφανειακής εξάπλωσης	Σελ. 44

Εικόνα 2.4	Τεχνική ενοφθαλμισμού (streaking)	Σελ. 46
Εικόνα 2.5	Τεχνική χρώσης κατά Gram	Σελ. 49
Εικόνα 2.6	Στάδια της PCR	Σελ. 52
Εικόνα 2.7	Συσκευή ηλεκτοφόρησης	Σελ. 54
Σχήμα 3.1	Η θέση των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης να ενισχυθεί χαρακτηριστική αλληλουχία του μικροοργανισμού <i>Listeria monocytogenes</i>	Σελ. 61
Εικόνα 3.1	Μορφή αποικιών στα θρεπτικά υποστρώματα (α) STAA, (β) BPA, (γ)CFC, (δ)PCA	Σελ. 57
Εικόνα 3.2	Βιοχημικές δοκιμές. (Α) Δοκιμή καταλάσης (Β) Αιμόλυση (Γ) Δοκιμή οξειδάσης (Δ) Ζύμωση σακχάρων (Ε) Έλεγχος ικανότητας κίνησης (ΣΤ) Χρώση κατά Gram	Σελ. 60
Εικόνα 3.3	(Α) Ανάλυση σε πηκτή αγαρόζης (1,7%) των προϊόντων της PCR αντίδρασης με την χρήση των lip1 και lip2 εκκινητών και μήτρα DNA από τα δείγματα 1-12. (Β) Μάρτυρας μοριακών μεγεθών.	Σελ. 62

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- **Allerberger, F. (2007).** *Listeria*. In: Foodborne Diseases (Simjee, S., eds.).1st Edition. Infectious Disease, Humana Press, Totowa, New Jersey, pp. 27-39 (Chapter2).
- **Andrew Zajac and P.J. Huffstutter,(2010).** Cost of food-borne illnesses is deemed much higher than earlier estimates. Los Angeles Times
- **Anonymous. (2002).** Food Safety and Foodborne Illness. Fact Sheet N°237, WHO. Βρίσκεται στην ηλεκτρονική διεύθυνση (τελευταία ενημέρωση Μάρτιος 2007): <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs237/en/index.html> .
- **Ascherio A., Rimm E. B., Giovannucci E. L., Spiegelman D., Stampfer M., Willet W. C. (1996).** Dietary fat and risk of coronary heart disease in men: cohort follow up study in the United States. Br. Med. J.;313:84-90
- **Borch,E., M-L. Kant-Muermans, Y. Blixt.(1996).** Bacterial spoilage of meat and cured meat products. Int J Microbiol 33:103-120.
- **Chris Bell, Paul Neaves & Antony P Williams. (2005).**Food microbiology and laboratory practice.1st ed, Blackwell
- **Cox, N.A. and J.S.Bailey. (1999).** Incidence and behaviour of *Listeria monocytogenes* in poultry and eggs.In:E.T. Ryser and E.H.Marsh(eds). *Listeria,listeriosis and foodsafety*.pp565-600. Marcel Dekker, New York.
- **Γεωργάκης, Σπ.Α. (2005).** Το κρέας και τα προϊόντα του. Εκδόσεις Σύγχρονη Παιδεία, Θεσσαλονίκη.
- **Dainty,R.H., B.M. Mackey. (1992).** The relationship between the phenotypic properties of bacteria from chill-stored meat and spoilage processes. J Appl Bacteriol Symp Suppl 73:103S-114S.
- **Dillon, V.M. (1998).** Yeasts and moulds associated with meat and meat products. In: A Davies, R Board. Eds. *The Microbiology of Meat and Poultry*. London :Blackie Academic & Professional, pp 85-117
- **Drosinos, E.H., (1994).** Microbial associations of minced lamb and their ecophysiological attributes. Ph.D thesis,University of Bath, United Kingdom
- **Egan, A.F., T.A Roberts. (1987).** Microbiology of meat and meat products. In: JR Norris, GL Pettipher. Eds. *Eddays in Agricultural and Food Microbiology*. New York: John Wiley and Sons,pp 167-197
- **Farber J.M and P.I Peterkin. (2000).** Themicrobiological safety and quality of food. Volumes II. Pp 1178-1232 Aspen Publishers Inc. Gaitherburg MD.
- **Garcia-Lopez, M.L., M.Prieto, A. Otero. (1998).** The physiological attributes of Gram-negative bacteria associateed with spoilage of meat and meat products. In: A

Davies, R Board. Eds. The Microbiology of Meat and Poultry. London :Blackie Academic & Professional, pp 1-34

