



2017

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ
Π.Μ.Σ. ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ
ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΟΙΟΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ & ΥΓΙΕΙΝΗΣ
ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΠΟΤΩΝ

Μελέτη της εσωτερικοποίησης προσαρμοσμένων σε συνθήκες ήπιας καταπόνησης κυττάρων του μικροοργανισμού *Salmonella enterica* spp. *enterica* serovar Enteritidis, σε φυλλώδη λαχανικά.

ΤΣΑΔΑΡΗΣ Α. ΣΩΤΗΡΙΟΣ
ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ (Π.Μ.Σ.)

ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΟΙΟΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ & ΥΓΙΕΙΝΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

**Μελέτη της εσωτερικοποίησης προσαρμοσμένων σε
συνθήκες ήπιας καταπόνησης κυττάρων του
μικροοργανισμού *Salmonella enterica* spp. *enterica* serovar
Enteritidis, σε φυλλώδη λαχανικά.**

Επιβλέπων καθηγητής: Σκανδάμης Παναγιώτης (Αναπληρωτής Καθηγητής)

Εξεταστική – Συμβουλευτική Επιτροπή:

Σκανδάμης Παναγιώτης (Αναπληρωτής Καθηγητής)

Δροσινός Ελευθέριος (Καθηγητής)

Μαλούχος Αθανάσιος (Λέκτορας)

ΤΣΑΛΔΑΡΗΣ Α. ΣΩΤΗΡΙΟΣ

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
(Π.Μ.Σ.)**

**Μελέτη της εσωτερικοποίησης προσαρμοσμένων σε
συνθήκες ήπιας καταπόνησης κυττάρων του
μικροοργανισμού *Salmonella enterica* spp. *enterica* serovar
Enteritidis, σε φυλλώδη λαχανικά.**

Επιβλέπων καθηγητής: Σκανδάμης Παναγιώτης (Αναπληρωτής Καθηγητής)

Εξεταστική – Συμβουλευτική Επιτροπή:

Σκανδάμης Παναγιώτης (Αναπληρωτής Καθηγητής)

Δροσινός Ελευθέριος (Καθηγητής)

Μαλούχος Αθανάσιος (Λέκτορας)

ΤΣΑΛΔΑΡΗΣ Α. ΣΩΤΗΡΙΟΣ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων του τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Θα ήθελα να απευθύνω τις θερμότερες ευχαριστίες μου στον επιβλέποντα αυτής της μεταπτυχιακής ερευνητικής μελέτης και Αναπληρωτή Καθηγητή του τμήματος Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής του Ανθρώπου κ. Σκανδάμη Παναγιώτη, όχι μόνο για την ανάθεση του θέματος και για την εμπιστοσύνη του στο πρόσωπό μου, όσον αφορά στη σωστή διεκπεραίωση της μεταπτυχιακής μελέτης είτε σε επίπεδο διεξαγωγής των πειραμάτων είτε σε επίπεδο συγγραφής της, αλλά και για την πολύτιμη βοήθεια, καθοδήγηση και εν γένει συμβολή του καθ' όλη τη διάρκεια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών. Δε θα μπορούσα να παραλείψω την έκφραση των θερμότερων ευχαριστιών μου στον υποψήφιο διδάκτορα Γριβοκωστόπουλο Νικόλαο για τη βοήθεια και την ανεκτίμητη συνεισφορά του στην εκπόνηση αυτής της μελέτης, για την προθυμία του και την καθοδήγηση του τόσο κατά τη διάρκεια διεξαγωγής των πειραμάτων όσο και για τη συγγραφή της. Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να αποδώσω και στην υποψήφια διδάκτορα Μακαρίτη Ιφιγένεια για τη βοήθεια της στη διεξαγωγή των πειραμάτων καθώς και για τις πολύτιμες συμβουλές της σε όλη τη διάρκεια της μελέτης μου. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλο το προσωπικό του εργαστηρίου για την άψογη συνεργασία μας και τη δημιουργία ενός ευχάριστου περιβάλλοντος στον εργαστηριακό χώρο αλλά και όλους όσους έμμεσα ή άμεσα συνεισέφεραν στην ολοκλήρωση αυτής της μεταπτυχιακής μελέτης. Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στην οικογένεια μου για την αμέριστη συμπαράσταση και στήριξή τους μέχρι την ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής αυτής μελέτης.

Στον ανιψιό μου Δημήτρη Ισίδωρο Κ. Γεωργούση

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	7
ABSTRACT	8
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
1.1 Η σημασία των λαχανικών στην διατροφή του ανθρώπου.....	10
1.2 Έτοιμα προς κατανάλωση λαχανικά	11
1.2.1. Ιταλικά χόρτα	12
1.2.2. Μαρούλι	13
1.2.3. Ρόκα.....	13
1.2.4. Σπανάκι.....	14
1.3. Κίνδυνοι τροφιμογενών λοιμώξεων	14
1.4. Παθογόνοι μικροοργανισμοί στα λαχανικά.....	16
1.5. <i>Salmonella</i> spp	17
1.5.1. Χαρακτηριστικά του γένους <i>Salmonella</i>	20
1.5.2. Ταξινόμηση και ονοματολογία.....	21
1.6. Σαλμονέλλωση	22
1.6.1. Επιδημιολογικά στοιχεία της σαλμονέλλωσης.....	23
1.6.2. Παθογένεια του μικροοργανισμού <i>Salmonella</i> spp.....	26
1.7. Πηγές επιμόλυνσης τροφίμων φυτικής προέλευσης	28
1.8. Νομοθεσία και ευρωπαϊκός κανονισμός	32
1.9. Προσκόλληση, εσωτερικοποίηση και επιβίωση του <i>Salmonella</i> spp. εντός του λαχανικού	32
1.10. Συνθήκες ήπιας καταπόνησης του παθογόνου μικροοργανισμού	34
1.10.1. Καταπόνηση ψύχους (cold stress)	35
1.10.2. Καταπόνηση ξήρανσης (desiccation stress)	35
1.10.3. Καταπόνηση έλλειψης θρεπτικών συστατικών (starvation stress).....	36
1.10.4. Όξινη καταπόνηση (acid stress)	36
1.11. Υπόθεση-σκοπός της παρούσας μελέτης	37
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	39
2.1. Αναλώσιμα υλικά	39
2.1.1. Χημικά αντιδραστήρια	39

2.1.2.	Θρεπτικά υποστρώματα	39
2.2.	Εργαστηριακός εξοπλισμός.....	40
2.3.	Μικροβιακά στελέχη	40
2.4.	Φυλλώδη Λαχανικά.....	41
2.5.	Πειραματική διαδικασία.....	42
2.5.1.	Ανανέωση των μικροοργανισμών	42
2.5.2.	Πειράματα εκτίμησης ολικών, προσκολλημένων και εσωτερικοποιημένων κυττάρων του παθογόνου μικροοργανισμού στα λαχανικά.	44
2.5.2.1.	Εμβολιασμός λαχανικών	45
2.5.2.2.	Δειγματοληψία	45
2.5.2.2.1.	Μέθοδος επιχρίσματος (swabbing)	47
2.5.2.2.2.	Μέθοδος εξυγίανσης επιφάνειας	47
2.5.2.2.3.	Μέθοδος διαδοχικών αραιώσεων	48
2.5.2.2.4.	Τεχνική επιφανειακής επίστρωσης (spread plate technique)	49
2.5.3.	Μέθοδος απαρίθμησης βακτηριακών αποικιών	49
2.5.4.	Ανάκτηση τραυματισμένων κυττάρων-Τεχνική διπλής στρώσης.....	50
2.5.5.	Μέτρηση pH.....	50
2.6.	Μελέτη του <i>Salmonella</i> Enteritidis ως προς το βαθμό προσκόλλησης και εσωτερικοποίησης στην επιφάνεια φυτικού ιστού	51
2.7.	Μέθοδοι έκθεσης σε συνθήκες ήπιων καταπονήσεων	51
2.7.1.	Προσαρμογή όξινης καταπόνησης.....	52
2.7.2.	Προσαρμογή καταπόνησης ψύχους.....	52
2.7.3.	Προσαρμογή καταπόνησης έλλειψης θρεπτικών συστατικών	52
2.7.4.	Προσαρμογή καταπόνησης ξήρανσης.....	53
3.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	54
3.1.	Βαθμός προσκόλλησης και εσωτερικοποίησης του <i>Salmonella</i> Enteritidis σε φυλλώδη λαχανικά	54
3.1.1.	Ικανότητα προσκόλλησης και εσωτερικοποίησης διαφορετικών επίπεδων εμβολίου του <i>S. Enteritidis</i> σε φυλλώδη λαχανικά	55
3.1.2.	Προσαρμογή του <i>S. Enteritidis</i> σε συνθήκες ήπιων καταπονήσεων	60
4.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	65
5.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	66

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο παθογόνος μικροοργανισμός *Salmonella* spp. δύναται να εποικίσει φυλλώδη λαχανικά είτε επιφανειακά (προσκόλληση) είτε διεισδύοντας στο εσωτερικό τους (εσωτερικοποίηση), φαινόμενο που καθιστά τις συμβατικές μεθόδους εξυγίανσης ανεπαρκείς.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η εκτίμηση της επίδρασης α) του επιπέδου του αρχικού εμβολίου και β) του ιστορικού (έκθεση σε ήπια καταπόνηση) κυττάρων *Salmonella* Enteritidis στην ικανότητα εσωτερικοποίησης τους σε τέσσερα φυλλώδη λαχανικά.

Σπανάκι, μαρούλι, ιταλικά χόρτα και ρόκα εμβολιάστηκαν με τη μέθοδο της εμβάπτισης με προσαρμοσμένα και μη προσαρμοσμένα (7, 6, 5, 4, 3 log CFU/mL) σε συνθήκες ήπιας καταπόνησης κύτταρα *Salmonella* Enteritidis. Ειδικότερα, η προσαρμογή των κυττάρων του παθογόνου έλαβε χώρα στις παρακάτω συνθήκες: α) όξινη καταπόνηση (1% γλυκόζη, 24 h στους 37 °C), β) ψυχρή καταπόνηση (7 ημέρες στους 4 °C), γ) συνθήκες έλλειψης θρεπτικών συστατικών (0.85% NaCl με pH 6.6, 48 h στους 37 °C) και δ) συνθήκες ξήρανσης (1.5 h στους 42 °C, 4 ημέρες στους 21 °C). Στη συνέχεια τα εμβολιασμένα λαχανικά συντηρήθηκαν υπό αερόβιες συνθήκες για 2 h και 48 h στους 5°C και 20°C (n=2x2). Με το πέρας της συντήρησης προσδιορίστηκε ο εσωτερικοποιημένος πληθυσμός του *Salmonella*. ύστερα από εξυγίανση της φυλλικής επιφάνειας με 1% w/v AgNO₃.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, ακόμη και χαμηλή αρχική συγκέντρωση του παθογόνου (3 log CFU/mL) ήταν επαρκής για να εσωτερικοποιείται ο παθογόνος σε φυλλώδη λαχανικά. Το επίπεδο, δε, του αρχικού εμβολίου του *Salmonella* φάνηκε να επηρεάζει την παραλλακτικότητα στην εσωτερικοποίηση του παθογόνου μεταξύ των διαφορετικών λαχανικών. Πιο συγκεκριμένα, αρχικό εμβόλιο 7.0 και 3.0 log CFU/mL είχε ως αποτέλεσμα εσωτερικοποίηση 3.0-4.5 και 1-1.5 log CFU/g κυττάρων *Salmonella* αντίστοιχα. Προηγούμενη έκθεση των βακτηριακών κυττάρων σε συνθήκες ήπιας καταπόνησης επηρέασε τόσο την ικανότητα εσωτερικοποίησής τους, όσο και την ικανότητα μετέπειτα ανάπτυξής τους στα λαχανικά. Ιδιαίτερα, προηγούμενη έκθεση του παθογόνου σε συνθήκες ξήρανσης δεκαπλασίασε τον πληθυσμό των εσωτερικοποιημένων κυττάρων. Προσαρμοσμένα σε συνθήκες ξήρανσης και μη προσαρμοσμένα κύτταρα του παθογόνου, παρουσίασαν ικανότητα εσωτερικοποίησης 10-50% και 1-4% (του αρχικού πληθυσμού) αντίστοιχα.

Τα παραπάνω αποτελέσματα συμβάλλουν στην πληρέστερη περιγραφή και κατανόηση του φαινομένου της εσωτερικοποίησης του παθογόνου *Salmonella* spp. στα φυλλώδη λαχανικά και στην καλύτερη εκτίμηση της επικινδυνότητάς του.

Λέξεις κλειδιά: *Salmonella*, εσωτερικοποίηση, προσαρμογή

ABSTRACT

Study of internalization adapted to mild stress conditions cells of microorganism *Salmonella enterica* spp. *enterica* serovar Enteritidis, in leafy vegetables.

Salmonella colonizes or penetrates leafy greens, phenomenon known as internalization. The ability of internalized bacteria to evade common disinfection practices poses a well-established risk.

Our aim was to study the effect of: i) inoculum size and ii) prior adaptation of *Salmonella* to sublethal stresses, on the internalization of the pathogen in four leafy vegetables.

Spinach, lettuce, arugula and endive were inoculated by immersion with adapted and non-adapted (7, 6, 5, 4, 3 log CFU/mL) *Salmonella* Enteritidis and subsequently stored at 5°C and 20°C for 2h and 48h (n=2x2). Adaptation of *Salmonella* was performed under the following sublethal stresses: i) acid stress (1% glucose, 24h at 37°C), ii) cold stress (7d at 4°C), iii) starvation (0.85% NaCl of pH 6.6, 48h at 37°C) and iv) desiccation (1.5h at 42°C, 4d at 21°C). Population of internalized *Salmonella* (after surface decontamination with 1% w/v AgNO₃) was assessed on selective media.

According to results, even low initial bacterial inoculum was adequate in order internalization of *Salmonella* in leafy vegetables to occur. However, the higher the initial inoculum, the higher the variability in internalization of *Salmonella* among vegetables. In particular, non-adapted *Salmonella* inoculum of 7.0 and 3.0 log CFU/mL resulted in 3.0-4.5 and 1.0-1.5 log CFU/g internalized cells respectively. Moreover, adaptation of the pathogen to mild stresses affected both its internalization ability as well as its subsequent growth capacity in the vegetables. Adapted to desiccation *Salmonella* showed increased internalization ability by approximately ten-fold manifested by the higher internalization rate (10-50%) compared to non-adapted *Salmonella* (1-4%).

Our findings contribute to elucidate *Salmonella* colonization and particularly internalization phenomenon in leafy vegetables and therefore could be supportive material in quantitative risk assessment of pathogens in fresh produce sector.

Keywords: *Salmonella*, internalization, stress adaptation

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στις μέρες μας καταναλώνονται ευρέως φρέσκα φρούτα και λαχανικά λόγω του οφέλους που προσφέρουν στην υγεία του ανθρώπου και λόγω της διαθεσιμότητας τους όλο το χρόνο (Van der Linden *et al.*, 2016). Τα φρέσκα λαχανικά καταναλώνονται σε μεγάλη κλίμακα παγκοσμίως και αποτελούν τη βάση για μια υγιή και ισορροπημένη διατροφή λόγω της υψηλής περιεκτικότητας τους σε θρεπτικά συστατικά και βιταμίνες. Η κατανάλωση τους ενθαρρύνεται σε πολλές χώρες από διάφορους οργανισμούς υγείας λόγω της προστασίας που παρέχουν ενάντια σε πολλές ασθένειες όπως είναι ο καρκίνος και οι καρδιαγγειακές παθήσεις (Berger *et al.*, 2010). Ωστόσο, πολλές μελέτες έχουν διαπιστώσει ότι ένα μεγάλο μέρος των τροφιμογενών κρουσμάτων αποδίδονται στην κατανάλωση φρέσκων φρούτων και λαχανικών και πιο συγκεκριμένα στα πράσινα φυλλώδη λαχανικά. Έτσι διατυπώνονται ανησυχίες σχετικά με την ασφάλεια των τροφίμων σε φρέσκα προϊόντα, όπως το πεπόνι, βότανα, μαρούλι, ντομάτες, σπανάκι, λάχανα και άλλα λαχανικά, εξαιτίας του γεγονότος ότι τα προϊόντα αυτά καταναλώνονται ωμά (Van der Linden *et al.*, 2016). Αυτή η έξαρση μπορεί να οφείλεται σε αλλαγές κατά την ατομική κατανάλωση, σε αυξημένη ένταση κτηνοτροφικής παραγωγής κοντά σε περιοχές μαζικής καλλιέργειας λαχανικών, στη μεγάλη διαθεσιμότητα των λαχανικών παγκοσμίως ακόμα και από χώρες περιορισμένης υγιεινής πρακτικής και στον αυξημένο αριθμό των ανοσοκατεσταλμένων καταναλωτών (Berger *et al.*, 2010).

Από τη στιγμή που τα περισσότερα λαχανικά υφίστανται ελάχιστη επεξεργασία και συχνά καταναλώνονται ωμά, η επιμόλυνση από παθογόνους μικροοργανισμούς παρουσιάζει υψηλό επίπεδο επικινδυνότητας. Επιπρόσθετα, ο τεμαχισμός και το ξεφλούδισμα των λαχανικών καταστρέφουν το φυτικό ιστό με αποτέλεσμα να απελευθερωθούν θρεπτικά συστατικά τα οποία διευκολύνουν την ανάπτυξη μικροοργανισμών. Μικροβιακή επιμόλυνση μπορεί να προκληθεί σε οποιοδήποτε στάδιο της τροφικής αλυσίδας από το χωράφι μέχρι το τραπέζι του καταναλωτή. Οι πηγές επιμόλυνσης μπορεί να είναι περιβαλλοντικής, ζωικής ή ανθρώπινης προέλευσης. Υπάρχουν πολλοί τρόποι μείωσης του μικροβιακού πληθυσμού. Πιο συνηθισμένος τρόπος θεωρείται το πλύσιμο με χλωρίνη ή με άλλα οργανικά οξέα μετά τη συγκομιδή, όμως η αποτελεσματικότητα αυτής της μεθόδου επηρεάζεται από παράγοντες όπως είναι ο σχηματισμός βιοϋμενίων από τα βακτήρια, η είσοδος των

μικροοργανισμών εντός του φυτικού ιστού καθώς και η υδροφοβία που παρουσιάζουν οι φυτικές επιφάνειες. Εναλλακτικές μέθοδοι αποτελούν η ακτινοβόληση, η εφαρμογή βακτηριοφάγων και ανταγωνιστικών βακτηρίων ή ο συνδυασμός αυτών (Olaimat et al., 2012).

Πολυάριθμα κρούσματα του *Salmonella* spp. έχουν συνδεθεί με την κατανάλωση των νωπών προϊόντων, κατά συνέπεια, τα νωπά προϊόντα θεωρούνται τρόφιμα υψηλού κινδύνου από την Αμερικανική Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων. Σχεδόν τα μισά (46%) τροφιμογενή κρούσματα από το 1998 μέχρι το 2008 στις ΗΠΑ έχουν αποδοθεί σε φρέσκα προϊόντα (Klein et al., 2009; Painter et al., 2013).

1.1 Η σημασία των λαχανικών στην διατροφή του ανθρώπου

Η κατανάλωση φρούτων και λαχανικών αποτελεί μέρος μιας υγιούς διαίτας και διατροφικού προφίλ γενικότερα. Η Μεσογειακή διατροφή αποτελεί ένα μοντέρνο τρόπο διατροφής η οποία έχει τις ρίζες της στις χώρες της Μεσογείου, όπως η Ελλάδα, η Ισπανία, η Πορτογαλία και η Νότια Ιταλία. Τα βασικά συστατικά που την απαρτίζουν είναι το λάδι, τα λαχανικά, τα δημητριακά, τα φρούτα, τα ψάρια, τα γαλακτοκομικά και η μικρή κατανάλωση κρέατος (Noah and Truswell, 2001).

Πολλές επιδημιολογικές μελέτες έχουν συσχετίσει την κατανάλωση φρούτων και λαχανικών με τον προστατευτικό ρόλο τους ενάντια σε πολλές ασθένειες. Ρίζες οξυγόνου μπορεί να αντιδράσουν μαζί με λίπη, πρωτεΐνες και DNA. Ο ρόλος των αντιοξειδωτικών που υπάρχουν στα φρούτα και στα λαχανικά είναι να διατηρούν τα χαμηλά επίπεδα των ελευθέρων ριζών είτε παρεμποδίζοντας την εμφάνισή τους, είτε ευνοώντας την αποσύνθεσή τους (Hancock *et al.*, 2007).

Τα λαχανικά χαρακτηρίζονται από τη μεγάλη περιεκτικότητά τους σε νερό, τη μικρή περιεκτικότητά τους σε λίπος, τη σχετικά μικρή περιεκτικότητά τους σε υδατάνθρακες και πρωτεΐνες και τη σημαντική περιεκτικότητά τους σε άλατα και βιταμίνες. Όλα τα λαχανικά και ιδιαίτερα τα πράσινα αποτελούν καλές πηγές για τη πρόσληψη σημαντικών αλάτων που είναι απαραίτητα για την εξουδετέρωση των οξέων που παράγονται κατά τη διάρκεια της πέψης του κρέατος, του τυριού και άλλων τροφίμων, συμβάλλοντας στην επίτευξη και διατήρηση της σωστής αντίδρασης του αίματος και των άλλων σωματικών υγρών. Χαρακτηριστικά παραδείγματα, αποτελούν το σπανάκι που είναι πλούσιο σε ασβέστιο, σίδηρο και

φώσφορο, το μαρούλι που είναι πλούσιο σε ασβέστιο και σίδηρο κ.ά. Σε ότι αφορά τις βιταμίνες που περιέχουν είναι αναγκαίες για την ανάπτυξη, την αναπαραγωγή και για τη διατήρηση της καλής υγείας του ανθρώπου και αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι της διατροφής του. Επιπλέον, τα πιο πολλά λαχανικά και ιδιαίτερα τα φυλλώδη όπως το λάχανο, το σπανάκι, το μαρούλι κλπ. χαρακτηρίζονται από υψηλή περιεκτικότητα σε κυτταρίνη και με τον σχετικά μεγάλο όγκο που έχουν βοηθούν στην πέψη άλλων συμπυκνωμένων τροφών, εξασφαλίζοντας με αυτό τον τρόπο την καλύτερη λειτουργία του πεπτικού συστήματος.

Στατιστικά στοιχεία που αναφέρονται στις Η.Π.Α, δείχνουν ότι η κατά κεφαλήν κατανάλωση των φρούτων και των φρέσκων λαχανικών αυξήθηκε σημαντικά από το 1982 έως το 1997, κατά 18% και 29% αντίστοιχα (Garrett *et al*, 2003) και συνεχίζει να αυξάνεται με εκθετικό ρυθμό και ως σήμερα. Άλλωστε, ο κλάδος της γεωργικής παραγωγής έχει αναπτυχθεί θεαματικά τα τελευταία χρόνια, με μεγάλες ποσότητες λαχανικών να εισάγονται στα διάφορα κράτη, πράγμα το οποίο καθιστά δύσκολους όμως τους ελέγχους τροφίμων. Το γεγονός αυτό καθώς και η τάση των ανθρώπων για κατανάλωση περισσότερων τροφίμων έτοιμων προς κατανάλωση (στα οποία ανήκουν και τα λαχανικά), είχε σαν αποτέλεσμα την αύξηση του αριθμού των κρουσμάτων τροφικών δηλητηριάσεων που συνδέονται με αυτά τα προϊόντα (Beuchat, 2002; Tauxe *et al.*, 1997; Sewell and Farber, 2001; Horby *et al*, 2003; Sivapalasingam *et al*, 2004; Doyle and Erickson, 2008; Lienemann *et al.*, 2011; Berger *et al.*,2010; FAO/WHO, 2008).

1.2. Έτοιμα προς κατανάλωση λαχανικά

Είναι ευρύτερα γνωστό ότι, λαχανικά όπως το μαρούλι, οι τομάτες είναι κύρια συστατικά μιας ισορροπημένης διατροφής. Επίσης φρούτα όπως οι φράουλες προτιμώνται από εκείνους που θέλουν να ακολουθούν την Μεσογειακή Διατροφή αλλά και από αυτούς που θέλουν να προσέχουν την υγεία τους.

Έτοιμα προς κατανάλωση (RTE) φρεσκοκομμένα λαχανικά είναι συνήθως συσκευασμένα για τη διευκόλυνση τη διατήρηση της φρεσκάδας . Διαφορετικές ποικιλίες μαρουλιού, όπως μαρούλι romaine, μαρούλι iceberg, μαρούλι lollo rosso, μαρούλια oak leaf και ραδίκια, αντίδια, ρόκα, σπανάκι, διαθέσιμα σε συσκευασμένη φρεσκοκομμένη μορφή χρησιμοποιούνται συχνά σε μικτές σαλάτες. Τα

συγκεκριμένα τρόφιμα δεν επιδέχονται κάποια θερμική ή άλλη επεξεργασία θανάτωσης παθογόνων μικροοργανισμών. Συσκευασμένες κομμένες σαλάτες είναι ιδιαίτερα ευπαθείς κατά τη διάρκεια αποθήκευσης περίπου 7-10 ημέρες υπό ψύξη σε θερμοκρασίες $\leq 5^{\circ}\text{C}$ (Tsironi *et al.*, 2016).