- **Genigeoris, C. (2005).** Ετήσια έκθεση αποτελεσμάτων ερευνητικού προγράμματος SMAS
- **Gill, C.O., K.G.Newton. (1977).** The development of aerobic spoilage on meat stored at chill temperatures. J Appl Bacteriol 43:189-195
- **Gill, C.O. (1998).** Microbiological contamination of meat during slaughter and butchering of cattle, sheep and pigs. In: A Davies, R Board. Eds. The Microbiology of Meat and Poultry, pp118-157. London:Blackie Academic and Professional.
- **Gormley, F.J. , C.L. Little , K.A. Grant , E. de Pinna , J. McLauchlin. (2010).** The microbiological safety of ready-to-eat specialty meats from markets and specialty food shops: A UK wide study with a focus on Salmonella and *Listeria monocytogenes*. Food Microbiology 27 243-249
- **Jay J.M. (2000).** Modern Food Microbiology, 6th ed. Gaithersburg: Aspen Publishers.
- **Kaferstein, F. K. (2003).** Actions to Reverse the Upward Curve of Foodborne Illness. Food Control, 14, 101-109.
- **Κανονισμός (ΕΚ) αρ. 853/2004** του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου της 29ης Απριλίου 2004 για τον καθορισμό ειδικών κανόνων υγιεινής για τα τρόφιμα ζωικής προέλευσης
- **Koutsoumanis K.P., Stamatiou A.P., Drosinos E.H., Nychas G.-J.E. (2008).** Control of spoilage microorganisms in minced pork by a shelf-developed modified atmosphere induced by the respiratory activity of meat microflora. Food Microbiol. 25: 915-921.
- **Koutsoumanis,K. and J.N.Sofos. (2005).** Microbiology of carcasses and cuts. In: Jensen W., Devine C., and Dikeman, M.eds. Encyclopedia of Meat Sciences. Academic Press.
- **Koutsoumanis, K., P.S. Taoukis and G,J.E. Nychas. (2004b).** Development of Safety Monitoring and Assurance System for chilled food products. International Journal of Food Microbiology, (in press).
- **Madigan, M.T., M.J.Martinko, J. Parker. (2005).** Βιολογία μικροοργανισμών. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης
- **MacFaddin, J.F. (2000).** Biochemical tests for identification of medical bacteria, 3rd ed. Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore.
- **Mc Laurin, J.S., R.T.Mitchell, W.J.Smerdon. (2004).** *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterization for use in microbiological risk assessment of foods.Journal Food Microbiol.92:15-33

■ **Nottingham, P.M. (1982).** Microbiology of carcass meats. In: MH Brown. Ed. Meat Microbiology. London: Applied Science Publishers, pp 13-63.

Grau, F.H., 1986. Microbial ecology of meat and poultry. In: AM Pearson, TR Dutson. Eds. Advances in Meat Research, vol. 2, Meat and Poultry Microbiology, pp 1-47. Westport: AVI Publishing Company Inc.

■ **Nychas G.J.E., Drosinos E. and Board R.G. (1998).** Chemical changes in stored meat. In the Microbiology of Meat and Poultry ed. Board, R.G. and Davies A.R. pp 288-326. London: Blackie Academic and Professional.

■ **Nychas G.J.E., Skandamis P.N., Tassou C.C., Koutsoumanis K.P. (2008).** Meat spoilage during distribution. Meat science 78: 77-89.

■ **Nychas, G.J.E., P.A. Gibbs, R.G. Board, J.J. Sheridan. (1994).** Improving the safety and quality of meat products by modified atmosphere and assessment by novel methods. FLAIR proposal No 89055, Contract No AGRF/0024 (SCP), Final Report, EU, DGXII, Brussels, Belgium

■ **Okutani, A., Y. Okada, S. Yamamoto, S. Igini. (2004).** Overview of *Listeria monocytogenes* contamination in Japan. Journal Food Microbiol. 93:131-140

■ **Οδηγός Υγιεινής Για Κρεοπωλεία . (2004).** Υπουργείο Ανάπτυξης-Ενιαίος Φορέας Ελέγχου Τροφίμων-ΕΦΕΤ

■ **Panoulis, C. Genigeorgis C, Kokinakis M, Tselentis I. (2003).** Prevalence of *Listeria monocytogenes* and *Listeria* spp. In the environment and raw meat products during pig slaughtering, deboning and meat products during operations. 5th International Symposium on the Epidemiology and Control of Foodborne Pathogens in Pork. pp297-8

■ **Schmidt K and Tirado C. (2001)** WHO Surveillance Programme for Control of Foodborne Infections and Intoxications in Europe. 8th Report 1999-2000

■ **Schlundt, J. (2002).** New Directions in Foodborne Disease Prevention. International Journal of Food Microbiology, 78, 3-17.

■ **Swaminathan, B. (2001).** *Listeria monocytogenes*. Food Microbiology, 2nd edition, pp383-409 ASM Press, Washington DC.

■ **Walker, H.W., J.C. Ayres. (1970).** Yeasts as spoilage organisms. In: AH Rose, JS Harrison. Eds. The Yeasts, vol. 3, Yeasts Technology. London: Academic Press, pp 463-527

■ <http://www.fsis.usda.gov/OPPDE/nis/outreach/models/HACCP-9.pdf>

■ http://www.freshplaza.com/news_detail.asp?id=59898

■ <http://microbeid.com/Methods/motility.html>

■ <http://www.nut.uoa.gr>

■ <http://www.faostar.fao.org>

■ <http://www.bmlabs-mag.gr/?p=1364>