Η διάρκεια ζωής των προσυσκευασμένων σαλατών καθορίζεται από μικροβιακές και χημικές αλλαγές. Το σύνολο της αυτόχθονης χλωρίδας αλλοίωσης των προσυσκευασμένων σαλατών αποτελείται από ψευδομονάδες, οξυγαλακτικά βακτήρια, εντεροβακτήρια, ζύμες και μύκητες. Άλλες αιτίες της υποβάθμισης της ποιότητας περιλαμβάνουν την αμαύρωση και ενζυμική αποσύνθεση, η οποία μπορεί επίσης εν μέρει να αποδοθεί στα ένζυμα που απελευθερώνονται από μικροοργανισμούς. Ένας περιορισμένος αριθμός μοντέλων πρόβλεψης μικροβιακής θκανάπτυξης που περιγράφουν την επίδραση των συνθηκών επεξεργασίας και αποθήκευσης, για τη ποιότητα και το μικροβιακό κίνδυνο στα έτοιμα προς κατανάλωση νωπά κομμένα λαχανικά, έχει αναφερθεί. Τέτοια μοντέλα κάνουν αναφορά στο σπανάκι (Puerta-Gomez *et al.*, 2013), στο μπρόκολο (Kebede *et al.* 2015), στα καρότα (Barry-Ryan και O'Beirne, 1998) και στο μαρούλι (Zhan *et al.*, 2012., Zilelidou *et al.*, 2015).

1.2.1. Ιταλικά χόρτα

Τα Ραδίκια (*Cichorium intybus* L.) και το αντίδι (*Cichorium endivia* L.), ανήκουν στην οικογένεια *Asteraceae* και είναι λαχανικά που καταναλώνονται με διάφορους τρόπους και αυξανόμενους ρυθμούς, δεδομένου ότι γίνονται γνωστά ως είναι " υγιείς " και χαμηλής θερμιδικής αξίας τρόφιμα (DuPont *et al.*, 2000). Και τα δύο είδη είναι πολύ ελκυστικά και εκτιμώνται για την υφή και γεύση τους. Από αισθητική και θρεπτική άποψη, τα ραδίκια και το αντίδι επηρεάζονται κυρίως από δύο συγκεκριμένες κατηγορίες ενώσεων, τις λακτόνες sesquiterpene (SL) και τις φαινολικές ενώσεις. Οι SLs, ενώσεις είναι γνωστές και ως " πικρές ", είναι η C-15 τερπενοειδή ένωση, χαρακτηριστικό της *Asteraceae*, της *Umbelliferae* και της οικογενειών *Magnoliaceae* (Merfort *et al.*, 2002). Η SL, είναι υπεύθυνη της πικρής γεύσης του ραδικιού, και της βελτίωσης της όρεξη και της πέψης στον άνθρωπο (Kisiel και Zielinska, 2001). Αυτές είναι ενδιαφέρουσες ουσίες από τα χημικά

μονοπάτια που έχουν ερευνηθεί για υποθέσεις κατά του όγκου, κατά της λευχαιμίας, κυτταροτοξική, αντιμικροβιακή δράση (Price *et al.*, 1990, Tamaki *et al.*, 1995).

1.2.2. Μαρούλι

Το μαρούλι (*Lactuca Sativa L.*) καταναλώνεται κυρίως ως σαλάτα και αποτελεί μια πλούσια πηγή συστατικών ευεργετικών για την υγεία όπως η βιταμίνη C, τα καροτενοειδή και οι χλωροφύλλες. Περιλαμβάνει πολλά μακροστοιχεία (K⁺, Na⁺, Ca²⁺ και Mg²⁺) και ιχνοστοιχεία [Fe, Mn, Cu, Zn και Se], τα οποία αποτελούν σημαντικά συστατικά μιας σωστής διατροφής (Kawashima *et al.*, 2003). Το μαρούλι αποτελεί επίσης μία καλή πηγή φωτοσυνθετικών χρωστικών και άλλων φυτοχημικών τα οποία ωφελούν την διατροφή και διαδραματίζουν σπουδαίο ρόλο στην παρεμπόδιση πολλών οξειδωτικών σχετιζόμενων με το στρες ασθενειών (Liorach *et al.*, 2008).

1.2.3. Ρόκα

Η ρόκα είναι γνωστή από τους αρχαίους χρόνους και αναφέρεται στη Βοτανική του Διοσκουρίδη (*Material Medica*), η συγγραφή της οποίας έγινε τον 1ο αιώνα μ.Χ.. Με το όνομα «ρόκα» είναι γνωστά αρκετά είδη της οικογένειας *Brassicaceae*. Στην περιοχή της Μεσογείου χρησιμοποιούνται κυρίως 3 είδη: το ετήσιο είδος *Eruca sativa* Mill. που καλλιεργείται ευρέως καθώς και τα είδη *Diplotaxis tenuifolia* (L.) DC και *Diplotaxis muralis* (L.) DC που είναι κυρίως αυτοφυή φυτά και καλλιεργούνται σε περιορισμένη κλίμακα. Στις Μεσογειακές χώρες το είδος *Eruca sativa* Mill. είναι ένα πολύ δημοφιλές λαχανικό. Τα τελευταία χρόνια η ζήτηση για ρόκα συνεχώς αυξάνεται ενώ σε ορισμένες χώρες θεωρείται εκλεκτό προϊόν. Ένας από τους λόγους που καθιστά όλο και περισσότερο δημοφιλή τη ρόκα στους καταναλωτές είναι η υψηλή περιεκτικότητα της σε γλυκοσινολικά οξέα (glucosinolates –GLSs). Πρόσφατες έρευνες έχουν αποδείξει τη σημαντική περιεκτικότητα των ειδών της οικογένειας *Brassicaceae* σε θειογλυκοζίτες καθώς και την ευεργετική επίδραση στην υγεία του ανθρώπου (Fahey *et al.*, 1999, Holst *et al.*, 2004; Keck *et al.*, 2004). Τα γλυκοσινολικά οξέα υδρολύονται με το ένζυμο

μυροσινάση, που υπάρχει στα φυτά που τις περιέχουν, με αποτέλεσμα την παραγωγή διάφορων ουσιών μεταξύ των οποίων και ισοθειοκυανούχες ενώσεις (isothiocyanates). Πιστεύεται ότι οι ισοθειοκυανούχες ενώσεις είναι υπεύθυνες για την προστατευτική δράση των *Brassicaceae* στην υγεία του ανθρώπου, με την ουσία σουλφοραφάνη που βρέθηκε και στη ρόκα, να αποτελεί μια από τις περισσότερο υποσχόμενες αντικαρκινικές φυσικές ουσίες (Holst et al., 2004; Keck et al., 2004).

1.2.4. Σπανάκι

Το σπανάκι (*Spinacea oleracea* L.) καλλιεργείται σε πολλές χώρες του κόσμου καθώς και στην Ελλάδα. Ανήκει στην οικογένεια *Chenopodiaceae*. Είναι φυλλώδες λαχανικό και συνήθως καταναλίσκεται αφού μαγειρευτεί. Τα τελευταία χρόνια χρησιμοποιείται και νωπό σε σαλάτες σε συνδυασμό με άλλα λαχανικά, μανιτάρια, μπέικον κ.α. Για το λόγο αυτό η συγκομιδή, η επεξεργασία και γενική διαχείριση γίνεται προσεκτικά λόγω πιθανής μόλυνσης. Διατίθεται στη αγορά νωπό, κονσερβοποιημένο ή κατεψυγμένο. Επίσης είναι το λαχανικό με την μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε βιταμίνη Α, είναι πλούσιο σε βιταμίνη C, σε ασβέστιο (Ca) και πολύ καλή πηγή σιδήρου (Fe), φωσφόρου (P) και μαγνησίου (Mg). Για τον λόγο αυτό θεωρείται ένα από τα πλέον θρεπτικά φυλλώδη λαχανικά (Ολύμπιος, Χ.Μ., 2001., Mills, H. A et al., 2001).

1.3. Κίνδυνοι τροφιμογενών λοιμώξεων

Το τροφιμογενές νόσημα είναι κάθε νόσημα που προκαλείται από την κατανάλωση τροφίμου ή νερού. Συχνά χρησιμοποιείται και ο όρος υδατογενές νόσημα στην περίπτωση κατανάλωσης μολυσμένου νερού. Έχουν περιγραφεί περισσότερα από 250 διαφορετικά τροφιμογενή νοσήματα. Τα συχνότερα αναγνωριζόμενα είναι αυτά που προκαλούνται από τα βακτήρια *Campylobacter* spp.spp., *Salmonella* spp.spp., *Shigella* spp. και εντεροαιμορραγικό κολοβακτηρίδιο (EHEC), καθώς και από μια ομάδα ιών που είναι γνωστοί με την ονομασία *Noroviruses*. Οι τελευταίες δεκαετίες χαρακτηρίζονται από εξελίξεις που μπορεί να

εξηγήσουν σε σημαντικό βαθμό την αύξηση της συχνότητας εμφάνισης των τροφιμογενών νοσημάτων:

- η εισαγωγή νέων πρακτικών στην εκτροφή των ζώων και οι αλλαγές στην κτηνοτροφία που στοχεύουν στην αύξηση της παραγωγής
- οι αλλαγές στις γεωπονικές διαδικασίες και η χρήση χημικών ουσιών για τη βελτίωση της ποιότητας και ποσότητας της παραγωγής
- οι αλλαγές στην τεχνολογία των τροφίμων και στις διαδικασίες επεξεργασίας και συσκευασίας
- οι αλλαγές στον τρόπο ζωής, όπως αύξηση των ταξιδιών σε διεθνές επίπεδο και συχνή κατανάλωση τροφίμων εκτός του οικιακού περιβάλλοντος
- η αύξηση του διεθνούς εμπορίου με συνέπεια τη μεταφορά μικροοργανισμών από τη μια χώρα στην άλλη, την αύξηση του χρόνου μεταξύ προετοιμασίας και κατανάλωσης των τροφίμων και την έκθεση του πληθυσμού σε μεγαλύτερο αριθμό στελεχών/τύπων των παθογόνων που προκαλούν τροφιμογενή νοσήματα
- η αύξηση του αριθμού των ατόμων που ανήκουν σε ευπαθείς ομάδες του πληθυσμού, κυρίως λόγω της αύξησης του μέσου όρου ζωής και της αύξησης του ποσοστού των ανοσοκατασταλαμένων ατόμων
- οι κλιματικές αλλαγές όπως το φαινόμενο της υπερθέρμανσης και οι αλλαγές που αυτό επιφέρει.

Παράλληλα, τα τελευταία χρόνια παρατηρείται αύξηση της καταγραφής των τροφιμογενών νοσημάτων λόγω:

- της βελτίωσης των διαγνωστικών εργαστηριακών εξετάσεων που επιτρέπουν την αναγνώριση παθογόνων που στο παρελθόν ήταν άγνωστα ή δύσκολο να ανεβρεθούν
- της βελτίωσης των συστημάτων επιτήρησης των νοσημάτων και της ευαισθητοποίησης των κλινικών και εργαστηριακών γιατρών όσον αφορά την καταγραφή
- της ευαισθητοποίησης του κοινού σε θέματα που άπτονται της ασφάλειας των τροφίμων (ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ, 2017).

1.4. Παθογόνοι μικροοργανισμοί στα λαχανικά

Τα φυλλώδη λαχανικά μπορεί να μολυνθούν από ιούς, παράσιτα και παθογόνα βακτήρια. Οι ιοί που μπορεί να προκαλέσουν ανησυχία είναι ο ιός της ηπατίτιδας Α και ο πορονίγος και από τα πρωτόζωα είναι το *Cyclospora cayetanensis* και *Cryptosporidium parvum*. Τα βακτήρια που προκαλούν ανησυχία για τη δημόσια υγεία ανήκουν στα είδη *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Clostridium* spp., *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Vibrio cholerae*, *Campylobacter* spp. και *Yersinia enterocolitica*. Αξίζει να σημειωθεί πως οι παθογόνοι μικροοργανισμοί *Salmonella* spp. και *Escherichia coli* O157:H7 προκαλούν περιστατικά με υψηλή συχνότητα που σχετίζονται με την κατανάλωση νωπών λαχανικών. Ο χρόνος επιβίωσης των κολοβακτηριδίων και των παθογόνων βακτηρίων στα περισσότερα νωπά λαχανικά εξαρτάται από την υγρασία και τη θερμοκρασία στην οποία εκτίθενται. Σε 1100 καταγεγραμμένα κρούσματα που σχετίζονται με την κατανάλωση νωπών λαχανικών και στα οποία ταυτοποιήθηκε ο αιτιολογικός παράγοντας βρέθηκε ότι το 53% προκλήθηκε από βακτήρια, το 42,5% προκλήθηκε από ιούς και το 4,5% προκλήθηκε από παράσιτα (Ramos et al., 2013).

Πίνακας 1.1. Παθογόνοι μικροοργανισμοί οι οποίοι βρέθηκαν σε λαχανικά και προκάλεσαν ασθένεια (Beuchat et al., 1998)

Παθογόνος μικροοργανισμός	Τρόφιμο	Αναφορά
<i>Bacillus cereus</i>	Sprouts	Portnoy et al. (1976)
<i>Campylobacter sp.</i>	Αγγούρι	Kirk et al. (1997)
<i>Campylobacter jejuni</i>	Μαρούλι	CDC (1998)
<i>Clostridium botulinum</i>	Σαλάτα λαχανικών	PHLS (1978)
<i>Escherichia coli</i> O157	Ραδίκι	WHO (1996)
<i>Escherichia coli</i> O157	Μαρούλι	CDC (1997)
<i>Giardia sp.</i>	Καρότο	Mints et al. (1992)
<i>Salmonella Agona</i>	Λάχανο και κρεμμύδι	Clark et al. (1973)
<i>Salmonella Thompson</i>	Ρίζες λαχανικών	Kano et al. (1996)
<i>Shigella flexneri</i>	Μίγμα σαλάτας	Dunn et al. (1995)
<i>Shigella sonnei</i>	Μαρούλι iceberg	Kapperud et al. (1995)

1.5. *Salmonella spp*

Η εμπλοκή των βακτηρίων *Salmonella spp.* στις τροφικές δηλητηριάσεις περιγράφηκε πρώτη φορά το 1885 όπου ο μικροοργανισμός που αρχικά χαρακτηρίστηκε ως *Bacillus cholerae-suis*, απομονώθηκε από τον κτηνίατρο D.E. Salmon από γουρούνια που υπέφεραν από χολέρα. Άλλοι παρόμοιοι μικροοργανισμοί απομονώθηκαν από τροφιμογενείς λοιμώξεις και από μολυσμένα ζώα. Τα επιδημιολογικά στοιχεία υποδεικνύουν πως ο μικροοργανισμός *Salmonella spp.* είναι η κύρια αιτία πρόκλησης ασθενειών σε ανθρώπους από τροφιμογενή βακτήρια. Είναι αξιοσημείωτο ότι το πρόβλημα της σαλμονέλλωσης στον άνθρωπο λόγω κατανάλωσης μολυσμένων τροφίμων αυξάνεται παγκοσμίως. Ο μεγάλος αριθμός κρουσμάτων τροφιμογενούς σαλμονέλλωσης τις τελευταίες δεκαετίες αποτελεί αντικείμενο ενδιαφέροντος, διότι υπογραμμίζει το πλήθος των τροφίμων και

των οροτύπων της *Salmonella*, τα οποία εμπλέκονται σε ανθρώπινες ασθένειες (Cox et al., 1999).

Μέχρι και τη δεκαετία του 1940, ο *S. typhi* και ο *S. paratyphi* ήταν οι κύριες αιτίες της σαλμονέλωσης σε όλο τον κόσμο. Ωστόσο, με την παστερίωση του γάλακτος και με τη χλωρίωση του πόσιμου νερού, η εξάπλωση του τυφοειδούς και παρατυφοειδούς πυρετού μέσω των τροφίμων και του νερού μειώθηκε πολύ, τουλάχιστον στις ανεπτυγμένες χώρες. Μετά την ανάπτυξη αποτελεσματικών τεχνικών για την απομόνωση και την ταυτοποίηση των υπόλοιπων ορότυπων του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella* spp. από δείγματα τροφίμων και του περιβάλλοντος, έγινε εμφανές ότι η παγκόσμια συχνότητα εμφάνισης της τροφιμογενούς σαλμονέλωσης που προκαλείται από άλλους ορότυπους του παθογόνου *Salmonella* spp. είναι αρκετά υψηλή. Τη δεκαετία του 1950, αναγνωρίστηκε ότι η τροφιμογενής σαλμονέλωση υπήρξε η κύρια αιτία όλων των τροφιμογενών ασθενειών από παθογόνα βακτήρια και ιούς. Σήμερα έχει καθιερωθεί ως μία από τις σημαντικότερες αιτίες τροφιμογενούς ασθένειας παγκοσμίως. Στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής, τα ετήσια ποσοστά σαλμονέλωσης είναι υψηλά με καταγεγραμμένες 20 εκατομμύρια περιπτώσεις από τις οποίες 500 κατέληξαν σε θάνατο (Kunze et al., 2008). Η σαλμονέλωση έχει συσχετιστεί κυρίως με την κατανάλωση πουλερικών. Ωστόσο, αρκετά και διαφορετικά είδη που ανήκουν στο γένος *Salmonella* έχουν ανιχνευτεί σε διάφορα λαχανικά (Wells and Butterfield, 1997). Στην Ευρωπαϊκή Ένωση, η σαλμονέλωση ήταν η δεύτερη πιο συχνή ζωονοσογόνος λοίμωξη το 2009, με 108.614 επιβεβαιωμένα κρούσματα και ένα ποσοστό θνησιμότητας 0,08%, το οποίο αντιστοιχεί περίπου σε 90 θανάτους ανθρώπων (EFSA-ECDC, 2011). Εκτεταμένα κρούσματα σαλμονέλωσης έχουν αποδοθεί σε βλαστούς φασολιών, σέλινου, μαρουλιού, λάχανου και αντιδιών (Beuchat et al., 1996). Η πιο πρόσφατη επιδημία έλαβε χώρα στα τέλη του 2010 όπου 140 κρούσματα καταγράφηκαν σε 26 πολιτείες της Αμερικής τα οποία συσχετίστηκαν με κατανάλωση πικάντικων λαχανικών (Olaimat et al., 2012).

Το γένος *Salmonella* ανιχνεύεται στο εντερικό σύστημα των ζώων και του ανθρώπου (Critzler and Doyle, 2010; Adley et al., 2011; Rostagno and Callaway, 2011), στα κόπρανα, στα ούρα, στα τρόφιμα και στις ζωοτροφές. Μέχρι στιγμής έχουν περιγραφεί πολλοί ορότυποι του γένους *Salmonella*. Το σχέδιο ταξινόμησης ανά ορότυπο των Kauffman-White (Πίνακας 1.2.) έχει αποδειχτεί η πιο χρήσιμη τεχνική για ορισμό διαφοροποιήσεων εντός του γένους. Αυτή η τεχνική περιγράφει

τους μικροοργανισμούς βάσει των σωματικών αντιγόνων τους (O) και των αντιγόνων των μαστιγίων (H) αλλά και βάσει των αντιγόνων των καψιδίων (Vi) που διαθέτουν τα στελέχη *S. typhi*, *S. dublin* και σε μερικές περιπτώσεις τα στελέχη *S. paratyphi*. Σήμερα αυτή η ταξινόμηση διακρίνει παραπάνω από 2500 ορότυπους (Fierer and Guiney, 2001) από τους οποίους οι περισσότεροι ανήκουν στο υποείδος *Salmonella enterica* (Kaufmann et al., 1966). Σύμφωνα με τους (Le Minor και Poroff, 1987), ο όρος *Salmonella* αναφέρεται στο γένος του μικροοργανισμού που περιλαμβάνει δύο είδη: τον *Salmonella enterica* και τον *Salmonella bongori*. Ο *Salmonella enterica* διαιρείται σε 6 υποείδη: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* και *indica*. Μεταξύ των έξι υποειδών, το *Salmonella enterica* subsp. *enterica* περιλαμβάνει τους περισσότερους ορότυπους που συνδέονται συχνά με την τροφιμογενή σαλμονέλωση.

Πίνακας 1.2. Το σχέδιο ταξινόμησης ανά ορότυπο των Kauffman-White. Πηγή: (Monteville and Matthews, 2005; Μπαλατσούρας et al., 2006).

Είδη <i>σαλμονέλων</i> , υποείδη, ορότυποι, και οι συνηθισμένοι βιότοποί τους ,σχέδιο Kaufmann-White		
Είδη και υποείδη <i>σαλμονέλων</i>	Αριθμός ορότυπων στα υποείδη	Συνηθισμένος βιότοπος
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> (I)	1454	Θερμόαιμα ζώα
<i>S. enterica</i> subsp. <i>salamae</i> (II)	489	Ψυχρόαιμα ζώα και το περιβάλλον
<i>S. enterica</i> subsp. <i>arizonae</i> (IIIa)	94	Ψυχρόαιμα ζώα και το περιβάλλον
<i>S. enterica</i> subsp. <i>diarizonae</i> (IIIb)	324	Ψυχρόαιμα ζώα και το περιβάλλον
<i>S. enterica</i> subsp. <i>houtenae</i> (IV)	70	Ψυχρόαιμα ζώα και το περιβάλλον
<i>S. enterica</i> subsp. <i>indica</i> (VI)	12	Ψυχρόαιμα ζώα και το περιβάλλον
<i>S. bongori</i> (V)	20	Ψυχρόαιμα ζώα και το περιβάλλον
Total	2463	

1.5.1. Χαρακτηριστικά του γένους *Salmonella*

Το γένος *Salmonella* είναι προαιρετικά αναερόβιο, Gram αρνητικό ραβδόμορφο βακτήριο και ανήκει στην οικογένεια Enterobacteriaceae της οποίας οικογένειας τα μέλη διαφοροποιούνται με οροτυπικές μεθόδους. Έχουν ταυτοποιηθεί περίπου 2200 ορότυποι όμως λίγοι από αυτούς προκαλούν τροφοδηλητηριάσεις στον άνθρωπο. Παρόλο που τα μέλη του γένους μπορούν να κινούνται με τη βοήθεια περίτριχων μαστιγίων, υπάρχουν και παραλλαγές χωρίς μαστίγια, όπως τα *S. enterica* ορότυποι Pullorum και Gallinarum, καθώς και στελέχη χωρίς ικανότητα κίνησης. Τα βακτήρια του γένους *Salmonella* είναι αρνητικά στην οξειδάση και θετικά στην καταλάση. Το μέγεθος τους κυμαίνεται από 0,7-1,5x2,5μm, αν και μερικές φορές μπορεί να αναπτυχθούν μακρά νήματα. Τα περισσότερα στελέχη ζυμώνουν τη γλυκόζη με την παραγωγή αερίου και οξέος (Cox et al., 1999). Οι κυριότεροι ορότυποι της σαλμονέλλας που προκαλούν τροφικές δηλητηριάσεις είναι: *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Heidelberg*, *S. Derby*, *S. Anatum* και *S. Infantis* (Robinson et al., 1993).

Όσον αφορά τη θερμοκρασία, τα όρια ανάπτυξης κυμαίνονται από 5,1 °C έως 45-47 °C (Simonsen et al, 1987) (τιμή optimum 37 °C). Παρόλα αυτά τα κύτταρα του παθογόνου μπορούν να επιβιώσουν και υπό συνθήκες συντήρησης καθώς και σε συνθήκες κατάψυξης (Cox et al., 2000). Ο μικροοργανισμός είναι θερμοευαίσθητος και καταστρέφεται εύκολα από τις θερμοκρασίες της παστερίωσης (Monteville and Matthews, 2005; Ray et al., 2005). Όσον αφορά τις ανάγκες του σε παρουσία νερού, *Salmonella* αναπτύσσεται σε περιβάλλον με $a_w > 0,93 - 0,95$. Παρόλο που η ελάχιστη a_w που επιτρέπει την αύξηση είναι το 0,93, τα κύτταρα του επιζούν καλά στα ξηρά τρόφιμα με το ποσοστό επιβίωσης να αυξάνεται καθώς η a_w μειώνεται. Επιπλέον, πολλαπλασιάζεται σε εύρος pH από 4,0 – 5,4 έως 9,0 (τιμή optimum 6,5 - 7,5) ενώ σε τιμές μικρότερες του 4,0 επέρχεται αδρανοποίηση και θάνατος των κυττάρων του. Ο μικροοργανισμός χαρακτηρίζεται ως ανθεκτικός σε συγκέντρωση άλατος από 4% έως 8%. Πλήρης παρεμπόδιση της ανάπτυξης του παρατηρείται σε θερμοκρασίες <7 °C, pH <3,8 ή $a_w < 0,94$ (Hannes et al., 2003; Bhunia et al., 2008).

1.5.2. Ταξινόμηση και ονοματολογία

Σύμφωνα με το Κέντρο Συνεργασίας του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (World Health Organization – WHO) για την Αναφορά και την Έρευνα στη *Salmonella*, για τα είδη *S. enterica* και *S. bongori* αυτή τη στιγμή έχουν ταυτοποιηθεί 2.443 και 20 ορότυποι αντίστοιχα. Τα Κέντρα Ελέγχου και Πρόληψης Ασθενειών έχουν υιοθετήσει ως επίσημη ονομασία τους το παρακάτω σχήμα, όπου το γένος *Salmonella* περιλαμβάνει δύο είδη, κάθε ένα από τα οποία περιλαμβάνει διάφορους ορότυπους. **(Πίνακας 1.3)**. Τα δύο είδη είναι το *S. enterica* και το *S. bongori*, με το *S. enterica* να διαιρείται σε έξι υποείδη, τα οποία αναφέρονται με ένα λατινικό νούμερο και ένα όνομα (I: *S. enterica* subsp. *enterica*, II: *S. enterica* subsp. *salamae*, IIIa: *S. enterica* subsp. *arizonae*, IIIb: *S. enterica* subsp. *diarizonae*, IV: *S. enterica* subsp. *houtenae* και VI: *S. enterica* subsp. *indica*). Τα υποείδη του *S. enterica* διαφοροποιούνται βιοχημικά και μέσω χρωμοσωμικής συγγένειας. Στους οροτύπους του γένους *Salmonella* που έχουν συνδεθεί με πρόσφατες περιπτώσεις τροφογενούς ασθένειας συμπεριλαμβάνονται οι Enteritidis, Typhimurium, Newport και Stanley του *S. enterica* (Brenner et al., 2000).

Πίνακας 1.3 Τα είδη, υποείδη και ορότυποι του γένους *Salmonella* (Brenner et al., 2000).

Είδη και υποείδη <i>Salmonella</i>	Αριθμός οροτύπων
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> (I)	1.454
<i>S. enterica</i> subsp. <i>salamae</i> (II)	489
<i>S. enterica</i> subsp. <i>arizonae</i> (IIIa)	94
<i>S. enterica</i> subsp. <i>diarizonae</i> (IIIb)	324
<i>S. enterica</i> subsp. <i>houtenae</i> (IV)	70
<i>S. enterica</i> subsp. <i>indica</i> (VI)	12
<i>S. bongori</i> (V)	20
Σύνολο	2.463

1.6. Σαλμονέλλωση

Προκαλείται από ένα Gram αρνητικό βακτήριο της οικογένειας των εντεροβακτηριοειδών. Το είδος το οποίο προκαλεί νόσο στον άνθρωπο είναι το *Salmonella enterica*, που έχει 6 υποείδη (*enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae*, *indica*). Το υποείδος *enterica* υποδιαιρείται σε περισσότερους από 2500 γνωστούς ορότυπους με βάση τα δύο αντιγόνα επιφανείας, το αντιγόνο του κυτταρικού τοιχώματος (O) και το βλεφαριδικό αντιγόνο (H). Στην Ελλάδα, οι συχνότερα δηλούμενες σαλμονέλλες είναι η *Salmonella enterica enterica* ser. Enteritidis 1,9,12:g,m:- και η *Salmonella enterica enterica* ser. Typhimurium 1,4,[5],12:i:1,2. Η νόσος εκδηλώνεται ως οξεία γαστρεντερίτιδα με μη αιματηρή διάρροια (στην πλειονότητα των περιπτώσεων) η οποία διαρκεί συνήθως 3-7 ημέρες και συνοδεύεται από πυρετό (σχεδόν στο 100% των περιπτώσεων), κοιλιακό άλγος, μυαλγία, πονοκέφαλο, ναυτία (που μπορεί να προηγείται της διάρροιας) και έμετο. Συνήθως τα συμπτώματα της σαλμονέλλωσης έχουν αιφνίδια έναρξη. Η αφυδάτωση αποτελεί επιπλοκή της νόσου, κυρίως στα μικρά παιδιά και τους ηλικιωμένους (ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ, 2017).

Μολύνσεις του ανθρώπου από *Salmonella* μπορούν να οδηγήσουν σε διάφορες κλινικές καταστάσεις όπως ο τυφοειδής πυρετός, η απλή εντεροκολίτιδα και οι συστηματικές μολύνσεις από μη τυφοειδείς μικροοργανισμούς. Ο εντερικός πυρετός είναι μια σοβαρή ανθρώπινη ασθένεια που συνδέεται με τυφοειδή και παρατυφοειδή στελέχη. Τα συμπτώματα του εντερικού πυρετού εμφανίζονται έπειτα από μια περίοδο επώασης που κυμαίνεται από 7 έως 28 ημέρες και μπορεί να συμπεριλαμβάνουν διάρροια, παρατεταμένο και οξύ πυρετό, κοιλιακό πόνο, πονοκέφαλο και πλήρη σωματική εξάντληση. Η διάγνωση της ασθένειας εξαρτάται από την απομόνωση του μολυσματικού παράγοντα από δείγματα αίματος και ούρων κατά τα πρώτα στάδια της ασθένειας ή από κόπρανα μετά από την εκδήλωση των κλινικών συμπτωμάτων. Μια χωρίς συμπτώματα κατάσταση χρόνιου φορέα συνήθως ακολουθεί την έντονη φάση του εντερικού πυρετού (Pui et al., 2011).

Οι ανθρώπινες μολύνσεις από μη τυφοειδή στελέχη *Salmonella* συχνά οδηγούν σε εμφάνιση συμπτωμάτων 8 έως 72 ώρες έπειτα από την είσοδο του παθογόνου στον οργανισμό. Η ασθένεια συνήθως είναι αυτοπεριοριζόμενη και τα χαρακτηριστικά συμπτώματα της αναίμακτης διάρροιας και του κοιλιακού πόνου υποχωρούν μέσα σε

5 μέρες από την αρχική εκδήλωση των συμπτωμάτων. Η επιτυχής θεραπεία των απλών αυτών περιστατικών μπορεί να απαιτεί μόνο υποστηρικτική θεραπεία όπως η αντικατάσταση των ηλεκτρολυτών που έχουν χαθεί. Σε τέτοιες περιπτώσεις δεν ακολουθείται αγωγή με αντιβιοτικά. Η τυχόν ασυμπτωματική παραμονή του βακτηρίου *Salmonella* στο έντερο οφείλεται πιθανώς στην καταστολή της εντερικής μικροχλωρίδας λόγω χρήσης των αντιβιοτικών. Οι ανθρώπινες μολύνσεις από μη τυφοειδή στελέχη μπορούν ωστόσο να επιδεινωθούν και να μετατραπούν σε συστηματικές μολύνσεις προκαλώντας χρόνια συμπτώματα (Cox, 1999).

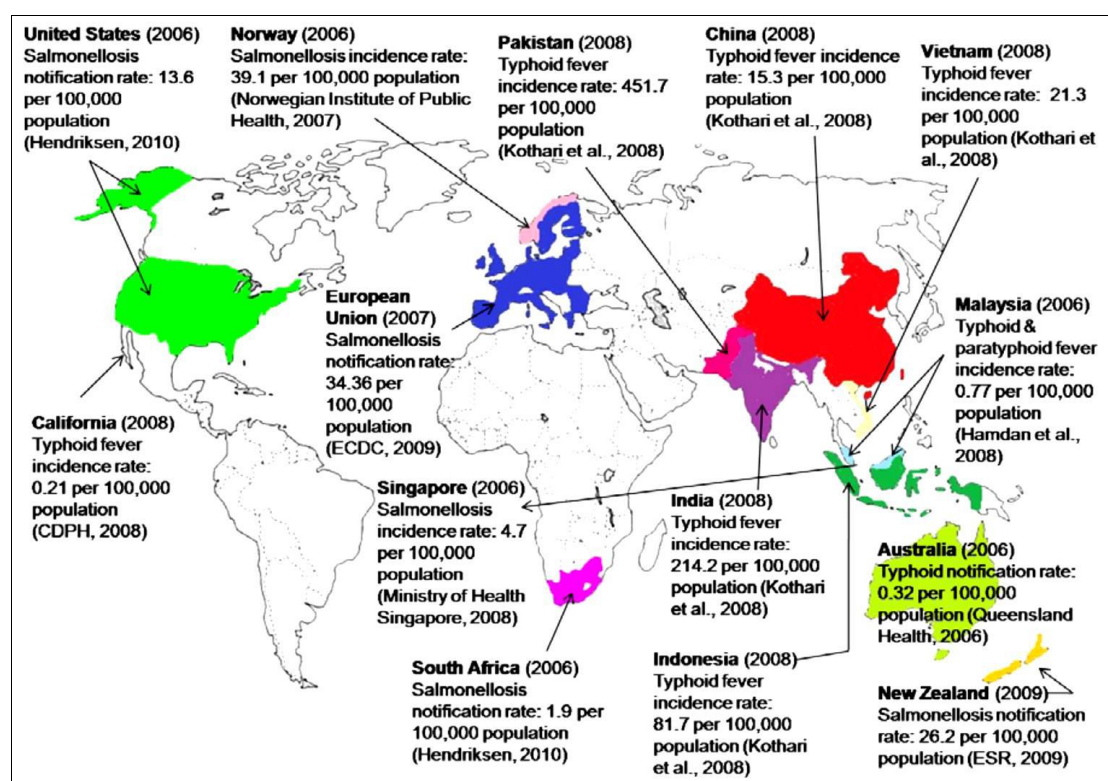
Το βακτήριο *Salmonella* μπορεί να προκαλέσει χρόνιες καταστάσεις, όπως η ασηπτική αρθρίτιδα, το σύνδρομο Reiter και η αγκυλωτική σπονδυλίτιδα. Η εκδήλωση τέτοιων χρόνιων ασθενειών προϋποθέτει ικανότητα του βακτηριακού στελέχους να μολύνει βλεννώδεις επιφάνειες (βλεννογόνους), παρουσία των λιποπολυσακχαριτών (LPS) της εξωτερικής μεμβράνης και ικανότητα να εισβάλλει σε κύτταρα ξενιστές (Pui et al., 2011).

1.6.1. Επιδημιολογικά στοιχεία της σαλμονέλλωσης

Στην Ευρωπαϊκή Ένωση οι ορότυποι *Salmonella* Enteritidis και *S. Typhimurium* αναφέρονται ως οι δύο κύριοι αιτιολογικοί παράγοντες της σαλμονέλλωσης στον άνθρωπο σύμφωνα με το Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων. Το ίδιο συμβαίνει και στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής, ενώ στην Αυστραλία η κατανομή των οροτύπων του παθογόνου *Salmonella* ποικίλλει γεωγραφικά. Έτσι, ενώ το *S. Typhimurium* ήταν ο πιο συχνός ορότυπος το 2008, το *S. Enteritidis* είχε συχνά αναφερθεί ως αιτία μολύνσεων του ανθρώπου παρόλο που δεν είναι ενδημικό στην Αυστραλία. Το *S. Enteritidis* είναι κυρίως εμπλεκόμενο με την κατανάλωση αυγών και πουλερικών ενώ το *S. Typhimurium* συνδέεται με ζώα που παράγουν προϊόντα όπως τα πουλερικά, οι χοίροι και τα πρόβατα. Η παγκόσμια διανομή των τροφίμων και η συνεχής μετακίνηση των ανθρώπων σε όλο τον κόσμο διευκολύνουν την εξάπλωση αυτού του παράγοντα που επιτρέπει την εμφάνιση νέων οροτύπων σαλμονέλας στις χώρες που εισάγονται.

Οι τυφοειδείς περιπτώσεις είναι σταθερά σε χαμηλούς αριθμούς στις ανεπτυγμένες χώρες αλλά η μη-τυφοειδής σαλμονέλλωση έχει αυξηθεί σε όλο τον κόσμο. Ο τυφοειδής πυρετός προκαλεί συνήθως θνησιμότητα από 5 έως 30% των

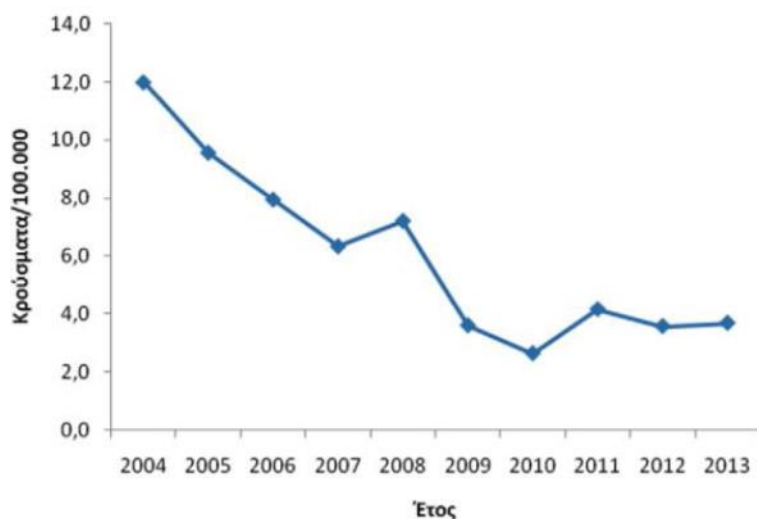
μολυσμένων ατόμων στον αναπτυσσόμενο κόσμο. Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας εκτιμά ότι 16 με 17 εκατομμύρια περιπτώσεις εμφανίζονται ετησίως με αποτέλεσμα περίπου 600.000 θανάτους. Από την άλλη πλευρά οι μη-τυφοειδείς περιπτώσεις ανέρχονται σε 1,3 δισεκατομμύρια κρούσματα με 3 εκατομμύρια θανάτους. Στις Η.Π.Α προκύπτουν περίπου 2 έως 4 εκατομμύρια κρούσματα γαστρεντερίτιδας από *Salmonella* με περίπου 500 θανάτους ανά έτος. Στοιχεία για χώρες της Ασίας, της Αφρικής και της Νότιας και Κεντρικής Αμερικής είναι σπάνια γιατί αναφέρονται μόνο το 1 έως 10% των περιπτώσεων (Hannes., 2003; Hu et al., 2003). Σύμφωνα με τα τελευταία δημοσιευμένα δεδομένα, στις χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης το 2009 ήταν 23,6 κρούσματα ανά 100.000 κατοίκους.



Εικόνα 1.1 Περιπτώσεις σαλμονέλωσης και εντερικού πυρετού σε διαφορετικές περιοχές του κόσμου (Pui et al., 2011).

Η μέση ετήσια δηλούμενη επίπτωση του νοσήματος στην Ελλάδα, με βάση το σύστημα υποχρεωτικής δήλωσης νοσημάτων, ήταν για τα έτη 2000-2010, 6,6 κρούσματα ανά 100.000 πληθυσμού. Επισημαίνεται ότι η ερμηνεία των αναφερόμενων επιπτώσεων θα πρέπει να γίνεται με προσοχή, αφού εξαρτάται από το

βαθμό υποδήλωσης του νοσήματος σε κάθε χώρα. Το νόσημα στη χώρα μας παρουσιάζει υψηλότερη δηλούμενη συχνότητα στα παιδιά και ιδιαίτερα στην ηλικιακή ομάδα 0-4 έτη και σαφή εποχική κατανομή, με αύξηση τους καλοκαιρινούς μήνες (ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ).



Γράφημα 1: Διαχρονική εξέλιξη της δηλούμενης επίπτωσης της μη τυφο-παρατυφικής σαλμονέλλωσης στην Ελλάδα, (ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ., 2015).

Πίνακας 1.4. Αριθμός δηλωθέντων κρουσμάτων μη τυφο-παρατυφικής σαλμονέλλωσης, Σύστημα Υποχρεωτικής Δήλωσης Νοσημάτων, Ελλάδα, 2004-2015 (ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ).

Έτος	Αριθμός Κρουσμάτων
2004	1327
2005	1062
2006	886
2007	709
2008	810
2009	406
2010	299
2011	471
2012	405
2013	417
2014	349
2015	468

1.6.2. Παθογένεια του μικροοργανισμού *Salmonella* spp.

Ο μικροοργανισμός *Salmonella* spp. είναι υπεύθυνος για έναν αριθμό διαφορετικών κλινικών συμπτωμάτων:

Εντερίτιδα. Οι γαστρεντερικές μολύνσεις είναι κυρίως συνδεδεμένες με εκείνους τους ορότυπους που εμφανίζονται ευρέως στα ζώα και τους ανθρώπους. Μπορούν να κυμανθούν από πλευράς δριμύτητας από ασυμπτωματική μεταφορά μέχρι διάρροια που είναι και ο πιο κοινός τύπος σαλμονέλωσης. Η περίοδος επώασης για εντερίτιδα είναι μεταξύ 6 και 48 ωρών. Τα κύρια συμπτώματα της ασθένειας είναι ήπιος πυρετός, ναυτία, εμετός, κοιλιακοί πόνοι και διάρροια. Διαρκούν συνήθως για 2-3 ημέρες αλλά σε μερικές περιπτώσεις, μπορούν να εμείνουν για μια εβδομάδα ή περισσότερο. Η ασθένεια συνήθως περιορίζεται από μόνη της με την πάροδο του χρόνου αλλά μπορεί να καταστεί πιο σοβαρή στις ιδιαίτερα ευαίσθητες ομάδες πληθυσμού, όπως στους πολύ νέους, στους πολύ ηλικιωμένους, στις εγκύους και στους ήδη ασθενείς (D' Aoust et al., 1998; Andrews and Baumler, 2005). Ο μικροοργανισμός εισέρχεται στον ανθρώπινο οργανισμό μέσω της κατάποσης και αφού κατορθώσει να επιζήσει στο όξινο περιβάλλον του στομάχου ξεπερνώντας τον ανταγωνισμό με τη φυσική χλωρίδα (Grassl, 2008), προσκολλάται στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου. Στη συνέχεια εισάγεται εντός των κυττάρων με μια διαδικασία γνωστή ως ενδοκύτωση μέσω δέκτη (receptor mediated endocytosis). Η ικανότητα του *Salmonella* spp.spp. να εισάγεται σε μη φαγοκυτταρικά κύτταρα προσδίδει ουσιαστική δυναμικότητα στην παθογένειά του. Η διαδικασία αυτή οφείλεται κυρίως στην κωδικοποίηση μιας περιοχής 35-40 kb του χρωμοσώματος, που περιγράφεται ως περιοχή παθογένειας. Αυτή η περιοχή του DNA κωδικοποιεί ένα σύνθετο σύστημα έκκρισης πρωτεϊνών, γνωστό ως σύστημα έκκρισης τύπου III, που απαιτείται για την αποστολή σημάτων που αποσυντονίζουν τα κύτταρα του ξενιστή και τελικά οδηγούν στην είσοδο των βακτηριακών κυττάρων. Το παθογόνο βακτήριο που έχει εισαχθεί με ενδοκύτωση περνά μέσα στα επιθηλιακά κύτταρα διαμέσου ενός συνδεδεμένου στη μεμβράνη χυμοτοπίου, όπου πολλαπλασιάζεται και απελευθερώνεται έπειτα στο μεμβρανώδες βλεννογόνο. Αυτό προκαλεί μια ροή φλεγμονωδών κυττάρων που οδηγούν στην απελευθέρωση προσταγλαδινών που ενεργοποιούν την αδενυλική κυκλάση η οποία προκαλεί έκκριση ρευστών στον εντερικό αυλό, με αποτέλεσμα το σύμπτωμα της διάρροιας.

Συστηματική νόσος. Οι ορότυποι *Salmonella* spp. που προσαρμόζονται ανάλογα με τον ξενιστή είναι πιο επιθετικοί και τείνουν να προκαλέσουν συστηματικές νόσους στους ξενιστές τους, ένα χαρακτηριστικό γνώρισμα τους που συνδέεται με την ανθεκτικότητά τους στην καταπολέμηση από τα φαγοκύτταρα. Στους ανθρώπους, αυτό ισχύει για τους τυφοειδείς και παρατυφοειδείς βακίλους *S. typhi* και *S. paratyphi* A, B, και C, οι οποίοι προκαλούν σηψαιμικές ασθένειες και εντερικό πυρετό. Ο τυφοειδής πυρετός έχει μια περίοδο επώασης από 3 έως 56 ημέρες, αν και συνήθως κυμαίνεται μεταξύ 10 και 20 ημερών. Ο επιτιθέμενος μικροοργανισμός *Salmonella* spp. διαπερνά το εντερικό επιθήλιο και έπειτα μεταφέρεται από τα λεμφικά κύτταρα στους μεσεντερικούς λεμφαδένες. Μετά από τον πολλαπλασιασμό του στα μακροφάγα, απελευθερώνεται στη ροή του αίματος και διαδίδεται σε ολόκληρο το σώμα. Παρόλο ότι αφαιρείται από το αίμα και πάλι με χρήση των μακροφάγων συνεχίζει να πολλαπλασιάζεται μέσα σε αυτά κάτι το οποίο έχει ως συνέπεια καταστροφή τελικά των μακροφάγων, τα οποία απελευθερώνουν με τη σειρά τους μεγάλους αριθμούς βακτηρίων στη ροή του αίματος προκαλώντας σηψαιμία. Κατά τη διάρκεια του δεύτερου σταδίου της ασθένειας, ο μικροοργανισμός φθάνει στη χοληδόχο κύστη όπου πολλαπλασιάζεται στη χολή. Η ροή μολυσμένης χολής επιμολύνει το λεπτό έντερο οπότε και προκαλείται φλεγμονή και έλκος. Ο πυρετός εμμένει με παράλληλη διάρροια κατά την οποία αποβάλλονται μεγάλες ποσότητες βακτηρίων. Σε σοβαρότερες περιπτώσεις, μπορεί να εμφανιστεί αιμορραγία των ελκών και διάτρηση του εντέρου που οδηγεί σε περιτονίτιδα. Σε ηπιότερες περιπτώσεις, τα έλκη θεραπεύονται και ο πυρετός πέφτει σταδιακά μετά από 4-5 εβδομάδες ανάρρωσης. Η μοριακή και γενετική βάση για την προσκόλληση και εισβολή του βακτηρίου *Salmonella* spp. εντός των κυττάρων των ξενιστών και η εν γένει παθογένειά της είναι και σύνθετη και ξεχωριστή. Τουλάχιστον 60 γονίδια είναι υπεύθυνα για τη λοιμωξιγόνο δράση του παθογόνου αυτού μικροοργανισμού (Groisman and Ochman, 1997). Αρκετά από αυτά τα γονίδια εδρεύουν ως οπερόνιο σε ένα μεγάλο πλασμίδιο κοινό για τους περισσότερους οροτύπους *Salmonella* spp. ενώ ακόμη ένας μεγάλος αριθμός βρίσκεται σε διάφορες περιοχές του χρωμοσώματος μέσα σε ζώνες παθογένειας. Η ζώνη παθογένειας της οποίας η δράση έχει αναλυθεί περισσότερο είναι η SPI-1, μια περιοχή 40 kb που διαθέτει πάνω από 30 γονίδια και κωδικοποιεί δύο ρυθμιστικές πρωτεΐνες που επιτελούν διαφορετικούς ρόλους, την InvF και HilA. Επίσης κωδικοποιεί και τα στοιχεία του συστήματος έκκρισης τύπου III, που καλούνται Inv/SPA και είναι απαραίτητα για την προσβολή και τη

λοιμωξιογόνο δράση της στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου. Μια δεύτερη ζώνη παθογένειας 40 kb, η SPI-2, έχει εντοπιστεί σε χρωμόσωμα στον ορότυπο *S. enterica* serovar Typhimurium (Ochman et al., 1996; Shea et al., 1996). Η ζώνη SPI-2 που ευθύνεται για την πρόκληση συστηματικών νοσημάτων, περιέχει τουλάχιστον 17 γονίδια που κωδικοποιούν ένα ρυθμιστικό σύστημα δύο στοιχείων και ένα σύστημα έκκρισης τύπου III που καλείται σύστημα Spi/SsA. Αυτά τα συστήματα ξεχωρίζουν από πλευράς δομής και λειτουργίας από το σύστημα SPI-1 Inv/Spa και το σύστημα έκκρισης τύπου III που είναι υπεύθυνο για τη δημιουργία και τη λειτουργία των μαστιγίων σε άλλα βακτηριακά γένη. Μια ακόμα περιοχή 7.8 kb η οποία εντοπίζεται στο μεγάλο πλασμίδιο λοιμωξιογόνου δράσης του βακτηρίου *Salmonella spp* και κωδικοποιεί πέντε γονίδια *spvRABCD* είναι επίσης υπεύθυνη για τη λοιμωξιογόνο δράση του παθογόνου.

1.7. Πηγές επιμόλυνσης τροφίμων φυτικής προέλευσης

Η μικροχλωρίδα των φρέσκων φρούτων και λαχανικών συνήθως δεν αποτελείται από παθογόνους για τον άνθρωπο μικροοργανισμούς και είναι πιθανόν να βρίσκεται ακόμα στο προϊόν την στιγμή της κατανάλωσης. Ωστόσο, κατά την ανάπτυξη, τη συγκομιδή, τη μεταφορά και την περαιτέρω επεξεργασία, τα νωπά λαχανικά μπορεί να επιμολυνθούν από ανθρώπινης, περιβαλλοντικής ή ζωικής προέλευσης παράγοντες. Για παράδειγμα, κατά τη διάρκεια του τεμαχισμού του φυτικού ιστού η επιφάνεια του προϊόντος εκτίθεται στον αέρα και ενδέχεται να επιμολυνθεί από βακτήρια, ζύμες ή/και μύκητες. Αυτό μπορεί να συμβεί γιατί το επιδερμικό προστατευτικό εμπόδιο διαρρηγνύεται, αυξάνεται η διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών και δημιουργούνται μεγάλες επιφανειακές περιοχές που διευκολύνουν τη μικροβιακή ανάπτυξη και συνεπώς μειώνουν τη διάρκεια ζωής του προϊόντος. Επιπλέον, η μηχανική καταπόνηση που υφίστανται τα φυτικά κύτταρα κατά την επεξεργασία αυξάνει το ρυθμό γήρανσης των ιστών μειώνοντας την αντοχή τους στη μικροβιακή αλλοίωση (Ramos *et al.*, 2013).

Ανησυχία αποτελεί και ο ενδεχόμενος σχηματισμός βιοϋμενίων στους φυτικούς ιστούς από τροφιμογενή παθογόνα βακτήρια που επιτρέπει την επιβίωση αυτών σε δυσμενή περιβάλλοντα και μειώνει την αποτελεσματικότητα των χρησιμοποιούμενων απολυμαντικών. Συνεπώς, τα προϊόντα αυτά μπορεί να αποτελέσουν μέσο

διαβίβασης βακτηριακών, παρασιτικών και ιογενών παθογόνων τα οποία είναι ικανά να βλάψουν τη δημόσια υγεία (Ramos *et al.*, 2013).

Πολυάριθμες μελέτες έχουν διερευνήσει τις πιθανές πηγές επιμόλυνσης των νωπών λαχανικών στην τροφική αλυσίδα και συγκεκριμένα για τα στάδια πριν αλλά και μετά τη συγκομιδή. Πριν τη συγκομιδή παθογόνοι μικροοργανισμοί μπορούν να ανιχνευτούν στο περιβάλλον που καλλιεργούνται τα φυτά. Οι πηγές επιμόλυνσης πριν από τη συγκομιδή περιλαμβάνουν το έδαφος, τα περιττώματα των ζώων, το νερό άρδευσης, τα ανασυσταθέντα μυκητοκτόνα και εντομοκτόνα, τη σκόνη, τα έντομα, την ανεπαρκώς κομποστοποιημένη κοπριά, τα άγρια ή κατοικίδια ζώα και τον ανθρώπινο χειρισμό. Ο κίνδυνος αυτός μπορεί να ενισχυθεί μετά τη συγκομιδή είτε με περαιτέρω άμεση μόλυνση είτε από τον πολλαπλασιασμό των υφιστάμενων παθογόνων πληθυσμών κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας και του χειρισμού μετά τη συγκομιδή (Berger *et al.*, 2010). Ο ανθρώπινος χειρισμός μπορεί να συμβάλει στη επιμόλυνση και μετά τη συγκομιδή, μαζί με τον εξοπλισμό συγκομιδής, τα μέσα μεταφοράς, τα έντομα, τη σκόνη, το νερό ξεπλύματος, τον πάγο, τα οχήματα και τον εξοπλισμό επεξεργασίας (Beuchat *et al.*, 2002).

Το νερό θεωρείται ότι είναι πιθανό να αποτελέσει μια σημαντική πηγή επιμόλυνσης, εφόσον έχει επιμολυνθεί από διάφορους παράγοντες. Πιθανές πηγές του νερού είναι οι απορροές από τα κοντινά λιβάδια των ζώων και η άρδευση από μια μολυσμένη πηγή. Ο κίνδυνος που σχετίζεται με τη χρήση νερού από διάφορες πηγές που ποικίλουν σε μικροβιολογική ποιότητα για την άρδευση των προϊόντων έχει αξιολογηθεί και έχει αναγνωριστεί η ανάγκη για βελτίωση των κατευθυντήριων γραμμών. Ενώ σε μελέτες δεν βρέθηκε είσοδος του *E. coli* O157:H7 σε φυτικό ιστό σπανακιού που καλλιεργούταν σε μολυσμένο χώμα, βρέθηκε πρόσληψη και εσωτερικήυση του ίδιου του παθογόνου σε σπανάκι μετά από διαβροχή των φύλλων με μολυσμένο νερό. Αυτό υποδηλώνει μια μικρότερη πιθανότητα μετάδοσης παθογόνων μικροοργανισμών από το μολυσμένο νερό όταν πραγματοποιείται στάγδην άρδευση παρά όταν χρησιμοποιούνται εναέρια συστήματα καταιονισμού. Ωστόσο, η άρδευση δεν είναι η μόνη αναφερόμενη οδός μόλυνσης που συνδέεται με το νερό. Η χρήση του νερού στην επεξεργασία μετά τη συγκομιδή έχει παίξει επίσης σημαντικό ρόλο (Berger *et al.*, 2010).

Το έδαφος θεωρείται το φυσικό περιβάλλον μιας ποικιλίας ανθρώπινων παθογόνων μικροοργανισμών συμπεριλαμβανομένων των *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum* και *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes* και

Aeromonas sp. Στα είδη αυτά μπορούν να συμπεριληφθούν και άλλοι παθογόνοι μικροοργανισμοί εάν λάβουμε υπόψη τα περιττώματα των ζώων στο έδαφος. Έχει αναφερθεί ότι οι μικροοργανισμοί *E. coli* O157: H7 και *Salmonella* spp. μπορούν να επιβιώσουν στο έδαφος από 7 έως 25 εβδομάδες ανάλογα με τον τύπο του εδάφους, το επίπεδο της υγρασίας και της θερμοκρασίας καθώς και την πηγή μόλυνσης. Έχει αποδειχτεί από μια πληθώρα εργασιών ότι αυτά τα ζωνοσογόνα παθογόνα επιβιώνουν περισσότερο σε υγρά και αργιλώδη εδάφη και σε χαμηλότερες θερμοκρασίες με την παρουσία κοπριάς. Οι συνθήκες που επικρατούν στον τόπο καλλιέργειας αποτελούν σημαντικό παράγοντα που επηρεάζει τη μικροβιακή ασφάλεια των νωπών λαχανικών. Τα αγροτεμάχια που περιέχουν κοπριά είναι πιο πιθανό να έχουν επιμολυνθεί με εντερικά παθογόνα λόγω της ικανότητάς τους να επιβιώσουν στο έδαφος για μήνες ή ακόμα και για χρόνια. Η κοπριά των μηρυκαστικών (βοοειδή και πρόβατα) και τα λύματα θεωρούνται ως οι κύριες πηγές επιμόλυνσης από *Salmonella* και *E. coli* O157: H7. Επίσης, ο μικροοργανισμός *Campylobacter jejuni* είναι ένα φυσιολογικό μέλος της γαστρεντερικής μικροχλωρίδας των πουλερικών, των χοίρων και των βοοειδών. Τα λαχανικά, ιδιαίτερα οι ρίζες αυτών, επιμολύνονται συχνά από το μικροοργανισμό *Listeria monocytogenes* εφόσον είναι πολύ διαδεδομένος στη φύση (Olaimat et al., 2012).

Κατά τη συγκομιδή τα λαχανικά μπορεί να μολυνθούν με παθογόνα εάν χρησιμοποιηθεί γεωργικός εξοπλισμός που δεν έχει απολυμανθεί επαρκώς ή σε περίπτωση που από τους αγρότες δεν τηρούνται οι ορθές γεωργικές πρακτικές (Good Agricultural Practices) (Matthews, 2006).

Πιθανή πηγή επιμόλυνσης αποτελεί επίσης η επεξεργασία μετά τη συγκομιδή η οποία αναφέρεται από την αποθήκευση μέχρι και τον τεμαχισμό των λαχανικών. Στην επιφάνεια που έχει κοπεί το λαχανικό μπορούν εύκολα να αναπτυχθούν διάφορα παθογόνα βακτήρια, όπως είναι το παθογόνο *Salmonella*, εφόσον θρεπτικά συστατικά μπορεί να έχουν εξέλθει από σημεία τραυματισμού του φυτικού ιστού στο στάδιο αυτό. Σε ένα επόμενο στάδιο, τα περισσότερα λαχανικά πλένονται τουλάχιστον μία φορά, όπου το νερό μπορεί να αποτελέσει ακόμη μια φορά πηγή επιμόλυνσης. Στις περισσότερες βέβαια βιομηχανίες το νερό που χρησιμοποιείται για το πλύσιμο των λαχανικών περιέχει απολυμαντικό. Η προσθήκη αυτή του απολυμαντικού πραγματοποιείται για τον έλεγχο του μικροβιακού φορτίου του προϊόντος αλλά και του νερού που χρησιμοποιείται. Μερικές φορές όμως, μπορεί να γίνει χρήση πάγου

κατά την επεξεργασία των λαχανικών, που μπορεί να αποτελέσει μια επιπλέον πηγή επιμόλυνσης.

Σημαντικότερη πηγή επιμόλυνσης κατά την επεξεργασία των λαχανικών μπορεί να αποτελέσει ο εξοπλισμός που έρχεται σε άμεση επαφή με το προϊόν, ο οποίος πρέπει να απολυμαίνεται τακτικά. Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δίνεται από τους παραγωγούς στα προϊόντα τα οποία καταναλώνονται νωπά, όπως είναι οι προσσκευασμένες σαλάτες. Οι καταναλωτές προσδοκούν αυτά τα προϊόντα να μην απαιτούν περαιτέρω πλύσιμο πριν καταναλωθούν. Αυτή η προσδοκία αποτελεί πρόκληση για τον παρασκευαστή ώστε να διασφαλίσει την εξυγίανση αυτών των προϊόντων, ειδικά εάν ληφθεί υπόψη και ο όγκος που διατίθεται καθημερινώς. Για την επίτευξη της ασφάλειας των νωπών λαχανικών στο βιομηχανικό τομέα απαιτείται η εφαρμογή Ορθών Βιομηχανικών Πρακτικών, ενός προγράμματος εξυγίανσης και η ανάπτυξη και τήρηση ενός Συστήματος HACCP (Matthews, 2006). Επιπρόσθετα, αναγκαία κρίνεται η εύρεση νέων τεχνολογικών μεθόδων που αυξάνουν την ασφάλεια και τη διάρκεια ζωής των νωπών λαχανικών.

Τέλος, επιμόλυνση μπορεί να πραγματοποιηθεί κατά την προετοιμασία των νωπών λαχανικών είτε στο σπίτι είτε σε κάποιο εστιατόριο. Δεδομένου ότι τα περισσότερα λαχανικά καταναλώνονται δίχως καμία θερμική επεξεργασία, η ελλιπής προσωπική υγιεινή του καταναλωτή ή των εργαζομένων μπορεί να οδηγήσει στη διάδοση ιών ή παθογόνων βακτηρίων στο προϊόν. Κάθε χρόνο χιλιάδες είναι οι περιπτώσεις τροφιμογενών λοιμώξεων που δεν καταγράφονται και που σχετίζονται με την κατανάλωση νωπών λαχανικών. Πολλά από αυτά τα κρούσματα είναι αποτέλεσμα ακατάλληλης προετοιμασίας του φαγητού στο σπίτι. Για παράδειγμα, είναι πιθανό να συμβεί διασταυρούμενη επιμόλυνση από τους μικροοργανισμούς *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *Campylobacter* sp. και *Vibrio* sp., τα οποία σχετίζονται με νωπό κρέας, πουλερικά και θαλασσινά, κατά την προετοιμασία κάποιας σαλάτας ή ενός σάντουιτς. Ο εξοπλισμός που χρησιμοποιείται για την κοπή του νωπού κρέατος ή των θαλασσινών πρέπει να πλένεται πολύ καλά πριν χρησιμοποιηθεί για τον τεμαχισμό κάποιου λαχανικού. Για την εξάλειψη αυτών των περιστατικών θα πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή κατά την προετοιμασία του προϊόντος ώστε να μειωθούν οι μικροβιολογικοί κίνδυνοι (Matthews, 2006).

1.8. Νομοθεσία και ευρωπαϊκός κανονισμός

Με βάση τον ΚΑΝΟΝΙΣΜΟ (ΕΚ) αριθ. 2073/2005 ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ της 15ης Νοεμβρίου 2005 περί μικροβιολογικών κριτηρίων για τα τρόφιμα, πρέπει να υπάρχει απουσία *Salmonella* spp. σε 25g κομμένων φρούτων και λαχανικών τα οποία ανήκουν στην κατηγορία των έτοιμων προς κατανάλωση τροφίμων με μέθοδο αναφοράς EN/ISO 6579. Το στάδιο στο οποίο εφαρμόζεται το κριτήριο είναι από τη διάθεση στην αγορά και κατά τη διάρκεια διατήρησης των τροφίμων.

1.9. Προσκόλληση, εσωτερικοποίηση και επιβίωση του *Salmonella* spp. εντός του λαχανικού

Η **προσκόλληση** είναι το πρώτο ουσιαστικό βήμα για την επιφανειακή μόλυνση (Selgas et al., 1993), εντούτοις δεν είναι ένα απλό φαινόμενο λόγω της πολυπλοκότητας των αλληλεπιδρώντων επιφανειών (δύο υποστρώματα και μικροβιακά κύτταρα), και της επιρροής από διάφορους παράγοντες (Goulter et al., 2009., Selgas et al., 1993). Οι ιδιότητες προσκόλλησης για κάθε μικροοργανισμό διαφέρουν. Αυτό συμβαίνει λόγω των τύπων επιφάνειας, των ειδών και των πειραματικών μεθόδων που χρησιμοποιούνται για να μελετηθεί η διαδικασία (An and Friedman, 1997).

Η προσκόλληση των βακτηριακών κυττάρων σε επιφάνειες τροφίμων μπορεί να θέσει σε κίνδυνο την ασφάλεια και την ποιότητα των προϊόντων. Κύτταρα μπορεί να προσκολλώνται στις επιφάνειες λόγω επαφής με τρόφιμα ή εξοπλισμό επεξεργασίας, πιθανώς οδηγώντας σε περαιτέρω μόλυνση άλλων προϊόντων διατροφής. Προσκολλημένα βακτηριακά κύτταρα μπορεί να είναι δύσκολο να αφαιρεθούν, παρεμβαίνοντας έτσι με μεθόδους απολύμανσης (Benedict et al., 1991., Fratamico et al., 1996., Tamblyn και Conner, 1997). Έτσι, κατάλληλη και διεξοδική παρέμβαση είναι απαραίτητη για την αναστολή, αφαίρεση ή και θανάτωση προσκολλημένων βακτηριακών κυττάρων αποτελεσματικά, αλλά χωρίς να επηρεάζει σημαντικά την ποιότητα των τροφίμων. Η προσκόλληση περιγράφεται γενικά ως μια διαδικασία δύο σταδίων. Αρχική αναστρέψιμη προσκόλληση και επακόλουθη μη αναστρέψιμη προσκόλληση. Η ιδέα αυτή έχει γίνει αποδεκτή από την πλειοψηφία των ερευνητών (An and Friedman, 1998; Frank, 2001; Garrett et al., 2008; Ofek et al., 2003; Selgas et al., 1993; Shoaf-Sweeney and Hutkins, 2009). Οι

όροι «αναστρέψιμη» και «μη αναστρέψιμη», αντιστοιχούν επίσης με τους όρους «χαλαρά» και «έντονα» προσκολλημένα βακτηρία (Firstenberg-Eden et al., 1978).

Εσωτερικοποίηση είναι η εισοδος των εντερικών παθογόνων σε χώρους κάτω από την επιφάνεια των πράσινων φυτικών ιστών φύλλου. Έτσι παρεμποδίζεται η απομάκρυνσή τους κατά την πλύση και η ικανότητα των απολυμαντικών να αδρανοποιήσουν το μικρόβιο. Τα βακτήρια μπορούν να αποκτήσουν πρόσβαση στο εσωτερικό του φύλλου μέσω των στομάτων, των αμυχών ή κοψιμάτων, καθώς και μέσω του ριζικού συστήματος (Bernstein et al., 2007). Εσωτερικοποίηση δεν μπορεί να συμβεί σε όλες τις καλλιέργειες.(Golberg et al., 2011). Η υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης της εσωτερικοποίησης συνέβη στο μαρούλι και στη ρόκα και η χαμηλότερη συχνότητα σε μαϊντανό (Solomon et al., 2002). Η εισχώρηση αυτή των εντερικών παθογόνων *Salmonella* spp. και *E. coli* O157: H7 έχει μελετηθεί τόσο φρούτα όσο και φυλλώδη λαχανικά. Παρόλο που οι μικροοργανισμοί *Salmonella* spp. και *E. coli* O157:H7 έχουν βρεθεί να εισέρχονται σε πολλά διαφορετικά φυτά, έχουν αναφερθεί διαφορές στη βιβλιογραφία ακόμα και όταν έχει χρησιμοποιηθεί το ίδιο φυτό, το ίδιο βακτήριο και η ίδια διαδρομή επιμόλυνσης. Από αυτά τα δεδομένα καθίσταται σαφές ότι υπάρχει μια σειρά από παράγοντες που επηρεάζουν την πιθανότητα εισχώρησης ενός παθογόνου βακτηρίου εντός ενός φυτού. Τέτοιοι είναι το είδος του φυτού, το στέλεχος ή/και ο ορότυπος του βακτηρίου, ο τρόπος μόλυνσης και η ηλικία του φυτού. Επιπλέον, σημαντικό ρόλο στην είσοδο των μικροοργανισμών εντός του φυτού διαδραματίζει η φωτοσύνθεση αναφορικά με την χημειοτακτική αντίδραση και η απουσία γενετικής διαταραχής στα στομάτια (Deering et al., 2012).

Ενώ τα παραπάνω στοιχεία δείχνουν έντονα ότι η είσοδος των βακτηρίων εντός του φυτικού ιστού μέσω ανοικτών στοματίων είναι μια ενεργητική διαδικασία που απαιτεί ζωντανό φυτικό ιστό και βακτηριακά κύτταρα, είναι επίσης πιθανό ότι τα βακτήρια εισχωρούν παθητικά μέσω μολυσμένου νερού που δέχονται τα φυτά από το περιβάλλον. Μελέτες με τους μικροοργανισμούς *Salmonella* spp. και *E. coli* O157:H7 έχουν δείξει ότι τα βακτήρια αυτά μπορούν να ανακτώνται από σπορόφυτα, από μίσχους ή/και από φύλλα μετά την έκθεση των σπόρων σε μολυσμένο νερό (Howard et al., 2003., Warriner et al., 2003). Από όλες τις μελέτες διαφαίνεται ότι τα βακτήρια μπορούν να εισέλθουν στο φυτό παθητικά και να μεταφερθούν μέσα σε αυτό μέσω της ροής του νερού. Αυτό αποδείχτηκε σε μία μελέτη όπου εξετάστηκε η εισχώρηση

και η κίνηση μικροσφαιριδίων φθορισμού μέσω επιφανειακής άρδευσης (Solomon και Matthews, 2005).

Η **επιβίωση** των βακτηρίων **εντός** του φυτικού ιστού είναι αποτέλεσμα της προσαρμογής του σε αυτό το άγνωστο περιβάλλον. Η προσαρμογή αυτή είναι αποτέλεσμα έκφρασης διαφόρων γονιδίων που μπορεί να βρίσκονται σε πλασμίδια ή στο χρωμόσωμα ή σαν μεγάλες ενότητες που αποτελούνται από πληθώρα γονιδίων και οπερονίων. Μια τέτοια συστάδα γονιδίων αποτελούν και οι νησίδες παθογένειας, η έκφραση των οποίων γενικά εκδηλώνεται μια συγκεκριμένη χρονική στιγμή κατά τη διάρκεια της μόλυνσης (Marcus et al., 2000).

Ένας αριθμός από μελέτες έχουν δείξει ότι τα παθογόνα *Salmonella* spp. και *E. coli* είναι σε θέση να αυξάνουν τον πληθυσμό τους ακόμα και σε υψηλά επίπεδα είτε στην επιφάνεια είτε στο εσωτερικό του φυτικού ιστού. Αυτό σημαίνει ότι αυτά τα παθογόνα βακτήρια είναι ικανά να αξιοποιήσουν τα θρεπτικά συστατικά του φυτού με πολλούς μηχανισμούς. Επίσης, τα βακτήρια που διαβιώνουν στον αποπλασματικό χώρο του φυτού πιθανώς είναι σε θέση να χρησιμοποιήσουν άμεσα τους πολυσακχαρίτες του κυτταρικού τοιχώματος. Για να επιτευχθεί όμως αυτό απαιτούνται ένζυμα που διασπούν αυτά τα μακρομόρια στα επιμέρους σάκχαρα (Deering et al., 2012).

1.10. Συνθήκες ήπιας καταπόνησης του παθογόνου μικροοργανισμού

Όπως είναι γνωστό, κάτω από άριστες συνθήκες ανάπτυξης, όπως άφθονα θρεπτικά συστατικά, άριστη (optimum) θερμοκρασία ανάπτυξης, pH, επίπεδα οξυγόνου, ενεργότητα νερού κ.ά., οι μικροοργανισμοί αναπτύσσονται με το μέγιστο ρυθμό ανάπτυξής τους. Όταν οι συνθήκες αυτές δεν είναι ευνοϊκές για το μικροοργανισμό, τα μικροβιακά κύτταρα υποβάλλονται σε καταπόνηση (Bearson et al., 1998). Τα τροφιμογενή παθογόνα μπορεί να βρεθούν σε δυσμενείς για την επιβίωσή τους συνθήκες, σχεδόν σε κάθε περιβάλλον διαβίωσής τους: φυσικό (π.χ. έδαφος, συστήματα νερού), χώρο επεξεργασίας (π.χ. σφαγεία, εργοστάσια επεξεργασίας τροφίμων) και οικιακό (π.χ. ζώα, άνθρωποι) (Winfield and Groisman, 2003). Οι αποκρίσεις τους σε αυτές τις συνθήκες επηρεάζουν όχι μόνο την ανάπτυξη και την επιβίωσή τους, αλλά την αντοχή τους σε αντιμικροβιακές ουσίες. Προκειμένου να επιβιώσουν στις αιφνίδιες, πιθανά θανατηφόρες, αλλαγές του

μικροπεριβάλλοντος, τα βακτήρια είναι ικανά να αναπτύξουν μηχανισμούς που θα τα βοηθήσουν να επιβιώσουν σε ένα ευρύ φάσμα συνθηκών καταπόνησης (McMahon et al., 2007).

1.10.1. Καταπόνηση ψύχους (cold stress)

Η ικανότητα των μικροβίων να αισθάνονται και να αντιδρούν σε αλλαγές του περιβάλλοντος είναι ζωτικής σημασίας για την επιβίωσή τους. Η καταπόνηση ψύχους που χρησιμοποιήθηκε, καθόρισε μια παρατεταμένη φάση προσαρμογής, μια βραδύτερη ανάπτυξη σε εκθετική φάση και μειωμένο μέγιστο πληθυσμό. Η παράταση της φάσης προσαρμογής μπορεί να οφείλεται στην αποκατάσταση της μοριακής βλάβης κατά της συνθήκης ψύχους και στη σύνθεση των κυτταρικών συστατικών που είναι απαραίτητες για ανάπτυξη (Rolfé et al., 2012). Κατά τη διάρκεια της καταπόνησης ψύχους πολλές κυτταρικές λειτουργίες όπως ανασυνδιασμός του DNA, μεταγραφή, μετάφραση, αναδίπλωση πρωτεϊνών και μεταβολικές λειτουργίες εκτίθενται σε κίνδυνο. Η έκθεση της γονιδιακής έκφρασης *dnaK*, *groEL* και *tig* σε συνθήκες ψύχους υπέστηκε αισθητή μείωση στη εκθετική και στη φάση προσαρμογής. Μείωση δηλαδή της γονιδιακής έκφρασης (Wesche et al., 2009).

1.10.2. Καταπόνηση ξήρανσης (desiccation stress)

Ο παθογόνος μικροοργανισμός *Salmonella* μπορεί να επιβιώσει μακροπρόθεσμα σε συνθήκες έλλειψης θρεπτικών συστατικών και καταπόνησης λόγω ξήρανσης και να μολύνει τα τρόφιμα που έχουν ενδιάμεσες ή χαμηλές ενεργότητες νερού. Ωστόσο, λίγα είναι γνωστά για τους συγκεκριμένους μοριακούς μηχανισμούς που διέπουν την επιβίωση και την εποίκηση του σε τρόφιμα χαμηλής ενεργότητας νερού. Ωστόσο ανιχνεύθηκαν γονίδια που εμπλέκονται στην προστασία του DNA και των ρυθμιστικών λειτουργιών λόγω της καταπόνησης ψύχους όπου ενδέχεται να διαδραματίσουν ρόλο στη προστασία του σαλμονέλα από την ξήρανση και την έλλειψη θρεπτικών συστατικών. Επιπλέον, μη-κωδικοποιημένες RNAs μπορούν επίσης να παίζουν ρόλο στην επιβίωση του *Salmonella* ύστερα από την καταπόνηση ξήρανσης (Deng et al., 2011).

1.10.3. Καταπόνηση έλλειψης θρεπτικών συστατικών (starvation stress)

Η έλλειψη που παρουσιάζεται σε απαραίτητα θρεπτικά συστατικά είναι το πιο κοινό είδος καταπόνησης. Ειδικά η απουσία μιας πηγής ενέργειας άνθρακα οδηγεί σε μια σειρά από αλλαγές στον κυτταρικό μεταβολισμό και τα πρότυπα της γονιδιακής έκφρασης σε ένα βακτήριο (Foster et al., 1986). Οι γενετικές και φυσιολογικές αλλαγές που υφίσταται το βακτήριο λόγω έλλειψης θρεπτικών συστατικών αναφέρονται ως απόκριση στην πείνα (starvation stress response SSR). Προκειμένου να επιβιώσουν, τα κύτταρα *Salmonella* πρέπει να είναι σε θέση να αισθανθούν και να προσαρμοστούν σε μεταβαλλόμενα περιβάλλοντα (Brown et al., 2002). Έτσι, η SSR επιτρέπει στα βακτήρια να επιβιώσουν σε περιόδους έλλειψης θρεπτικών συστατικών. Επιπλέον, η επαγωγή της SSR, ιδιαίτερα από έλλειψη πηγής άνθρακος αυξάνει τη βακτηριακή αντοχή σε άλλες περιβαλλοντικές καταπονήσεις, η οποία ονομάζεται διασταυρούμενη προστασία. (Rathman et al., 1996).

1.10.4. Όξινη καταπόνηση (acid stress)

Το όξινο pH του στομάχου συμπεριλαμβάνεται στις πρώτες γραμμές άμυνας του οργανισμού ενάντια στην εισβολή παθογόνων βακτηρίων (Mikkelsen et al., 2004). Το γαστρικό υγρό κατά προσέγγιση έχει εύρος τιμών pH που κυμαίνεται από 1.5 έως 3.0 καθώς η συγκέντρωση του HCl ανέρχεται σε 150-160 mEq / L. Η όξινη αυτή καταπόνηση προκαλεί διάφορες μεταβολές στη δομή και στις λειτουργίες των κυττάρων όπως για παράδειγμα αλλαγή στη σύσταση της κυτταρικής μεμβράνης, αύξηση της ροής των πρωτονίων και του καταβολισμού των αμινοξέων, αλλαγές υδρόλυση των νουκλεϊκών οξέων (DNA, RNA) κ.α. Ωστόσο, η αυξημένη οξεοανθεκτικότητα του *Salmonella* spp. είναι ευρέως γνωστή (Alvarez-Ordóñez et al., 2010). Η ομοιότητα του εσωτερικού pH του κυττάρου του μικροοργανισμού *Salmonella* spp. όταν αυτός εκτίθεται σε ακραία όξινες τιμές pH, διατηρείται όταν ο μικροοργανισμός έχει προηγουμένως υποστεί ήπια όξινη καταπόνηση (Yousef and Courtney, 2003). Το σύστημα που συμβάλλει στη διατήρηση της ανθεκτικότητας του μικροοργανισμού σε συνθήκες όξινης καταπόνησης είναι το σύστημα

αποκαρβοξυλάσης της λυσίνης (lysine decarboxylase - CadA) το οποίο λειτουργεί σε συνδυασμό με ένα μεταφορέα λυσίνης: καδαβερίνης (CadB) (Park et al., 1996, Alvarez-Ordóñez et al., 2010).

1.11. Υπόθεση-σκοπός της παρούσας μελέτης

Στις μέρες μας ένα μεγάλο μέρος των τροφιμογενών κρουσμάτων αποδίδονται στην κατανάλωση φρέσκων φρούτων και λαχανικών και πιο συγκεκριμένα στα πράσινα φυλλώδη λαχανικά. Έτσι διατυπώνονται ανησυχίες σχετικά με την ασφάλεια των τροφίμων σε φρέσκα προϊόντα, όπως το πεπόνι, βότανα, μαρούλι, ντομάτες, σπανάκι, λάχανα και άλλα λαχανικά, εξαιτίας του γεγονότος ότι τα προϊόντα αυτά καταναλώνονται ωμά (Van der Linden et al., 2016). Αυτό οφείλεται ενδεχομένως στη χαμηλή μολυσματική δόση και τη μεγάλη συχνότητα εμφάνισης του παθογόνου *Salmonella* (Bhunia, 2008). Η ικανότητα του μικροοργανισμού να εσωτερικοποιείται οξύνει το πρόβλημα (Kroupitski et al., 2009), δυσχεραίνοντας έτσι την καταπολέμηση με τη χρήση απολυμαντικών (Van der Linden et al., 2016).

Ωστόσο, οι υπάρχουσες μελέτες με αντικείμενο την εσωτερικοποίηση του παθογόνου σε φυλλώδη λαχανικά, αφορούν στη μικροσκοπική παρατήρηση και αποτύπωση του φαινομένου της εσωτερικοποίησης σε διάφορα λαχανικά (Gomes et al., 2009; Kroupitski et al., 2009; Goldberg et al., 2011; Park et al., 2012), χωρίς όμως να έχει γίνει ποσοτικοποίηση του φαινομένου (καταμέτρηση του πληθυσμού των εσωτερικοποιημένων και προσκολλημένων κυττάρων).

Σύμφωνα με προηγούμενη μελέτες του εργαστηρίου Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων (Χιλιά Νικολίν 2015, Αποστολίδου Ζωή 2015), η εσωτερικοποίηση του παθογόνου *Salmonella* spp. σε φυλλώδη λαχανικά (σπανάκι, μαρούλι, βλίτα) εξαρτάται τόσο από το ίδιο το λαχανικό, όσο και από τη θερμοκρασία και το χρόνο συντήρησης. Επιπλέον, η διαδικασία της προσκόλλησης ή/και εσωτερικοποίησης του παθογόνου στα λαχανικά φάνηκε να επηρεάζει και την οξεοανθεκτικότητά του σε μετέπειτα έκθεση σε ακραία όξινη καταπόνηση. Όσον αφορά στην επίδραση της παρουσίας ενδογενούς μικροχλωρίδας, φάνηκε να έχει μικρότερη επίδραση συγκριτικά με τη σύσταση του εκάστοτε λαχανικού στην οξεοανθεκτικότητα του μικροοργανισμού.

Σημαντικοί παράγοντες που καθορίζουν την εκάστοτε φυσιολογική απόκριση των μικροοργανισμών είναι τόσο ο πληθυσμός τους, αλλά και το ιστορικό τους. Λαμβάνοντας υπ' όψη τα παραπάνω ευρήματα, σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της επίδρασης προηγούμενης έκθεσης του παθογόνου *Salmonella* spp. σε ήπιες συνθήκες καταπόνησης, στην ικανότητα του παθογόνου να εποικίσει φυλλώδη λαχανικά. Πιο συγκεκριμένα οι στόχοι της παρούσας έρευνας συνοψίζονται ως εξής :

- Η μελέτη της ικανότητας **διαφορετικών επιπέδων του πληθυσμού** του παθογόνου *Salmonella* Enteritidis να εποικίζει επιφάνειες τεσσάρων διαφορετικών φυλλωδών λαχανικών (μαρούλι, σπανάκι, ρόκα, ιταλικά χόρτα), να προσκολλάται (attached cells) ή να εσωτερικοποιείται (internalized cells),

- Η μελέτη ικανότητας του παθογόνου *Salmonella* Enteritidis να εποικίζει επιφάνειες τεσσάρων διαφορετικών φυλλωδών λαχανικών (μαρούλι, σπανάκι, ρόκα, ιταλικά χόρτα), να προσκολλάται (attached cells) ή να εσωτερικοποιείται (internalized cells), ύστερα από προηγούμενη έκθεση των κυττάρων του σε συνθήκες ήπιων καταπονήσεων (**όξινες συνθήκες, συνθήκες ψύχους, συνθήκες έλλειψης θρεπτικών συστατικών, συνθήκες ξήρανσης**).

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Αναλώσιμα υλικά

Για τη διεκπεραίωση της παρούσας μελέτης και τη διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε μια πληθώρα υλικών, που περιελάμβανε ανόργανα και οργανικά αντιδραστήρια καθώς και τυποποιημένα σκευάσματα θρεπτικών υποστρωμάτων.

2.1.1. Χημικά αντιδραστήρια

Από πλευράς χημικών αντιδραστηρίων χρησιμοποιήθηκε νιτρικός άργυρος AgNO₃ (1% w/v) (Applichem Pancreac, A1376, USP).

2.1.2. Θρεπτικά υποστρώματα

Σε όλη την πειραματική διαδικασία τα θρεπτικά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν

ήταν:

- Tryptic Soy Broth (TSB) (LAB M, LAB004, United Kindom).
- Tryptic Soy Agar (TSA) (LAB M, LAB011, United Kindom). Χρησιμοποιήθηκε για την καλλιέργεια μιας ευρείας ποικιλίας αερόβιων και αναερόβιων μικροοργανισμών, και συγκεκριμένα για την εκτίμηση της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας των λαχανικών (OMX).
- Xylose Lysine Desoxycholate (XLD) (LAB M, LAB032, United Kindom). Το XLD Agar (Άγαρ Ξυλόζης Λυσίνης Δεσοξυχολικού άλατος) αποτελεί ένα μετρίως εκλεκτικό και διαφορικό υλικό που χρησιμοποιείται για την απομόνωση και διαφοροποίηση αρνητικών κατά Gram εντερικών παθογόνων (*Salmonella* και *Shigella*). Ως πηγή θρεπτικών συστατικών και βιταμινών περιέχει εκχύλισμα ζυμομυκήτων. Η χρήση του δεσοξυχολικού νατρίου που περιέχει, ως εκλεκτικό παράγοντα, το καθιστά ανασταλτικό για την ανάπτυξη των θετικών κατά Gram μικροοργανισμών. Σε ότι αφορά τον τρόπο δράσης του, η ξυλόζη ενσωματώνεται στο υλικό καθώς ζυμώνεται από όλους σχεδόν τους εντερικούς οργανισμούς εκτός από τα είδη του γένους *Shigella* και η ιδιότητά της αυτή επιτρέπει τη διαφοροποίησή τους. Η λυσίνη περιλαμβάνεται, επίσης, ώστε να επιτρέπεται η διαφοροποίηση των ειδών του γένους *Salmonella* από τους μη παθογόνους οργανισμούς, γιατί χωρίς τη

λυσίνη, τα είδη του γένους *Salmonella* θα ζύμωναν ταχέως την ξυλόζη με αποτέλεσμα να μην υπήρχε διάκριση τους από τα μη παθογόνα είδη. Αφού εξαντλήσουν τα είδη *Salmonella* την προμήθεια ξυλόζης, στη συνέχεια χρησιμοποιούν τη λυσίνη μέσω του ενζύμου αποκαρβοξυλάση της λυσίνης, με αναστροφή σε αλκαλικό pH που μιμείται την αντίδραση του *Shigella*.

Για να ενισχυθεί η ικανότητα διαφοροποίησης της σύνθεσης, στο υλικό περιλαμβάνεται ένα σύστημα δείκτη H_2S , που αποτελείται από θειοθειικό νάτριο και κιτρικό σίδηρο(III)αμμώνιο, για την οπτικοποίηση της παραγωγής υδρόθειου, που οδηγεί στο σχηματισμό αποικιών με μαύρο κέντρο. Οι μη παθογόνοι οργανισμοί που παράγουν H_2S δεν επιτυγχάνουν αποκαρβοξυλίωση της λυσίνης, συνεπώς, η όξινη αντίδραση που παράγεται από αυτά τα εμποδίζει να δημιουργήσουν το μαύρο χρώμα στις αποικίες, το οποίο προκύπτει μόνο σε ουδέτερο ή αλκαλικό pH (Taylor, 1965).

2.2. Εργαστηριακός εξοπλισμός

Η εργαστηριακή υποδομή που χρησιμοποιήθηκε κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας περιελάμβανε διάφορα σκεύη, όργανα και συσκευές τα οποία αναφέρονται και τα στοιχεία τους παρουσιάζονται όπου αυτά χρησιμοποιήθηκαν.

2.3. Μικροβιακά στελέχη

Στην παρούσα έρευνα μελετήθηκε η συμπεριφορά ενός στελέχους του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella enterica* subsp. *enterica* υπό συγκεκριμένες συνθήκες καταπονήσεων. Το στέλεχος που μελετήθηκε προέρχεται από συλλογή απομονωθέντων βακτηριακών στελεχών που διατηρεί το εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων (Πίνακας 2.1.). Η συντήρηση των μικροοργανισμών γινόταν στους $-20^{\circ}C$ σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα (Tryptic Soy Broth, TSB, LAB004, United Kindom), παρουσία γλυκερόλης (20% v/v).

Πίνακας 2.1: Μικροβιακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη

Κωδικός	Στέλεχος	Εργαστηριακός αριθμός	Προέλευση
PS12	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Enteritidis PTA P167807	PT4	Ζωοτροφές

2.4. Φυλλώδη Λαχανικά

Τα λαχανικά που χρησιμοποιήθηκαν για την επίτευξη των πειραμάτων στην παρούσα μελέτη ήταν το σπανάκι (*Spinacia oleracea*), το μαρούλι (*Lactuca sativa*), τα ιταλικά χόρτα (*Cichorium endivia*) και η ρόκα (*Eruca sativa*). Όλα τα λαχανικά προμηθεύτηκαν από την τοπική υπεραγορά, και προέρχονταν από έναν με δύο προμηθευτές.



Εικόνα 2. Φυλλώδη λαχανικά πριν τον εμβολιασμό

2.5. Πειραματική διαδικασία

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε και οι μικροβιακοί χειρισμοί που διενεργήθηκαν, σε κάθε περίπτωση υπό ασηπτικές συνθήκες, παρουσιάζονται στο ακόλουθο διάγραμμα ροής (Σχήμα 1). Πραγματοποιήθηκαν συνολικά δύο πειραματικές αναπαραγωγές, καθεμιά από τις οποίες περιελάμβανε τουλάχιστον δύο βιολογικές επαναλήψεις.

2.5.1. Ανανέωση των μικροοργανισμών

Πρόκειται για το στάδιο εκείνο το οποίο μεσολαβεί πριν από τον ενοφθαλμισμό των μικροοργανισμών σε κάποιο υπόστρωμα, προκειμένου να ανακτήσουν οι μικροοργανισμοί τη ζωτικότητα τους και να καταστούν άμεσα έτοιμοι για ανάπτυξη.

Προετοιμασία εμβολίων

- Έγιναν δύο διαδοχικές ανανεώσεις (υπό ασηπτικές συνθήκες):
 - Η πρώτη περιλάμβανε λήψη 100 μL κυττάρων *Salmonella* από την τράπεζα κυττάρων μικροοργανισμών του εργαστηρίου (stock) και την προσθήκη τους σε δοκιμαστικούς σωλήνες με 10 mL TSB και εν συνεχεία επώαση στους 37 °C για 24 h.
 - Η δεύτερη περιλάμβανε τη μεταφορά 100 μL από τους δοκιμαστικούς σωλήνες της πρώτης ανανέωσης σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν 10 mL TSB και εν συνεχεία επώαση στους 37 °C για 18 h.

- Χρήση της τεχνικής της γραμμική επίστρωσης (streaking) με σκοπό τον σχηματισμό μεμονωμένων αποικιών του βακτηρίου και επώαση στους 37°C για 24h.
 - Έπειτα πρώτη ανανέωση, με τοποθέτηση μιας αποικίας σε δοκιμαστικό σωλήνα με 10 mL TSB και εν συνεχεία επώαση στους 37 °C για 24 h.
 - Η δεύτερη ανανέωση περιλάμβανε τη μεταφορά 100 μL από τους δοκιμαστικούς σωλήνες της πρώτης ανανέωσης σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν 10 mL TSB και εν συνεχεία επώαση στους 37 °C για 18 h.

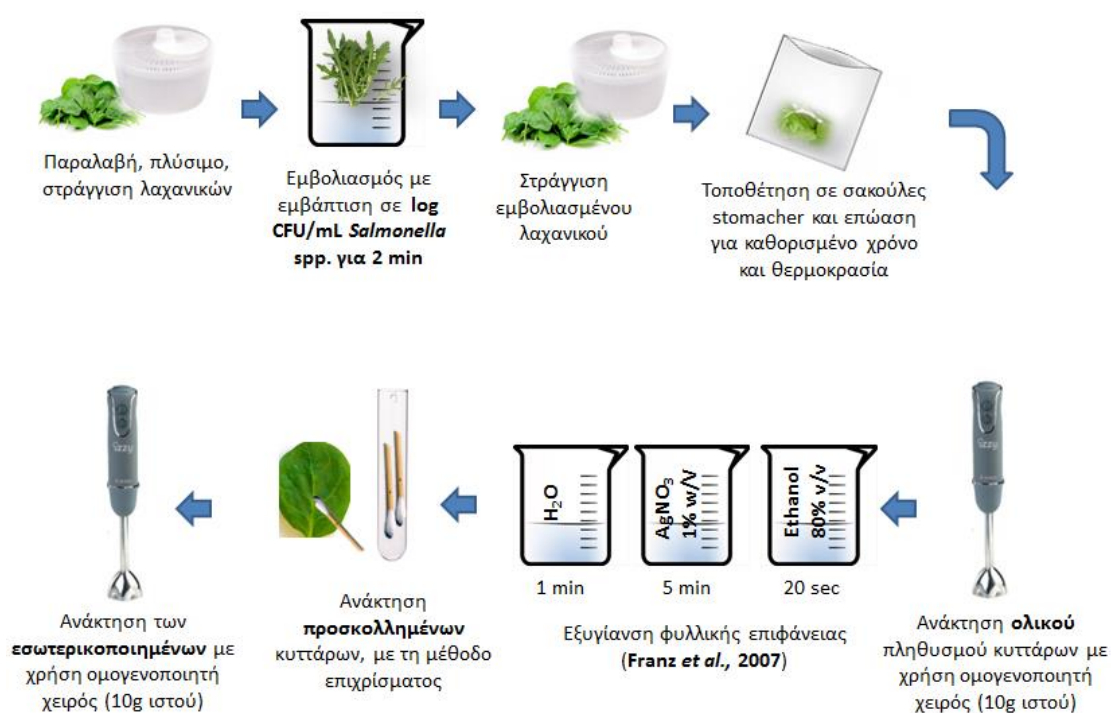
- Για τον καθαρισμό του εμβολίου έγινε:
 - Φυγοκέντρηση στις 3600 rpm για 10 min στους 4 °C.

- Απόρριψη του υπερκείμενου και επαναδιάλυση του ιζήματος σε 10 mL ισοτονικό διάλυμα ¼ strength Ringer's solution (2 φορές).

Ο καθαρισμός του εμβολίου είχε ως σκοπό την απομάκρυνση του θρεπτικού υλικού και όλων των μικροβιακών μεταβολιτών που υφίστανται στο μέσο. Μετά τον καθαρισμό πραγματοποιούνταν δειγματοληψία του τελικού εμβολίου σε ορισμένες από τις πειραματικές διαδικασίες για την εξακρίβωση του αρχικού πληθυσμού *Salmonella*.

2.5.2. Πειράματα εκτίμησης ολικών, προσκολλημένων και εσωτερικοποιημένων κυττάρων του παθογόνου μικροοργανισμού στα λαχανικά.

Η πειραματική διαδικασία, που ακολουθεί μετά την ανανέωση των μικροοργανισμών και τον καθαρισμό του εμβολίου απεικονίζεται στο Σχήμα 1.



Σχήμα 1: Πειραματική πορεία εκτίμησης ολικών, προσκολλημένων και εσωτερικοποιημένων κυττάρων του μικροοργανισμού στα φυλλώδη λαχανικά.

2.5.2.1. Εμβολιασμός λαχανικών

Αρχικά τα λαχανικά ξεπλύθηκαν με τρεχούμενο, κρύο νερό βρύσης και στη συνέχεια ακολούθησε στράγγιση τους, προκειμένου να απομακρυνθεί η περίσσεια νερού. Ύστερα εμβολιάστηκαν με τον παθογόνο μικροοργανισμό (αρχικού πληθυσμού $9 \log \text{ CFU/mL}$), με τη μέθοδο της εμβάπτισης κατά την οποία τα λαχανικά τοποθετήθηκαν για 2 λεπτά υπό ελαφρά ανάδευση σε δοχείο με αραιωτικό $\frac{1}{4}$ strength Ringer's solution με τελικό πληθυσμό του μικροοργανισμού $7 \log \text{ CFU/mL}$. Παρόλο που βιβλιογραφικά έχει αναφερθεί και ως μέθοδος εμβολιασμού η μέθοδος της έγχυσης, η μέθοδος της εμβάπτισης επιλέχτηκε με βάση τα αποτελέσματα προηγούμενης πειραματικής μελέτης που εκπονήθηκε στο εργαστήριο και έδειχνε ότι με τη μέθοδο της έγχυσης, όπως ήταν αναμενόμενο, προέκυπτε μεγαλύτερος πληθυσμός εσωτερικοποιημένων κυττάρων λόγω της «τεχνητής» ώθησης του εμβολίου στο εσωτερικό της επιφάνειας του λαχανικού με τη χρήση σύριγγας. Αντίθετα, με τη μέθοδο της εμβάπτισης, οι συνθήκες επιμόλυνσης ήταν πιο ρεαλιστικές καθώς η εσωτερικοποίηση του παθογόνου λάμβανε χώρα μέσω φυσικών οπών των φύλλων, όπως τα στομάτια καθώς επίσης και μέσω τραυμάτων στην επιφάνεια των φύλλων. (Itoh *et al*, 1998; Seo *et al*, 1999;)

Έπειτα από τον εμβολιασμό, οι απαραίτητες ποσότητες λαχανικών τοποθετούνταν είτε στους $5 \text{ }^\circ\text{C}$ είτε στους $20 \text{ }^\circ\text{C}$ όπου παρέμεναν είτε για 2 ώρες είτε για 2 ημέρες (48 h) έως την δειγματοληψία-υποβολή σε καταπόνηση. Με το πέρας του προκαθορισμένου χρόνου επώασης τα λαχανικά πριν την δειγματοληψία ξεπλένονταν σε δοχείο με απιονισμένο νερό για την απομάκρυνση των χαλαρά προσκολλημένων κυττάρων του παθογόνου.

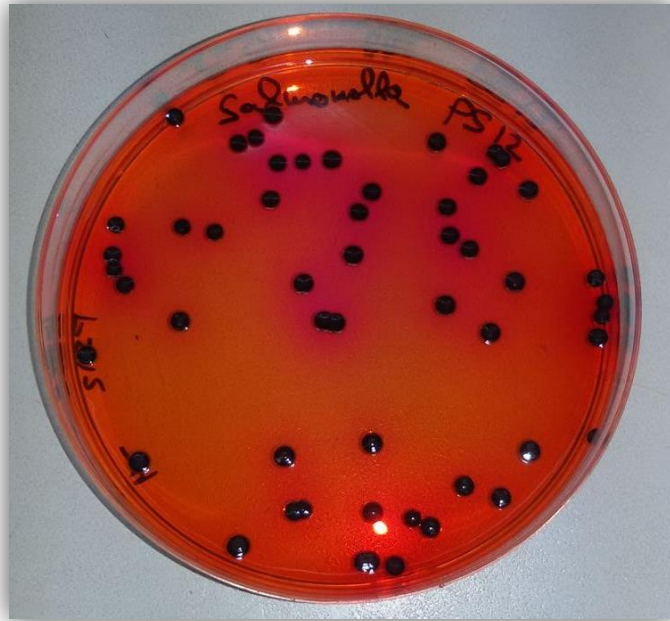
2.5.2.2. Δειγματοληψία

- Ολική Μεσόφιλη χλωρίδα (OMX): Ποσότητα 0.1 mL από την κατάλληλη δεκαδική αραιώση ενοφθαλμίστηκε, υπό ασηπτικές συνθήκες, με τη μέθοδο της επιφανειακής επίστρωσης (spread) σε τρυβλία με μη επιλεκτικό υπόστρωμα TSA. Ακολούθησε επώαση στους $30 \text{ }^\circ\text{C}$ για 2 ημέρες και καταμέτρηση όλων των αποικιών που αναπτύχθηκαν.

➤ *Salmonella* spp.spp.

- Ο προσδιορισμός του πληθυσμού του εκάστοτε δείγματος έγινε σε κάθε θερμοκρασία (5 °C και 20 °C) και χρόνο (2 h και 48 h). Για κάθε δείγμα διενεργήθηκαν 2 επαναλήψεις.
- Προσδιορισμός συνολικού πληθυσμού (total) του παθογόνου μικροοργανισμού: 10g λαχανικού αραιώθηκαν σε ισοτονικό διάλυμα Ringer (1:10) και ομογενοποιήθηκαν με χρήση ομογενοποιητή χειρός (hand mixer).
- Προσδιορισμός του πληθυσμού των προσκολλημένων κυττάρων του παθογόνου στην επιφάνεια του λαχανικού έγινε με την μέθοδο επιχρίσματος (swabbing) (βλέπε 2.5.2.2.α). Χρησιμοποιήθηκαν 2 αποστειρωμένοι στείλεοί για τη «σάρωση» 10 g λαχανικού οι οποίοι εμβαπτίστηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες με 10 mL ισοτονικό διάλυμα Ringer.
- Προσδιορισμός του εσωτερικοποιημένου πληθυσμού του παθογόνου έγινε αφού είχε προηγηθεί η εξυγίανση της επιφάνειας του λαχανικού (βλέπε 2.5.2.2.β). Συγκεκριμένα, 10 g λαχανικού αραιώθηκαν σε Ringer (1:10) και ομογενοποιήθηκαν με χρήση ομογενοποιητή χειρός.

Όλα τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε σακούλες stomacher με φίλτρο και στη συνέχεια, ακολούθησαν οι διαδοχικές αραιώσεις και η επίστρωση τους σε τρυβλία XLD και επώαση στους 37 °C για 24 h.



Εικόνα 2.1. Αποικίες του *Salmonella Enteritidis* σε θρεπτικό υπόστρωμα XLD Agar

2.5.2.2.1. Μέθοδος επιχρίσματος (swabbing)

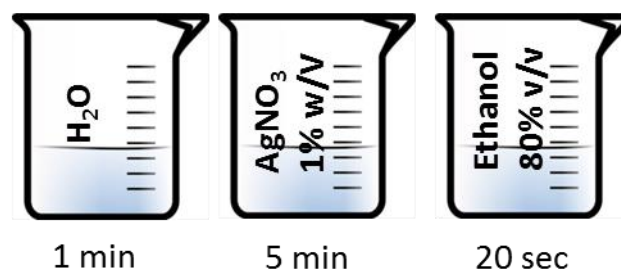
Αποστειρωμένοι βαμβακοφόροι στείλει διαποτίζονται με κατάλληλο αραιωτικό διάλυμα και στη συνέχεια χρησιμοποιούνται για τη σάρωση, εφαρμόζοντας ήπια πίεση, της εξεταζόμενης επιφάνειας. Ο προσδιορισμός του μικροβιακού φορτίου γίνεται με την τοποθέτηση του βαμβακοφόρου στείλει σε αποστειρωμένο δοκιμαστικό σωλήνα με αραιωτικό διάλυμα και ακολουθεί η διαδικασία των διαδοχικών αραιώσεων.

2.5.2.2.2. Μέθοδος εξυγίανσης επιφάνειας

Με σκοπό την εύρεση της κατάλληλης μεθόδου εξυγίανσης προκειμένου να μην αλλοιώνονται τα οργανοληπτικά και μορφολογικά χαρακτηριστικά των λαχανικών δοκιμάστηκαν η χλωρίνη (NaClO), 100% αιθανόλη και ο νιτρικός άργυρος (AgNO₃). Λόγω της αλλοίωσης του φυτικού ιστού από την χλωρίνη και την αιθανόλη, η μέθοδος που εφαρμόστηκε για την εξυγίανση της επιφάνειας των λαχανικών περιλάμβανε διαδοχικά τα στάδια (Franz *et al.*, 2007):

- Εμβάπτιση σε διάλυμα 80 % v/v αιθανόλης για 20 sec
- Εμβάπτιση σε διάλυμα 1 % w/v AgNO₃ για 5 min
- Ξέπλυμα σε απιονισμένο νερό για 1 min.

Ύστερα από κάθε εφαρμογή της μεθόδου για την επαλήθευση της ορθής εξυγίανσης, σε δείγμα λαχανικού εφαρμόζοταν η μέθοδος προσδιορισμού των προσκολλημένων κυττάρων με την μέθοδο επιχρίσματος. Συγκεκριμένα, 2 αποστειρωμένοι στειλεοί χρησιμοποιήθηκαν για τη «σάρωση» 10 g λαχανικού και στη συνέχεια εμβάπτιστηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες με 10 mL ισοτονικό διάλυμα Ringer solution. Έπειτα, ποσότητα 1 mL, ενοφθαλμίστηκε υπό ασηπτικές συνθήκες, με τη μέθοδο της επιφανειακής επίστρωσης σε τριπλό τρυβλίο, με επιλεκτικό υπόστρωμα XLD.

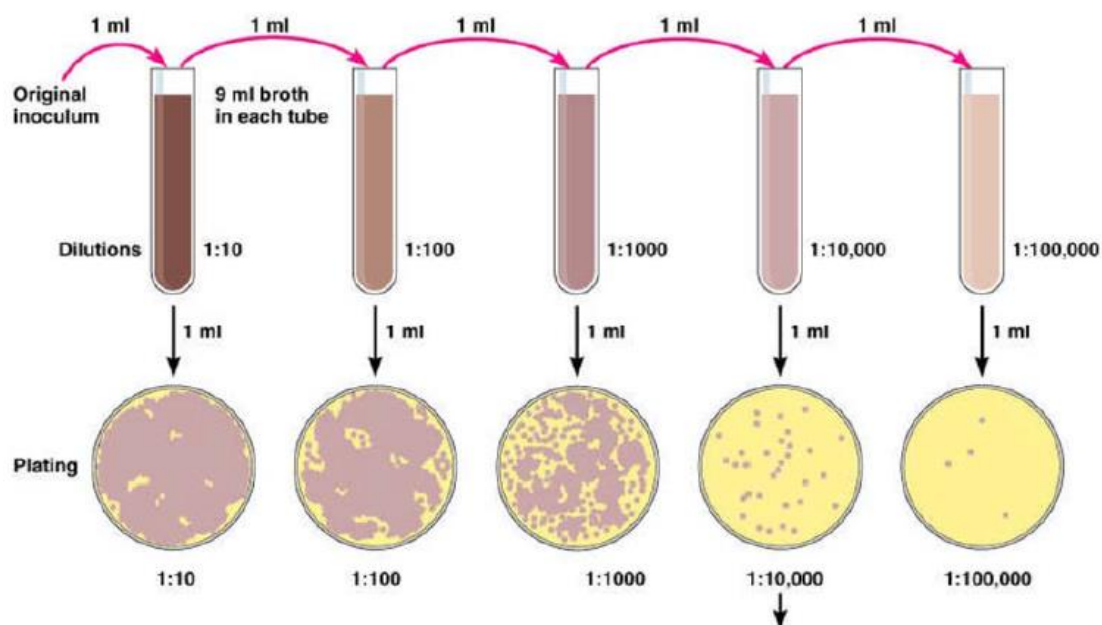


Εξυγίανση φυλλικής επιφάνειας
(Franz *et al.*, 2007)

Σχήμα 2: Πειραματική πορεία εξυγίανσης των επιφανειών στα φυλλώδη λαχανικά.

2.5.2.2.3. Μέθοδος διαδοχικών αραιώσεων

Ο προσδιορισμός του μικροβιακού φορτίου χρειάζεται μία διαδικασία διαχωρισμού των βακτηρίων, ώστε όταν καλλιεργηθούν σε ένα θρεπτικό υλικό, να σχηματίζουν μεμονωμένες και ευκρινείς αποικίες. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται μέθοδος διαδοχικών αραιώσεων.



Εικόνα 2.2.: Μέθοδος των διαδοχικών αραιώσεων.

2.5.2.2.4. Τεχνική επιφανειακής επίστρωσης (spread plate technique)

Εφαρμόζεται γενικά για αερόβιους μικροοργανισμούς και είναι η εξάπλωση γνωστού όγκου (0.1 mL) βακτηριακού εναιωρήματος σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα.

2.5.3. Μέθοδος απαρίθμησης βακτηριακών αποικιών

Η μέθοδος απαρίθμησης βακτηριακών αποικιών αφορά την καταμέτρηση των αποικιών που σχηματίζονται σε στερεό θρεπτικό υλικό κατά την εξάπλωση ή ενσωμάτωση γνωστής συγκέντρωσης εμβολίου. Εκφράζεται σε μονάδα σχηματιζόμενων αποικιών (Colony Forming Units, CFU).

$\log (\text{CFU/g}) = \log ((\text{μέσος όρος αριθμού αποικιών}) \cdot \text{αραίωση} \cdot 1/V)$ όπου V: ο όγκος (mL) που προστίθεται στο τρυβλίο.

2.5.4. Ανάκτηση τραυματισμένων κυττάρων-Τεχνική διπλής στρώσης

Είναι γνωστό ότι κύτταρα *Salmonella* spp τα οποία επιστρώνονται σε επιλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα (XLD), ενώ έχει προηγηθεί η υποβολή τους σε ισχυρή καταπόνηση ενδέχεται, είτε λόγω τραυματισμού είτε λόγω της επιπλέον καταπόνησης που προκαλεί το ίδιο το επιλεκτικό υπόστρωμα να αδυνατούν να αναπτυχθούν με αποτέλεσμα την υποεκτίμηση του πληθυσμού των επιβιωσάντων κυττάρων (Ray and Adams, 1984; Reissbrodt *et al.*, 1996; Kang and Fung, 1999). Σύμφωνα με τους Kang and Fung (2000), επίστρωση των βακτηριακών κυττάρων αρχικά σε μη επιλεκτικό μέσο (TSA) και εφαρμογή δεύτερης στρώσης επιλεκτικού μέσου (XLD) 7 mL μετά από επώαση των τρυβλίων για 1,5 h σε θερμοκρασία 37 °C έχει ως αποτέλεσμα την καλύτερη ανάκτηση τραυματισμένων κυττάρων και συνεπώς πιο αξιόπιστη εκτίμηση του βακτηριακού πληθυσμού. Η καλύτερη ανάκτηση επιτυγχάνεται διότι οι επιλεκτικοί παράγοντες του στρώματος XLD διαχέονται στο κατώτερο στρώμα TSA αφού τα τραυματισμένα κύτταρα έχουν ανακάμψει με αποτέλεσμα να απαριθμούνται τραυματισμένα και μη κύτταρα *Salmonella*.

2.5.5. Μέτρηση pH

Ο προσδιορισμός του pH των δειγμάτων και η ρύθμιση του pH του θρεπτικού μέσου κατά τη διάρκεια των ανανεώσεων πραγματοποιήθηκε σε pHμετρο (WTW pH Meter 526).

2.6. Μελέτη του *Salmonella* Enteritidis ως προς το βαθμό προσκόλλησης και εσωτερικοποίησης στην επιφάνεια φυτικού ιστού

Με σκοπό τη μελέτη του *Salmonella* ως προς το βαθμό προσκόλλησης και εσωτερικοποίησης του, λαχανικά εμβολιάστηκαν με το βακτηριακό στέλεχος και ακολούθησε καταμέτρηση των ολικών (total), προσκολλημένων (attached) και εσωτερικοποιημένων (internalized) κυττάρων *Salmonella* spp.. Τα κύτταρα του *Salmonella* spp υπέστησαν προσαρμογή σε τέσσερα διαφορετικά είδη ήπιων καταπονήσεων. Επίσης εξετάστηκε σε τι βαθμό επηρεάζει το επίπεδο του εμβολίου την προσκόλληση και εσωτερικοποίηση στα φυλλώδη λαχανικά. Συγκεκριμένα, επιλέχτηκε στέλεχος του παθογόνου μικροοργανισμού και εμβολιάστηκε με την μέθοδο της εμβάπτισης (3-7 log CFU/g) σε τέσσερα λαχανικά. Ο παθογόνος μικροοργανισμός που επιλέχθηκε ήταν ο *S. Enteritidis*. Ο εμβολιασμός έγινε σε σπανάκι, μαρούλι, ιταλικά χόρτα και ρόκα, τα οποία στην συνέχεια επώαστηκαν είτε στους 5 °C είτε στους 20 °C για 2 h και 48 h. Η διαδικασία προσδιορισμού των ολικών, προσκολλημένων και εσωτερικοποιημένων κυττάρων αναφέρεται αναλυτικά παραπάνω (βλέπε 2.5.2.2).

2.7. Μέθοδοι έκθεσης σε συνθήκες ήπιων καταπονήσεων

Στην παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εφαρμόστηκαν τέσσερα διαφορετικά είδη προσαρμογής ήπιας καταπόνησης καθώς και πειράματα μαρτύρα τα οποία δεν είχαν υποστεί κάποια μορφής καταπόνηση (non adapted). Δεδομένης της έκθεσης του περιβάλλοντος των φυλλωδών λαχανικών σε συνθήκες έλλειψης θρεπτικών συστατικών, συνθήκες ψύχους, ήπιας όξινης έκθεσης και τέλος ξήρανσης για τον παθογόνο μικροοργανισμό, τα πειράματα αυτά διεξήχθησαν με σκοπό να προσομοιάσουν τις ανάλογες συνθήκες, εργαστηριακά και να οδηγήσουν στην εξαγωγή συμπερασμάτων που αφορούν την ήπια καταπόνηση των παραπάνω λαχανικών ευρείας κατανάλωσης. Η προσαρμογή του *Salmonella* Enteritidis σε συνθήκες ήπιων καταπονήσεων όπου εφαρμόστηκαν στα τέσσερα διαφορετικά

λαχανικά (σπανάκι, μαρούλι, ιταλικά χόρτα και ρόκα) ήταν η ήπια όξινη καταπόνηση, η ήπια καταπόνηση ψύχους, η ήπια καταπόνηση έλλειψης θρεπτικών συστατικών και η ήπια καταπόνηση ξήρανσης.

2.7.1. Προσαρμογή όξινης καταπόνησης

Μετά τη πρώτη καλλιέργεια σε θρεπτικό υλικό Tryptone Soy Broth (TSB), ακολουθήθηκε επανακαλλιέργεια του μικροοργανισμού σε TSB εμπλουτισμένο με 1% γλυκόζη. Για την επανακαλλιέργεια χρησιμοποιήθηκε 0.1ml της πρώτης καλλιέργειας, το οποίο εμβολίασε 10ml TSB-1% γλυκόζη. Κύτταρα στατικής φάσης (10^7 CFU/ml) επωάστηκαν για 24h στους 37°C όπου μεταβολικά προέκυψε pH 4.8. Μετά το πέρας των παραπάνω ωρών έγινε φυγοκέντρηση της καλλιέργειας, έκπλυσή της και επανεώρηση σε διάλυμα Ringer, έτοιμο προς ενοφθαλμισμό.

2.7.2. Προσαρμογή καταπόνησης ψύχους

Μετά τη δεύτερη καλλιέργεια (επανακαλλιέργεια) και την έκπλυσή της ακολούθησε επανεώρηση σε 10ml TSB. Κύτταρα στατικής φάσης (10^9 CFU/ml) επωάστηκαν για 168h στους 4°C στο θρεπτικό υπόστρωμα TSB. Τέλος, έλαβε χώρα φυγοκέντρηση, έκπλυση και απανεώρηση σε διάλυμα Ringer, έτοιμο προς ενοφθαλμισμό.

2.7.3. Προσαρμογή καταπόνησης έλλειψης θρεπτικών συστατικών

Μετά τη δεύτερη καλλιέργεια (επανακαλλιέργεια) και την έκπλυσή της ακολούθησε επανεώρηση σε 10ml που περιείχε 0,85% NaCl (pH 6.6). Κύτταρα στατικής φάσης (10^9 CFU/ml) επωάστηκαν για 48h στους 37°C. Ακολούθησε φυγοκέντρηση, έκπλυση και απανεώρηση σε διάλυμα Ringer, έτοιμο προς ενοφθαλμισμό.

2.7.4. Προσαρμογή καταπόνησης ξήρανσης

Μετά τη δεύτερη καλλιέργεια (επανακαλλιέργεια) και την έκπλυσή της ακολούθησε επανεώρηση σε 2ml διαλύματος Ringer. Τα 2 ml διαλύματος περιέχοντος και του μικροοργανισμού κατανεμήθηκαν σε 30 σταγόνες 0,06 ml επάνω σε πλαστική επιφάνεια τρυβλίων petri.



Εικόνα 2.3. Εμβόλιο του *Salmonella Enteritidis* μετά την αφυδάτωση κατά τη διάρκεια της προσαρμογής σε καταπόνηση ξήρανσης.

Κύτταρα στατικής φάσης (10^9 CFU/ml) υπέστησαν ξήρανση για 1.5h στους 42°C και επώαστηκαν για 96h στους 21°C . Μετά το πέρας των τεσσάρων ημερών, τα καταπονημένα από την ξήρανση κύτταρα-αφυδατωμένα, ενυδατώθηκαν προσθέτοντας 3ml διαλύματος Ringer ανά τρυβλίο καθιστώντας τα έτοιμα προς ενοφθαλμισμό.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

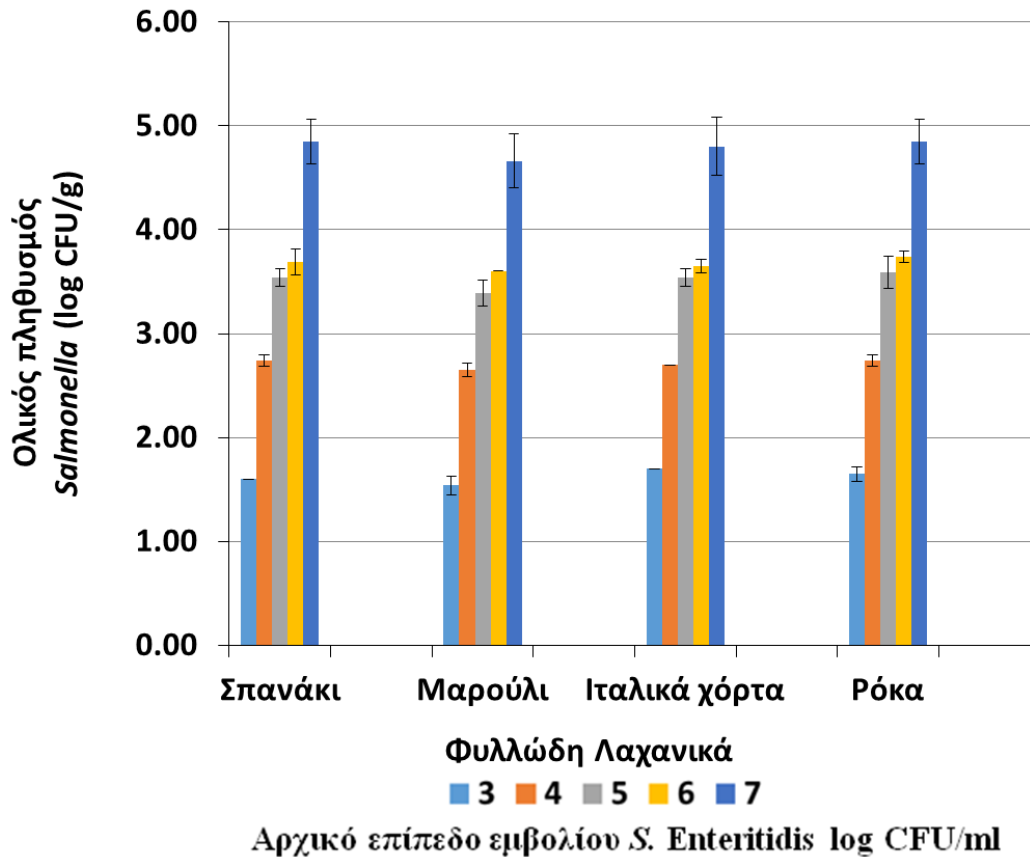
3.1. Βαθμός προσκόλλησης και εσωτερικοποίησης του *Salmonella* Enteritidis σε φυλλώδη λαχανικά

Για τη μελέτη της ικανότητας προσκόλλησης και εσωτερικοποίησης του παθογόνου *S. Enteritidis* σε φυλλώδη λαχανικά σε προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου (Χιλιάι Νικολίν 2015, Αποστολίδου Ζωή 2015) χρησιμοποιήθηκαν μαρούλι, βλίτα, σπανάκι, ιταλικά χόρτα και ρόκα τα οποία εμβολιάστηκαν με τη μέθοδο της εμβάπτισης με χρήση εμβολίου συγκέντρωσης 7 log CFU/mL. Στη συνέχεια συντηρήθηκαν υπό αερόβιες συνθήκες σε θερμοκρασία 5 °C και 20 °C για 2 h και 48 h. Συντήρηση των εμβολιασμένων λαχανικών είχε ως αποτέλεσμα την ανάκτηση παρόμοιου ολικού πληθυσμού *S. Enteritidis* στα λαχανικά. Συγκεκριμένα, ο πληθυσμός τους κυμαινόταν από 5 έως 6 log CFU/g, ανεξαρτήτως θερμοκρασίας. Σε ότι αφορά τον πληθυσμό των εσωτερικοποιημένων κυττάρων, κυμαινόταν από 3 έως 5 log CFU/g και εξαρτόταν από το είδος του λαχανικού καθώς και από τις συνθήκες συντήρησης τους. Η επίδραση του είδους του λαχανικού στο βαθμό εσωτερικοποίησης του *Salmonella* spp. επιβεβαιώνεται και από έρευνες των Klercks *et al.* (2004), που δείχνουν διαφορετική αλληλεπίδραση μεταξύ των εμπορικά διαθέσιμων ποικιλιών μαρουλιού και της επιβίωσης των *S. enterica*, καθώς ήταν ικανοί να εποικίσουν το μαρούλι επιφυτικά αλλά μόνο η *S. enterica serovar* Dublin ήταν ικανή να εποικίζει τα φυτά και ενδοφυτικά. Επίσης, σύμφωνα με τους Krupitski *et al.*, (2009) παρατηρήθηκε διαφορετικός βαθμός εσωτερικοποίησης στα διάφορα είδη λαχανικών.

3.1.1. Ικανότητα προσκόλλησης και εσωτερικοποίησης διαφορετικών επιπέδων εμβολίου του *S. Enteritidis* σε φυλλώδη λαχανικά

Στην παρούσα μελέτη, με σκοπό τη διερεύνηση της επίδρασης του ύψους του αρχικού εμβολίου του *S. Enteritidis* στην εσωτερικοποίηση του παθογόνου σε διαφορετικά φυλλώδη λαχανικά, ρόκα, μαρούλι, ιταλικά χόρτα και σπανάκι εμβολιάστηκαν με 3, 4, 5, 6 και 7 log CFU/mL *S. Enteritidis*. Στη συνέχεια συντηρήθηκαν υπό αερόβιες συνθήκες σε θερμοκρασία 5 °C και 20 °C για 2 h και 48 h. Πραγματοποιήθηκαν καταμετρήσεις πληθυσμών του παθογόνου μικροοργανισμού αμέσως μετά τον εμβολιασμό των λαχανικών (ολικός πληθυσμός, δηλαδή προσκολλημένα και εσωτερικοποιημένα βακτηριακά κύτταρα) καθώς επίσης και μετά την εξυγίανση των φυλλικών επιφανειών με νιτρικό άργυρο (βλέπε 2.5.2.2.β), ώστε να καταμετρηθεί ο εσωτερικοποιημένος πληθυσμός του παθογόνου.

Συμφώνα με το Γράφημα 3.1. ο ολικός πληθυσμός του *S. Enteritidis* που καταμετρήθηκε αμέσως μετά τον εμβολιασμό ανερχόταν στους 1,5-2,5 log CFU/g χαμηλότερα του αρχικού επιπέδου εμβολιασμού σε όλα τα είδη λαχανικών. Πιο συγκεκριμένα μετά τον εμβολιασμό με *S. Enteritidis* 3, 4, 5, 6, και 7 log CFU/g ανακτήθηκε από το εκάστοτε λαχανικό πληθυσμός 1,5 log CFU/g, 2,7 log CFU/g, 3,5 log 3,7 log CFU/g και 4,7 log CFU/g αντίστοιχα. Μεταξύ των διαφορετικών λαχανικών δεν παρουσιάστηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ($P>0.05$) στον αρχικό ολικό πληθυσμό του παθογόνου.



Γράφημα 3.1: Διαγραμματική απεικόνιση του ολικού πληθυσμού (log CFU/g) του *S. Enteritidis* που απαντώνται στα λαχανικά (σπανάκι, μαρούλι, ρόκα, ιταλικά χόρτα). Τα επίπεδα των διαφορετικών εμβολίων επισημαίνονται με διαφορετικό χρώμα: 3 log CFU/g (γαλάζιο), 4 log CFU/g (πορτοκαλί), 5 log CFU/g (γκρι), 6 log CFU/g (κίτρινο) και 7 log CFU/g (μπλε), ενώ οι γραμμές σφάλματος αντιστοιχούν στην τυπική απόκλιση μεταξύ των επαναλήψεων (n=2).

Συμφώνα με το Γράφημα 3.2. Σε ό,τι αφορά τον εσωτερικοποιημένο πληθυσμό των κυττάρων που καταμετρήθηκαν με βάση τα πέντε διαφορετικά επίπεδα εμβολίου σε όλα τα είδη λαχανικών δεν παρουσιάστηκαν ουσιαστικές διαφορές στους 5 °C και 20 °C στις 2 h επώασης. Αντιθέτως παρουσιάστηκαν διαφορές στους 5 °C και 20 °C για επώαση 48 h. Επίσης παρουσιάστηκε ομοιότητα των αποτελεσμάτων στους 5 °C για 48 h επώασης με εκείνα των 5 °C για 2 h επώαση, δεδομένου του εμποδίου που προκύπτει στην ανάπτυξη του παθογόνου μικροοργανισμού *S. Enteritidis*, λόγω της χαμηλής θερμοκρασίας. Παράλληλα παρατηρήθηκε αύξηση του εσωτερικοποιημένου πληθυσμού του μικροοργανισμού στους 20 °C για επώαση 48 h. Όσον αφορά την επίδραση που είχε το επίπεδο εμβολίου παρατηρήθηκε μεγαλύτερη εσωτερικοποίηση

στα επίπεδα εμβολίου 3 έως 5 log CFU/mL σε όλα τα είδη λαχανικών. Τέλος παρουσιάστηκε σταθερότητα (πλατό) στο βαθμό εσωτερικοποίησης από το επίπεδο εμβολίου 5 έως το 7 log CFU/mL σε όλα τα λαχανικά.

Συγκεκριμένα στη ρόκα παρατηρήθηκε όμοια συμπεριφορά των πέντε επίπεδων εμβολίου ως προς το βαθμό εσωτερικοποίησης στους 5 °C και 20 °C για 2 h επώαση φτάνοντας τους 2 log CFU/g λιγότερο του αρχικού εμβολίου. Με μικρή διαφορά φαίνεται να ευνοείται η εσωτερικοποίηση στους 5 °C για επώαση 48 h. Με αυξανόμενο αλλά και σταθερό ρυθμό κυμάνθηκε ο πληθυσμός των κυττάρων που βρέθηκε μέσα στο φυτικό ιστό στους 20 °C για επώαση 48 h αγγίζοντας μόλις τον 1 log CFU/g λιγότερο του αρχικού εμβολίου. Σε αυτή τη περίπτωση δε μιλάμε μόνο για εσωτερικοποίηση αλλά και για αύξηση του εσωτερικοποιημένου πληθυσμού λόγω ευνοϊκών συνθηκών.

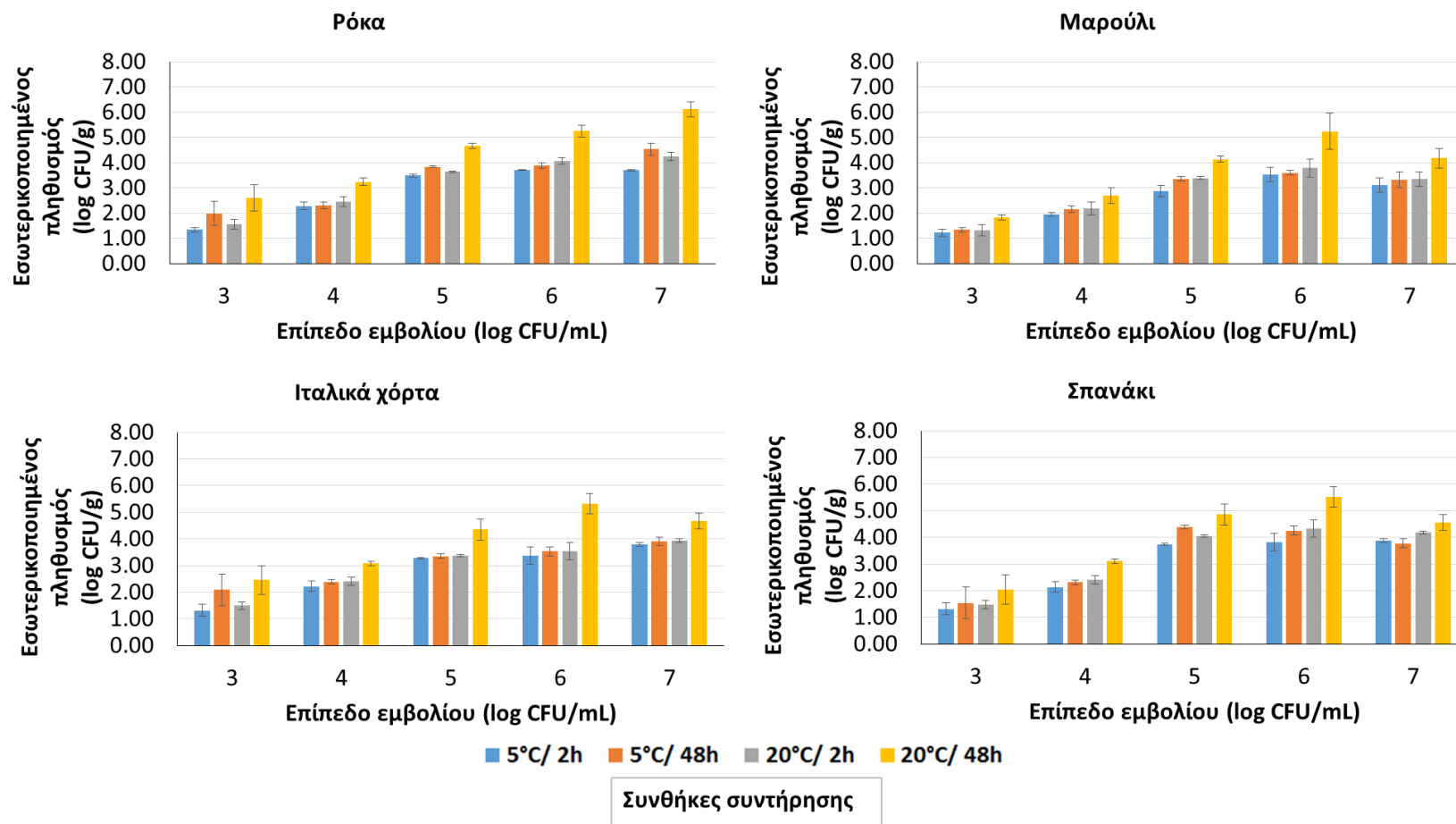
Παρόμοια εικόνα έχουμε και στα ιταλικά χόρτα με την διαφορά ότι παρατηρείται μικρής μορφής πλατό. Παρατηρήθηκε όμοια συμπεριφορά των πέντε επίπεδων εμβολίου ως προς το βαθμό εσωτερικοποίησης στους 5 °C και 20 °C για 2 h επώαση φτάνοντας τους 2 log CFU/g λιγότερο του αρχικού εμβολίου. Με μικρή διαφορά φαίνεται να ευνοείται η εσωτερικοποίηση στους 5 °C για επώαση 48 h κυρίως στους 3 log CFU/mL αρχικού εμβολίου. Με αυξανόμενο αλλά και σταθερό ρυθμό κυμάνθηκε ο πληθυσμός των κυττάρων που βρέθηκε μέσα στο φυτικό ιστό στους 20 °C για επώαση 48 h αγγίζοντας μόλις τον 1 log CFU/g λιγότερο του αρχικού εμβολίου από τους 3 log CFU/mL έως 5 log CFU/mL αρχικού εμβολίου, ενώ από 5 log CFU/mL έως 7 log CFU/mL αρχικού εμβολίου παρατηρήθηκε σταθεροποίηση, μιλώντας όχι μόνο για εσωτερικοποίηση αλλά και για αύξηση του εσωτερικοποιημένου πληθυσμού λόγω ευνοϊκών συνθηκών.

Εν συνεχεία όμοια εικόνα παρατηρούμε στο Σπανάκι με την μορφή του πλατό να γίνεται πιο ξεκάθαρη ακόμη και στους 5 °C και στους 20 °C για 2 h και 48 h. Παρατηρήθηκε όμοια συμπεριφορά των πέντε επίπεδων εμβολίου ως προς το βαθμό εσωτερικοποίησης στους 5 °C και 20 °C για 2 h επώαση φτάνοντας τους 2 log CFU/g λιγότερο του αρχικού εμβολίου. Με μικρή διαφορά φαίνεται να ευνοείται η εσωτερικοποίηση στους 5 °C για επώαση 48 h σε αρχικό εμβόλιο 5 log CFU/mL. Με αυξανόμενο αλλά και σταθερό ρυθμό κυμάνθηκε ο πληθυσμός των κυττάρων που βρέθηκε μέσα στο φυτικό ιστό στους 20 °C για επώαση 48 h αγγίζοντας μόλις τον 1 log CFU/g λιγότερο του αρχικού εμβολίου από τους 3 log CFU/mL έως 5 log CFU/mL αρχικού εμβολίου, ενώ από 5 log CFU/mL έως 7 log CFU/mL αρχικού

εμβολίου παρατηρήθηκε σταθεροποίηση, παρατηρώντας εσωτερικοποίηση αλλά και αύξηση του εσωτερικοποιημένου πληθυσμού λόγω ευνοϊκών συνθηκών.

Τέλος παρατηρήθηκε στο Μαρούλι όμοια συμπεριφορά των πέντε επίπεδων εμβολίου ως προς το βαθμό εσωτερικοποίησης στους 5 °C και 20 °C για 2 h επώαση φτάνοντας τους 2 log CFU/g λιγότερο του αρχικού εμβολίου. Στα ίδια επίπεδα κινήθηκε η εσωτερικοποίηση στους 5 °C για επώαση 48 h. Με αυξανόμενο αλλά και σταθερό ρυθμό κυμάνθηκε ο πληθυσμός των κυττάρων που βρέθηκε μέσα στο φυτικό ιστό στους 20 °C για επώαση 48 h αγγίζοντας τους 2 log CFU/g λιγότερο του αρχικού εμβολίου από τους 3 log CFU/mL έως 5 log CFU/mL αρχικού εμβολίου, ενώ από 5 log CFU/mL έως 7 log CFU/mL αρχικού εμβολίου παρατηρήθηκε σταθεροποίηση, αύξηση του εσωτερικοποιημένου πληθυσμού λόγω ευνοϊκών συνθηκών.

Με βάση τα προαναφερθέντα αποτελέσματα και την ικανότητα εσωτερικοποίησης και ανάπτυξης του *S. Enteritidis* τα λαχανικά κατατάσσονται ως εξής: Ρόκα > Ιταλικά χόρτα > Σπανάκι > Μαρούλι. Ο σχετικά μεγάλος βαθμός εσωτερικοποίησης που παρουσιάστηκε στη ρόκα ήταν σύμφωνος με τα αποτελέσματα των πειραμάτων συνεστιακής μικροσκοπίας των Kroupitski *et al.*, (2009) και Goldberg *et al.*, (2011), η ρόκα παρουσίασε το δεύτερο μεγαλύτερο βαθμό εσωτερικοποίησης σε σύγκριση με διάφορα είδη μαρουλιού και με το μαϊντανό.



Γράφημα 3.2 : Εσωτερικοποιημένος πληθυσμός του *S. Enteritidis* (log CFU/g) συναρτήσεως του αρχικού επιπέδου του εμβολίου στα τέσσερα φυλλώδη λαχανικά μετά από αποθήκευση στους 5 °C για 2 h (μπλε) και 48 h (πορτοκαλί) όπως και στους 20 °C για 2 h (γκρι) και για 48 h (κίτρινο).

3.1.2. Προσαρμογή του *S. Enteritidis* σε συνθήκες ήπιων καταπονήσεων

Με στόχο τη μελέτη επίδρασης της προσαρμογής του παθογόνου μικροοργανισμού *S. Enteritidis* σε συνθήκες ήπιων καταπονήσεων, στον βαθμό εσωτερικοποίησης του παθογόνου σε φυλλώδη λαχανικά, ο παθογόνος μικροοργανισμός εκτέθηκε σε τέσσερα (4) είδη ήπιων καταπονήσεων.

Όξινη καταπόνηση (acid stress): προσομοιάζοντας έτσι το περιβάλλον κάποιας μορφής απολυμαντικού (φωσφορικά, νιτρικά, υδροχλωρικά ανόργανα οξέα), που πιθανότατα χρησιμοποιείται στην εξυγίανση του προϊόντος ή στην απολύμανση επιφανειών της βιομηχανίας. Στην παρούσα μελέτη η προσαρμογή του μικροοργανισμού σε όξινες συνθήκες πραγματοποιήθηκε σε εργαστηριακό θρεπτικό υλικό TSB εμπλουτισμένο με 1% γλυκόζη στους 37 °C για 24h. Στο τέλος της επώασης το pH του μέσου μειωνόταν στο 4,8 εξαιτίας των μεταβολικών προϊόντων του μικροοργανισμού. .

- **Ψυχρή καταπόνηση (cold stress):** προσομοιάζοντας το περιβάλλον χαμηλών θερμοκρασιών που πιθανότατα χρησιμοποιείται για την συντήρηση των λαχανικών (πχ 4°C). Για το λόγω αυτό, η καταπόνηση ψύχους πραγματοποιήθηκε στους 4 °C σε εργαστηριακό θρεπτικό υλικό TSB για 7 ημέρες, τόσες όσες συντηρείται στην αγορά ένα ανάλογο ευπαθές προϊόν, υπό ασηπτικές συνθήκες.
- **Καταπόνηση έλλειψης θρεπτικών συστατικών (starvation stress):** προσομοιάζοντας το περιβάλλον κάποιας μορφής συσκευασίας που ενδεχομένως χρησιμοποιείται στην διατήρηση της φρεσκάδας του προϊόντος αποφεύγοντας την αλλοίωση από την ανάπτυξη μικροοργανισμών. Για το λόγω αυτό, η καταπόνηση έλλειψης θρεπτικών συστατικών πραγματοποιήθηκε στους 37 °C σε εργαστηριακό διάλυμα 0,85% NaCl του οποίου το pH καταμετρούταν στο 6,6 υπό ασηπτικές συνθήκες (Leenanon and Drake., 2001).
- **Καταπόνηση ξήρανσης (desiccation stress):** προσομοιάζοντας έτσι το περιβάλλον κάποιας μορφής απομάκρυνσης περισσευούμενης υγρασίας που πιθανότατα χρησιμοποιείται στη συντήρηση του προϊόντος αποτρέποντας την πρόωμη ωρίμανση του λαχανικού ή τον καθαρισμό βιομηχανικών επιφανειών. Για το λόγω αυτό, η καταπόνηση ξήρανσης πραγματοποιήθηκε στους 21 °C για 4 ημέρες, σε εργαστηριακό διάλυμα Ringer που περιείχε το μικροοργανισμό του οποίου επήλθε αφυδάτωση λόγω της παραμονής στους 42 °C για 1,5 ώρες, υπό ασηπτικές συνθήκες (Gruzdev *et al.*, 2011).

Συμφώνα με το Γράφημα 3.3. σε ό,τι αφορά τον πληθυσμό των ολικών κυττάρων που καταμετρήθηκαν, αμέσως μετά τον ενοφθαλμισμό των φυλλωδών λαχανικών με τα τέσσερα διαφορετικά εμβόλια τα οποία είχαν υποστεί ήπιας μορφής καταπόνηση, ανερχόταν στους 1,60 με 1,87 log CFU/g κάτω του αρχικού επιπέδου εμβολιασμού που ήταν 3 log CFU/mL σε όλα τα είδη λαχανικών.

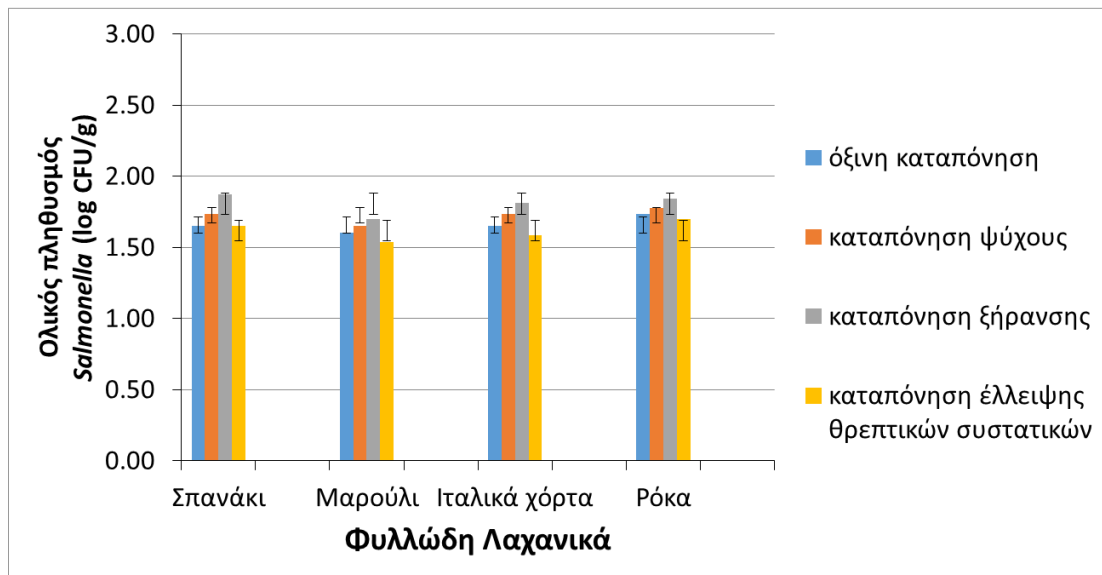
Συγκεκριμένα μεγαλύτερος ολικός πληθυσμός καταμετρήθηκε στη περίπτωση που τα κύτταρα του μικροοργανισμού είχαν υποστεί ήπια καταπόνηση ξήρανσης με την μεγαλύτερη ένδειξη να παρατηρείται στο σπανάκι με 1,87 log CFU/g, ακλουθούσε η ρόκα με 1,85 log CFU/g, έπειτα τα ιταλικά χόρτα με 1,81 log CFU/g και τέλος το μαρούλι με 1,7 log CFU/g.

Στη συνέχεια ακλούθησε η περίπτωση που το εμβόλιο είχε υποστεί ήπια καταπόνηση ψύχους με την μεγαλύτερη ένδειξη να παρατηρείται στη ρόκα με 1,78 log CFU/g, ακλουθούσε το σπανάκι και τα ιταλικά χόρτα με μέτρηση 1,74 log CFU/g και τέλος το μαρούλι με 1,65 log CFU/g.

Επόμενη στη σειρά με βάση τη καταμέτρηση ήταν η περίπτωση όπου το εμβόλιο είχε υποστεί ήπια όξινη καταπόνηση με την μεγαλύτερη ένδειξη να παρατηρείται στη ρόκα με 1,74 log CFU/g, ακλουθούσε το σπανάκι και τα ιταλικά χόρτα με μέτρηση 1,65 log CFU/g και τέλος το μαρούλι με 1,60 log CFU/g.

Με μικρή διαφορά η επόμενη σε κατάταξη περίπτωση όπου το εμβόλιο είχε υποστεί ήπια καταπόνηση έλλειψης θρεπτικών συστατικών με την μεγαλύτερη ένδειξη να παρατηρείται στη ρόκα με 1,70 log CFU/g, ακλουθούσε το σπανάκι με 1,65 log CFU/g, έπειτα τα ιταλικά χόρτα με 1,59 log CFU/g και τέλος το μαρούλι με 1,54 log CFU/g.

Σύμφωνα με τα παραπάνω με βάση το είδος του λαχανικού μεγαλύτερη μέτρηση προέκυψε στη ρόκα, ακολούθησε το σπανάκι, στη συνέχεια τα ιταλικά χόρτα και τέλος το μαρούλι.



Γράφημα 3.3: Διαγραμματική απεικόνιση του ολικού πληθυσμού (log CFU/g) του *S. Enteritidis* που απαντώνται στα λαχανικά (σπανάκι, μαρούλι, ρόκα, ιταλικά χόρτα) με βάση τα είδη των διαφορετικών καταπονήσεων όπου επισημαίνονται με διαφορετικό χρώμα: ήπια όξινη καταπόνηση (μπλε), ήπια καταπόνηση ψύχους (πορτοκαλί), ήπια καταπόνηση ξήρανσης (γκρι) και ήπια καταπόνηση έλλειψης θρεπτικών συστατικών (κίτρινο), ενώ οι γραμμές σφάλματος αντιστοιχούν στην τυπική απόκλιση μεταξύ των επαναλήψεων (n=2).

Στην μελέτη εξετάστηκε η επίδραση που έχει το είδος της προσαρμογής ήπιας καταπόνησης στα τέσσερα φυλλώδη λαχανικά στην επιβίωση, προσκόλληση και εσωτερικοποίηση του παθογόνου μικροοργανισμού *S. Enteritidis*. Αρχικά με κοινή βάση το ίδιο επίπεδο εμβολίου (3 log CFU/mL) είτε επρόκειτο για κάποιας μορφής ήπια καταπόνηση είτε για μη προσαρμοσμένα κύτταρα *S. Enteritidis*.

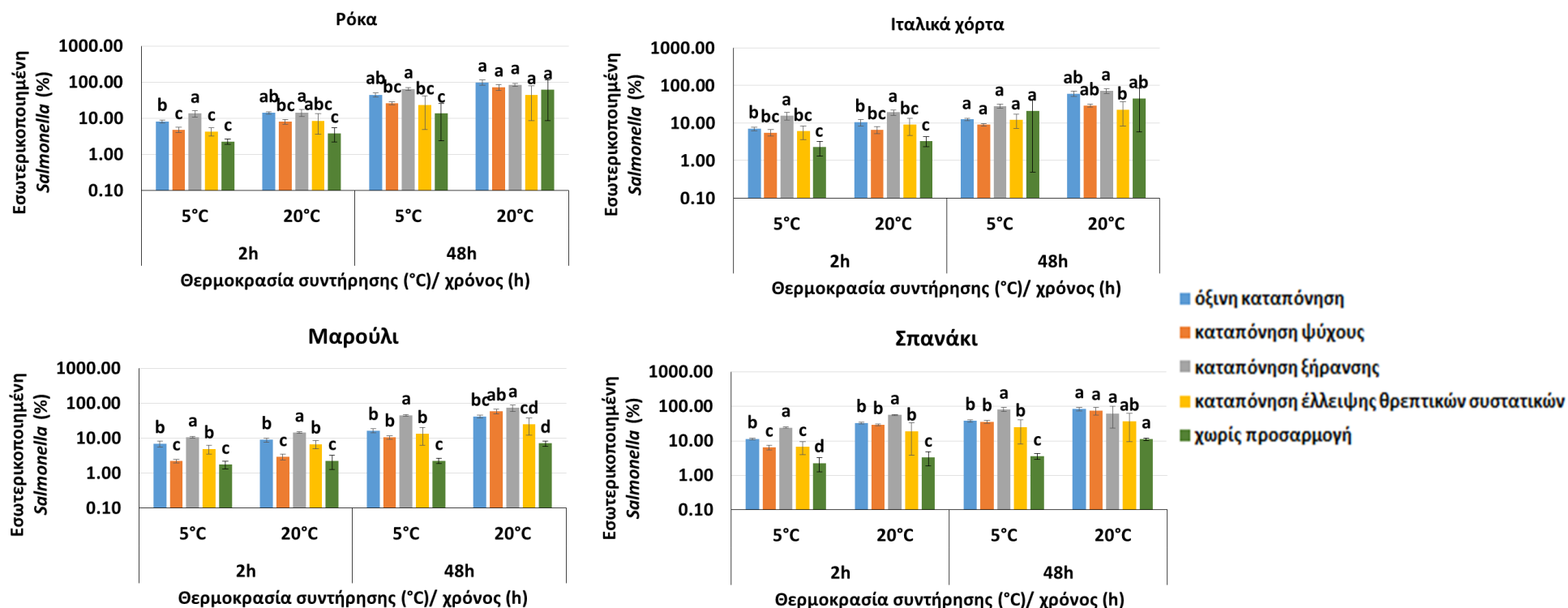
Διεξήχθη εξυγίανση των φυλλικών επιφανειών μετά από κάθε πειραματική διαδικασία επώασης. Αυτό σημαίνει πως η εικόνα που έχουμε είναι για τα κύτταρα του παθογόνου μικροοργανισμού που εσωτερικοποιήθηκαν στα ενδότερα στρώματα των φύλλων μέσω των στομάτων, αμυχών καθώς και των κοψιμάτων. Το φαινόμενο αυτό της εσωτερικοποίησης μέσω των στομάτων, αμυχών καθώς και των κοψιμάτων επιβεβαιώνεται από πρόσφατες μελέτες (Van der Linden *et al.*, 2016).

Συγκεκριμένα φαίνεται πως τα είδη προσαρμογής ήπιων καταπονήσεων του παθογόνου μικροοργανισμού ευνόησαν την εσωτερικοποίηση του στα φυλλώδη λαχανικά σε σχέση με τα κύτταρα του παθογόνου μικροοργανισμού που δεν είχε υποστεί καμία προσαρμογή. Κάτι τέτοιο έγινε σε διαφορετικό βαθμό ανάλογα με το

είδος προσαρμογής καθώς το επίπεδο εμβολίου ήταν σε όλες τις περιπτώσεις ίδιο (3 log CFU/mL).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του Γραφήματος 3.4. , η συντήρηση των λαχανικών για 2 h στους 5 °C είχε ως αποτέλεσμα ο εσωτερικοποιημένος πληθυσμός και για τα τέσσερα είδη προσαρμογής να ανέρχεται στους 2,2-2,5 log CFU/g ενώ στους 20 °C να είναι περίπου 2,5-2,9 log CFU/g ($P < 0.05$). Περαιτέρω παραμονή των λαχανικών στους 5 °C για 48 h είχε ως αποτέλεσμα μια αύξηση της τάξεως του 1.0-1.5 log CFU/g του εσωτερικοποιημένου πληθυσμού ($P < 0.05$). Επίσης, η παραμονή των λαχανικών στους 20 °C για 48 h οδήγησε σε αύξηση του εσωτερικοποιημένου πληθυσμού αυξήθηκε κατά 1.0 log CFU/g αγγίζοντας έτσι το αρχικό επίπεδο εμβολίου ($P < 0.05$). Σε μελέτη των Lianou και Koutsoumanis, (2012) αναφέρεται ότι η επίδραση των περιβαλλοντικών συνθηκών επιδρά στην ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίων των στελεχών του *S. enterica* με αποτέλεσμα σε υψηλότερες θερμοκρασίες (25 °C) να αυξάνεται και η ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίων σε σχέση με άλλες χαμηλότερες. Ενδεχομένως, κάτι αντίστοιχο να συμβαίνει και με το βαθμό εσωτερικοποίησης του παθογόνου όπου είναι σχετικά υψηλότερος στη θερμοκρασία των 20 °C.

Παράλληλα φαίνεται να ευνοείται η εσωτερικοποίηση λόγω προσαρμογής σε συνθήκες ήπιας καταπόνησης ξήρανσης του εμβολίου όπου διέφερε στατιστικά σημαντικά σε όλες τις περιπτώσεις, 5 °C και 20 °C για 2 h και 48 h για όλα τα είδη λαχανικών . Στη συνέχεια ακολουθεί η ήπια όξινη καταπόνηση με ελάχιστα μικρότερο βαθμό εσωτερικοποίησης και πολύ κοντά η ήπια καταπόνηση ψύχους όπου δε διέφεραν στατιστικά σημαντικά. Τέλος μικρότερη συγκριτικά εσωτερικοποίηση σε σχέση με τις προηγούμενες προσαρμογές παρουσίασε η ήπια καταπόνηση έλλειψης θρεπτικών συστατικών. Όλες οι προσαρμογές επέφεραν μεγαλύτερο βαθμό εσωτερικοποίησης σε σχέση με το εμβόλιο το οποίο δεν είχε υποστεί καμία έκθεση σε συνθήκες ήπιας καταπόνησης που οδηγούν σε ενεργοποίηση-επαγωγή μηχανισμών προσαρμογής.



Γράφημα 3.4. : Διαγραμματική απεικόνιση εσωτερικοποιημένου πληθυσμού (% του αρχικού εμβολίου), μη προσαρμοσμένου σε ήπιες συνθήκες καταπόνησης *S. Enteritidis* (πράσινο χρώμα) σε τέσσερα φυλλώδη λαχανικά (σπανάκι, μαρούλι, ρόκα, ιταλικά χόρτα) μετά από αποθήκευση σε 5°C και 20°C για 2h και 48h. Τα είδη των διαφορετικών καταπονήσεων επισημαίνονται με διαφορετικό χρώμα: ήπια όξινη καταπόνηση (μπλε), ήπια καταπόνηση ψύχους (πορτοκαλί), ήπια καταπόνηση ξήρανσης (γκρι) και ήπια καταπόνηση έλλειψης θρεπτικών συστατικών (κίτρινο). Η στατιστική ανάλυση εντός των ίδιων πληθυσμών απεικονίζονται με γράμματα, όπου οι περιπτώσεις που δεν έχουν κοινό κάποιο γράμμα διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά ($p < 0.05$) ενώ οι γραμμές σφάλματος αντιστοιχούν στην τυπική απόκλιση μεταξύ των επαναλήψεων ($n=4$).

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα μελέτη επιβεβαιώθηκε το φαινόμενο της εσωτερικοποίησης του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella* spp. στα φυλλώδη λαχανικά. Η ικανότητα εσωτερικοποίησης του παθογόνου διαφέρει ανάλογα με το είδος του λαχανικού. Μεταξύ των λαχανικών που εξετάστηκαν το μεγαλύτερο βαθμό εσωτερικοποίησης παρουσίασαν η ρόκα, ακολούθως το σπανάκι και τα ιταλικά χόρτα ενώ το μικρότερο βαθμό εσωτερικοποίησης παρουσίαζε το μαρούλι. Η συντήρηση στη θερμοκρασία των 20 °C είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση του εσωτερικοποιημένου πληθυσμού ή/και την αύξηση του φαινομένου της εσωτερικοποίησης.

Αρχικά ο ολικός πληθυσμός του *S. Enteritidis* που καταμετρήθηκε αμέσως μετά τον εμβολιασμό ανερχόταν σε χαμηλότερα επίπεδα του αρχικού επιπέδου εμβολιασμού σε όλα τα είδη λαχανικών. Η χαμηλότερη αρχική συγκέντρωση ενοφθαλμισμού είχε ως αποτέλεσμα υψηλότερα ποσοστά εσωτερικοποίησης (%) του παθογόνου στα φυλλώδη λαχανικά. Η προσαρμογή των κυττάρων της σαλμονέλας σε συνθήκες ήπιων καταπονήσεων μπορεί να ενισχύσει την απόδοση της εσωτερικοποίησης στα λαχανικά. Τα κύτταρα του *Salmonella* spp. που έχουν υποστεί προσαρμογή σε αφυδάτωση-ξήρανση και σε ψύξη κατέδειξαν την υψηλότερη και τη χαμηλότερη ικανότητα εσωτερίκευσης, αντίστοιχα.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για περαιτέρω κατανόηση του φαινομένου της εσωτερικοποίησης καθώς και της επίδρασής του στη φυσιολογία του *Salmonella* spp. σε λαχανικά ευρείας κατανάλωσης δεδομένου ότι ο συγκεκριμένος παθογόνος μικροοργανισμός καθίσταται ιδιαίτερα επικίνδυνος λόγω: α) της χαμηλής μολυσματικής δόσης του (5-10 κύτταρα), β) της αναποτελεσματικότητας των συμβατικών μέσων εξυγίανσης έναντι των εσωτερικοποιημένων κυττάρων και γ) της πιθανής μεταβολής της φυσιολογίας του μικροοργανισμού (ανθεκτικότητα/ ευαισθητοποίηση) σε σχέση με το είδος του λαχανικού. Με τον τρόπο αυτό τελικά, θα ελαχιστοποιηθεί ο κίνδυνος ύπαρξης του παθογόνου σε τρόφιμα φυτικής προέλευσης και ως εκ τούτου θα μειωθεί και ο κίνδυνος προσβολής του τελικού καταναλωτή.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- **Adley, C., Dillon, C., Morris, C.P., Delappe, N., Cormican, M., (2011).** Prevalence of *Salmonella* in pig ear pet threats. *Food Research International*, 44, 193-197.
- **Alvarez-Ordóñez, A., Fernández, A., Bernardo, A., López, M., (2010).** Arginine and lysine decarboxylases and the acid tolerance response of *Salmonella* Typhimurium. *Int. J. Food Microbiol.* 136, 278–82. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2009.09.024.
- **An, Y.H. and Friedman, R.J., (1997).** Laboratory methods for studies of bacterial adhesion. *Journal of Microbiological Methods* 30:141-152.
- **An, Y.H. and Friedman, R.J., (1998).** Concise review of mechanism of bacterial adhesion to biomaterial surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials* 43:338-348.
- **Barry-Ryan, C., O'Beirne, D., (1998).** Quality and shelf-life of fresh cut carrot slices as affected by slicing method. *J. Food Sci.* 63 (5), 51–56.
- **Bearson, B. L., Wilson, L. & Foster, J. W. (1998).** A low pH inducible, PhoPQ dependent acid tolerance response protects *Salmonella* typhimurium against inorganic acid stress. *J. Bacteriol.* ,180, 2409–2417.
- **Benedict, R.C., Schultz, F.J., and Jones, S.B., (1991).** Attachment and removal of *Salmonella spp.* on meat and poultry tissues. *Journal of Food Safety* 11:135-148.
- **Berger C. N., Sodha, V. S. Shaw R. K., Griffin P. M., Pink D., Hand P., Frankel G. (2010).** Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. *Environmental Microbiology*, 12(9), 2385-2397.
- **Bernstein, N., Sela, S., Pinto, R., Ioffe, M., (2007).** Evidence for internalization of *Escherichia coli* into the aerial parts of maize via the root system. *J. Food Prot.* 70, 471–475.
- **Beuchat L. R. (1996).** Pathogenic microorganisms associated with fresh produce, *Journal of Food Protection*, 59; 204-216.

- **Beuchat L. R. (1998).** Surface decontamination of fruits and vegetables eaten raw: a review. *Center for Food Safety and Quality Enhancement*, University of Georgia USA.
- **Beuchat, L.R., (2002).** Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruit and vegetables. *Microbes and Infection* ,4, 413–423.
- **Bhunia, A.K (2008).** Foodborne microbial pathogens: Mechanisms and Pathogenesis. *United States of America: Springer Science + Business Media*, LLC.
- **Brenner W. F., Villar G. R., Angulo J. F., Tauxe R., Swaminathan B. (2000).** *Salmonella* Nomenclature. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(7), 2465-2467.
- **Brown, L., D. Gentry, T. Elliott, and M. Cashel. (2002).** DksA affects ppGpp induction of RpoS at a translational level. *J. Bacteriol.* 184:4455-4465.
- **Cox J., Hammack T. S., Andrews W. H. (1999).** *Salmonella*. *Encyclopedia of Food Microbiology*, 3, 1928-1947, Academic Press.
- **Cox, J. Salmonella-Introduction. (2000).** In: Robinson, R. K., Batt., C. A., Patel, P. D. (Eds.), *Encyclopedia of Food Microbiology* (pp.1928-1937). Academic Press, London.
- **Critzer, F.J and Doyle M.P., (2010).** Microbial ecology of foodborne pathogens associated with produce. *Current Opinion in Biotechnology*, **21**, 125-130.
- **D' Aoust, J.-Y. (1998).** *Salmonella* Species. In *Food Microbiology and Frontiers* (Doyle, M. P., Beuchat, L. R., and Montville, T. J., Eds.). ASM Press, Washington, DC.
- **Deering J. A., Mauer J. L., Pruitt E. R. (2012).** Internalization of *E.coli* O157:H7 and *Salmonella spp.* In plants:A review. *Food Research International*, 45, 567-575.
- **Deng X., Li Z., Zhang W. (2011).** Transcriptome sequencing of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis under desiccation and starvation stress in peanut oil. *Food Microbiology*.

- **Doyle, M.P. and Erickson, M.C, (2008).** Summer meeting 2007 - the problems with fresh produce: an overview. *Journal of Applied Microbiology*, **105**, 317-330.
- **DuPont, M.S., Mondin, Z., Williamson, G., Price, K.R., (2000).** Effect of variety, processing, and storage on the flavonoid glycoside content and composition of lettuce and endive. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**, 3957–3964.
- **EFSA-ECDC (2011).** The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2009. *The EFSA Journal*, **9**(3), 2090.
- **Fahey, J.W., Stephenson, K.K. (1999).** Cancer chemoprotective of cruciferous vegetables. *HortScience*, **34**, 1159-1163.
- **FAO Food and Agriculture Organization of the United Nations Committee on Agriculture/World Health Organization, (2008).** Microbiological Hazards in Fresh Fruits and Vegetables. Food Quality and Standards Service, Rome.
- **Firstenberg-Eden, R., Notermans, S., and Schothorst, M.V., (1978).** Attachment of certain bacterial strains to chicken and beef meat. *Journal of Food Safety* **1**:217-228.
- **Foster, J. W., and M. P. Spector. (1986).** Phosphate starvation regulon of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **166**:666-669
- **Frank, J.F., (2001).** Microbial attachment to food and food contact surfaces. *Advances in Food and Nutrition Research* **43**:319-370. 122 .
- **Fratamico, P.M., Schultz, F.J., Benedict, R.C., Buchanan, R.L., and Cooke, P.H., (1996).** Factors influencing attachment of *Escherichia coli* O157:H7 to beef tissues and removal using selected sanitizing rinses. *Journal of Food Protection* **59**:453-459.
- **Garrett, E. H., Gorny, J. R., Beuchat, L. R. et al. (2003).** Microbiological safety of fresh and fresh-cut produce: Description of the situation and economic impact. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **2**(Suppl), 13-19.
- **Garrett, T.R., Bhakoo, M., and Zhang, Z., (2008).** Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. *Progress in Natural Science* **18**:1049-1056.

- **Golberg, D., Kroupitski, Y., Belausov, E., Pinto, R., Sela, S., (2011).** *Salmonella* Typhimurium internalization is variable in leafy vegetables and fresh herbs. *Int. J. Food Microbiol.* 145, 250–257.
- **Gomes, C., Silva, P da, Moreira, R., Castell-Perez, E., Ellis, A., Pedlenton, M. (2009).** Understanding *E. coli* internalization in lettuce leaves for optimization of irradiation treatment. *International Journal of Food Microbiology*, 135, 238-247.
- **Goulter, R.M., Gentle, I.R., and Dykes, G.A., (2009).** Issues in determining factors influencing bacterial attachment: a review using the attachment of *Escherichia coli* to abiotic surfaces as an example. *Letters in Applied Microbiology* 49:1-7.
- **Grassl GA, (2008).** Pathogenesis of enteric *Salmonella* infections. *Curr Opin Gastroenterol.* , 24, 22-6.
- **Groisman, E. A. and Ochman H.,(1997).** How *Salmonella* became a pathogen. *Trends Microbiol*, 5, 343 -349.
- **Gruzdev N, Pinto R, Sela S (2011).** Effect of desiccation on tolerance of salmonella enterica to multiple stresses. *Environmental Microbiology*, 77, 1667-1673.
- **Guiney, D.G (1995).** The role of host cell death in *Salmonella* infections, *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 289, 131–150.
- **Hancock, R.D., Mcdougall, G.J., Stewart, D. (2007).** Berry fruit as "superfood": hope or hype. *Biologist*, 54(2), 73-79.
- **Hannes, D. (2003).** Nontyphoid *Salmonella*. In Henagariu, O. Heerema, N. A., Dlouhy, S. R., Vance, G. H., and Vogt, P. H. (Eds). *International handbook of foodborne pathogens*, p 137-149. New York: Marcel DeKker Inc.
- **Holst, B., Williamson, G. (2004).** A critical review of the bioavailability of glycosinolates and related compounds. *Natural Product Reports*, 21, 425-447.
- **Howard M. B., Hutcheson S. W. (2003).** Growth dynamics *Salmonella enterica* strains on alfalfa sprouts and in waste seed irrigation water. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(1), 548-553.
- **Hu L., Kopecko D. J. (2003).** Typhoid *Salmonella*. *International handbook of foodborne pathogens*, 151-165, Marcel Dekker Inc., New York.

- **Kaufmann, A. F., (1966).** Pets and *Salmonella* infection. J. Am. Vet. Med. Assoc. , 149, 1655-1661.
- **Kawashima, L.M., V. (2003).** Mineral profile of raw cooked leafy vegetables consumed in Southern Brazil. *Journal of Food Composition and Analysis*, 16, 605-611.
- **Kebede, B.T., Grauwet, T., Magpusao, J., Palmers, S., Michiels, C., Hendrickx, M., Van Loey, A., (2015).** Chemical changes of thermally sterilized broccoli puree during shelf life: Investigation of the volatile fraction by fingerprinting-kinetics. *Food Res. Int.* 67, 264–271.
- **Keck, A.S., Finley, J.W. (2004).** Cruciferous vegetables: cancer protective mechanisms of glucosinolate hydrolysis products and selenium. *Integrative Cancer Therapies*, 3, 5-12.
- **Kisiel, W., Zielinska, K., (2001).** Guaianolides from *Cichorium intybus* and structure revision of *Cichorium* sesquiterpene lactones. *Phytochemistry* 57, 523–527.
- **Klein, S., Tian, A., Witmer, J., De Waal, C.S., (2009).** The FDA Top Ten: The Riskiest Foods Regulated by the US Food and Drug Administration. The Center for Science in the Public Interest.
- **Klerks, M.M., Zijlstra, van Bruggen AH (2004).** Comparison of real-time PCR methods for detection of *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157:H7, and introduction of a general internal amplification control. , 59(3), *Journal of Microbiology Methods*.337-49.
- **Kroupitski, Y., Golberg, D., Belausov, E., Pinto, R., Swartzberg, D., Granot, D. and Sela, S., (2009).** Internalization of *Salmonella enterica* in leaves is induced by light and involves chemotaxis and penetration through open stomata. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 6076-6086.
- **Kunze D.J., Loneragan G.H., Platt T.M., Miller M.F., Besser T.E., Thomas E., Mohammad, Mindy M. (2008).** *Salmonella enterica* burden in harvest - Ready cattle oopulations from the Southern high plains of the United States. *Environmental Microbiology*, 74, 345-351.
- **Leenanon B. and Drake M. (2001).** Acid Stress, Starvation, and Cold Stress Affect Poststress Behavior of *Escherichia coli* O157:H7 and Nonpathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Food Protection*, 64, 970–974.

- **Lianou A. and Koutsoumanis K.P. (2013).** Evaluation of the strain variability of *Salmonella enterica* acid and heat resistance. *Food Microbiology*, 34(2), 259-67.
- **Lienemann T, Niskanen T, Guedes S, Siitonen A, Kuusi M, and Rimhanen-Finne R.(2011).** Iceberg lettuce as suggested source of a nationwide outbreak caused by two *Salmonella* serotypes, Newport and Reading, in Finland in 2008. *J Food Prot.*, 74:1035-40.
- **Liorach, R., A. Martinez-Sanchez, F.A. Tomas-Barberan, M.I. Gil and F. Ferreres, (2008).** Characterisation of polyphenols and antioxidant properties of five lettuce varieties and escarole. *Food Chem.*, 108: 1028-1038.
- **Marcus L. S., Brumell H. J., Pfeifer G. C., Finley B. B. (2000).** *Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages. *Microbes and Infection*, 2, 145-156.
- **Matthews, K.R. (2006).** Leafy Vegetables. In: Sapers, G.M, Solomon, E.B., Matthews, K.R.,(Eds), *The Produce Contamination Problem- Causes and Solutions*. Elsevier Oxford, pp165-188.
- **McMahon, M. A. S., Xu, J., Moore, J. E., Blair, I. S., & McDowell, D. A.,(2007).** Environmental stress and antibiotic resistance in food-related pathogens. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 211-217.
- **Merfort, I., (2002).** Review of the analytical techniques for sesquiterpenes and sesquiterpene lactones. *Journal of Chromatography* 967, 115–130.
- **Mikkelsen L.L, Naughton P.J, Hedemann M.S, Jensen B.B.(2004).** Effects of physical properties of feed on microbial ecology and survival of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in the pig gastrointestinal tract. *Appl Environ Microbiol.*, 6, 3485-92.
- **Mills, H. A. Date, (2001),** Vegetable Crops. Available at: <http://www.uga.edu/vegetable/home.html>. Accessed, 2007.
- **Monteville T.J., Mathews K.R. (2005).** Μικροβιολογία Τροφίμων. Εκδόσεις I, σελ:103-119.
- **Noah, A., Truswell, A.S. (2001).** There are many Mediterranean diets. *Asia Pasific Journal of Clinical Nutrition*, 10, 1:2-9.doi:10.1046/j.1440-6047.2001.00198.x.

- **Ochman, H., Soncini, F. C., Solomon, F., Groisman, E. A., (1996).** Identification of a pathogenicity island required for *Salmonella* survival in host cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93, 7800–7804.
- **Ofek, I., Hasty, D.L., and Doyle, R.J., (2003).** Bacterial adhesion to animal cells and tissues. ASM Press, Washington DC.
- **Olaimat A., Holley R. (2012).** Factors influencing the microbial safety of fresh produce: a review. *Food Microbiology*, 32, 1-19.
- **Painter, J. A., Hoekstra, R. M., Ayers, T., Tauxe, R. V., Braden, C. R., Angulo, F. J., et al. (2013).** Attribution of foodborne illnesses, hospitalizations, and deaths to food commodities by using outbreak data, United States, 1998-2008.
- **Park, Yong-K., Bearson, B., Bang, S.H., Bang, I.S. and Foster, J.W., (1996).** Internal pH crisis, lysine decarboxylase and the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium*. *Mol. Microbiol.*, 20, 605-611.
- **Park, S., Szonyi, B., Gautam, R., Nightingale, K., Anciso, J. and Ivanek, R. (2012).** Risk factors for microbial contamination in fruits and vegetables at the preharvest level: a systematic review. *Journal of Food Protection*, 75, 2055-2081.
- **Price, K.R., DuPont, M.S., Shepherd, R., Chan, H.W.S., Fenwick, G.R., (1990).** Relationship between the chemical and sensory properties of exotic salad cropscoloured lettuce (*Lactuca sativa*) and chicory (*Cichorium intybus*). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 53, 185–192.
- **Puerta-Gomez, A.F., Moreira, R.G., Kim, J., Castell-Perez, E., (2013).** Modeling the growth rates of *Escherichia coli* spp. and *Salmonella* Typhimurium LT2 in baby spinach leaves under slow cooling. *Food Control* 29 (1), 11–17.
- **Pui, C. F., 1Wong, W. C., Chai, L. C., Tunung, R., Jeyaletchumi, P., Noor Hidayah, M. S., Ubong, A., 1Farinazleen, M. G., 2Cheah, Y. K.*Son, R. (2011).** *Salmonella*: A foodborne pathogen. *International Food Research Journal*, 18, 465-473.
- **Ramos B., Miller, F.A., Brandão T.R.S., Teixeira P., Silva C.L.M. (2013).** Fresh fruits and vegetables - An overview on applied methodologies to

improve its quality and safety. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 20, 1-15.

- **Rathman, M., M. D. Sjaastad, and S. Falkow. (1996).** Acidification of phagosomes containing *Salmonella typhimurium* in murine macrophages. *Infect. Immun.* 64:2765-2773.
- **Ray, B., and Adams, D.M., (1984).** Repair and detection of injured microorganisms. In: Speck, M.L. (Ed.), *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*, American Experiment Station. Public Health Association, Washington, DC, 112-123.
- **Robinson R. K. (1993).** *Salmonella*. *Encyclopedia of Food Science, Food Technology and Nutrition*, 6, 3981-3991, Eds. Macrae R., Robinson R. K. and Sadler M. J., Academic Press.
- **Rolfe, M. D., Rice, C. J., Lucchini, S., Pin, C., Thompson, A., Cameron, A. D. S., et al. (2012).** Lag phase is a distinct growth phase that prepares bacteria for exponential growth and involves transient metal accumulation. *Journal of Bacteriology*, 194, 686–701.
- **Rostagno, M.H., Callaway, T.R. (2011).** Pre-harvest risk factors for *Salmonella enterica* in pork production. *Food Research International*, 45, 634-640.
- **Selgas, D., Marin, M.L., and Pin, C., (1993).** Attachment of bacteria to meat surfaces: A review. *Meat Science* 34:265-273.
- **Sewell, A.M., Farber, J.M., (2001.)** Foodborne outbreaks in Canada linked to produce. *Journal of Food Protection*, 64, 1863–1877.
- **Shea, J. E., Hensel, M., Gleeson, C., Holden, D. W., (1996)** .Identification of a virulence locus encoding a second type III secretion system in *Salmonella typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 2593–2597.
- **Shoaf-Sweeney, K.D. and Hutkins, R.W., (2009).** Adherence, Anti-Adherence, and Oligosaccharides: Preventing Pathogens from Sticking to the Host. *Advances in Food and Nutrition Research* 55:101 - 161.
- **Sivapalasingam, S., Friedman, C. R., Cohen, L., & Tauxe, R. V. (2004).** Fresh produce: A growing cause of outbreaks of foodborne illness in the

United States, 1973 through 1997. *Journal of Food Protection*, 67, 2342–2353.

- **Solomon, E.B., Yaron, S., Matthews, K.R., (2002).** Transmission and internalization of *Escherichia coli* O157:H7 from contaminated manure and irrigation water into lettuce plant tissue. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 397–400.
- **Solomon E. B., Matthews K. R. (2005).** Use of fluorescent microspheres as a tool to investigate bacterial interactions with growing plants. *Journal of Food Protection*, 68(4), 870-873.
- **Tamaki, H., Robinson, R.W., Anderson, J.L., Stoewsand, G.S., (1995).** Sesquiterpene lactones in virus-resistant lettuce. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43, 6–8.
- **Tamblyn, K.C. and Conner, D.E., (1997).** Bactericidal activity of organic acids against *Salmonella* Typhimurium attached to broiler chicken skin. *Journal of Food Protection* 60:629-633.
- **Tauxe, R., Kruse, H., Hedberg, C., Potter, M., Madden, J., Wachsmuth, K., (1997).** Microbial hazards and emerging issues associated with produce. In a preliminary report to the national advisory committee on Microbiologic Criteria for Foods. *Journal of Food Protection*, 60, 1400–1408.
- **Tsironi T., Dermesonlouoglou E., Giannoglou M., Gogou E.,Katsaros G., Taoukis P.,(2016).** Shelf-life prediction models for ready-to-eat fresh cut salads: Testing in real cold chain. *International Journal of Food Microbiology*.
- **Van der Linden, I., Avalos Llano K., Eriksson M., De Vos W.H., Van Damme E. J.M., Uyttendaele M., Devlieghere F. (2016).** Minimal processing of iceberg lettuce has no substantial influence on the survival, attachment and internalization of *E. coli* O157 and *Salmonella*. *International Journal of Food Microbiology*.
- **Warriner K., Spaniolas S., Dickinson M., Wright C., Waites W. M. (2003).** Internalization of bioluminescent *Escherichia coli* and *Salmonella* Montevideo in growing bean sprouts. *Journal of Applied Microbiology*, 95(4), 719-727.

- **Wells J.M., Butterfield J.E. (1997).** *Salmonella* contamination associated with bacterial soft rot of fresh fruits and vegetables in the marketplace, *Plant Disease*, 81, 867–872.
- **Wesche, A. M., Gurtler, J. B., Marks, B. P., & Ryser, E. T. (2009).** Stress, sublethal injury, resuscitation, and virulence of bacterial foodborne pathogens. *Journal of Food Protection*, 65, 643–650.
- **Winfield M.D and Groisman E.A. (2004).** Role of nonhost environments in the lifestyles of *Salmonella* and *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* 69(7):3687-94.
- **Yousef, A. E. and Carlstrom, C. (2003).** *Salmonella*. In Yousef, A. E. and Carstrom, C. (Eds.). *Food Microbiology: A laboratory manual*, p. 167-205. New Jersey: John Wiley and Sons, Inc.
- **Zhan, L., Li, Y., Hu, J., Pang, L., Fan, H., (2012).** Browning inhibition and quality preservation of fresh-cut romaine lettuce exposed to high intensity light. *Innovative Food Sci. Emerg. Technol.* 14, 70–76.
- **Zilelidou, E.A., Tsourou, V., Poimenidou, S., Loukou, A., Skandamis, P.N., (2015).** Modeling transfer of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* during preparation of fresh-cut salads: Impact of cutting and shredding practices. *Food Microbiol.* 45, 254–265.
- **ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΚ) αριθ. 2073/2005 ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ** της 15ης Νοεμβρίου 2005 περί μικροβιολογικών κριτηρίων για τα τρόφιμα.
- **Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ.),** Τμήμα Επιδημιολογικής Επιτήρησης και Παρέμβασης. <http://www.keelpno.gr>.
- **Μπαλατσούρας Γ. (2006).** Μικροβιολογία Τροφίμων.
- **Ολύμπιος, Χ.Μ., (2001).** Η τεχνική της καλλιέργειας των κηπευτικών στα θερμοκήπια. *Εκδόσεις Σταμούλη Α.Ε.*