



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ
ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΟΙΟΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ ΚΑΙ ΥΓΙΕΙΝΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

**ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΚΑΙ ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΟΣ
ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ
Salmonella spp. ΑΠΟΜΟΝΩΘΕΝΤΩΝ ΑΠΟ ΜΙΑ
ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑ ΚΡΕΑΤΟΣ**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών (ΠΜΣ)

ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

κατεύθυνση: Συστήματα Διαχείρισης Ποιότητας και Ασφάλειας Τροφίμων

ΡΟΥΣΣΑ Χ. ΤΣΙΚΑΛΑ

Επιβλέπων καθηγητής: Σκανδάμης Παναγιώτης

ΑΘΗΝΑ, 2019

**ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΚΑΙ ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΟΣ
ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ
Salmonella spp. ΑΠΟΜΟΝΩΘΕΝΤΩΝ ΑΠΟ ΜΙΑ
ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑ ΚΡΕΑΤΟΣ**

**MOLECULAR AND PHENOTYPIC CHARACTERIZATION
OF *Salmonella* spp. MICROBIAL STRAINS ISOLATED
FROM A GREEK MEAT INDUSTRY**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Ρούσσα Χ. Τσικαλά

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Σκανδάμης Παναγιώτης, Επιβλέπων, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ

Πανάγου Ευστάθιος, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ

Παπαδημητρίου Κωνσταντίνος, επίκουρος καθηγητής Πανεπιστημίου Πελοποννήσου

Περίληψη

Η σαλμονέλωση, μετά την καμπυλοβακτηρίωση, είναι η δεύτερη συχνότερα αναφερθείσα ζωνόσος στις Ευρωπαϊκές χώρες. Επί του παρόντος, σε παγκόσμιο επίπεδο, οι κυριότερες πηγές μόλυνσης για τον άνθρωπο περιλαμβάνουν προϊόντα κρέατος, παρά την επιτυχία των μέτρων ελέγχου κατά του βακτηρίου *Salmonella* spp. που εφαρμόζονται στην παραγωγή τροφίμων και ζωικών προϊόντων στις βιομηχανικές χώρες. Ο μικροοργανισμός *Salmonella* spp. είναι γνωστό ότι αποικίζει τη γαστρεντερική οδό των ζώων χωρίς να παρουσιάζει πάντα κλινικά συμπτώματα. Ως εκ τούτου, τα σφάγια μπορούν να μολυνθούν με *Salmonella* spp. κατά τη στιγμή της σφαγής και ολόκληρης της παραγωγικής διαδικασίας κρέατος. Κατά τη διάρκεια 5 χρόνων, ένα σύνολο 2.152 δειγμάτων ακατέργαστου κρέατος, τελικών προϊόντων, υποπροϊόντων του, από διάφορα ζώα παραγωγής, όπως επίσης περιβαλλοντικά και υγειονομικά δείγματα κατά τα στάδια της παραγωγής συλλέχθηκαν από μια ελληνική βιομηχανία κρέατος. Αυτά τα δείγματα αναλύθηκαν προς εύρεση της παρουσίας *Salmonella* spp. και προέκυψαν 142 απομονώσεις του μικροοργανισμού. Οι απομονώσεις του παθογόνου οροτυποποιήθηκαν και επιπλέον χαρακτηρίστηκαν ως προς το φαινοτυπικό τους προφίλ σύμφωνα με την απάντηση τους σε διαφορετικά περιβάλλοντα. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν: i) ο έλεγχος και ο χαρακτηρισμός της εμφάνισης και της διασποράς των ορότυπων του μικροοργανισμού στα διάφορα είδη κρέατος, και ii) η διερεύνηση της παραλλακτικότητας τους ως προς την ανάπτυξη τους σε διαφορετικά pH, της έκθεσης τους σε απολυμαντικά διαφορετικών συγκεντρώσεων για την εύρεση του MIC και ως προς την επιβίωση τους με την ικανότητα ανάπτυξης βιοϋμενίων. Για την επίτευξη των στόχων εφαρμόστηκαν τόσο μοριακές, όσο και μικροβιολογικές τεχνικές. Πράγματι, ο μικροοργανισμός έχει αναπτύξει μηχανισμούς αντιμετώπισης των δυσμενών συνθηκών ακόμα και σε επεξεργασμένα τρόφιμα και περιοχές όπου έχουν απολυμανθεί. Ο σχηματισμός βιοϋμενίων αποτελεί έναν από αυτούς και προβληματίζει τη βιομηχανία τροφίμων. Συγκεκριμένα, στην παρούσα μελέτη, τα ευρήματά μας, έδειξαν ότι η μόλυνση από το μικροοργανισμό ήταν συνήθης στα κρέατα λιανικής και ότι τα προϊόντα απομόνωσης *Salmonella* ήταν φαινοτυπικά ποικίλα. Όσον αφορά την ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίων, καμία απομόνωση δεν χαρακτηρίστηκε ως μη ικανή, ενώ 2 είναι ισχυρά ικανές και ανήκουν στον *S. Infantis*. Η ικανότητα αυτή προσδίδει σε όλα τα στελέχη μεγαλύτερη αντίσταση στην απολύμανση, ανθεκτικότητα στις ανοσολογικές αντιδράσεις καθώς και στις αντιμικροβιακές θεραπείες. Επίσης, εξετάστηκε η MIC των απομονώσεων σε δυο ευρέως χρησιμοποιούμενα στη βιομηχανία τροφίμων απολυμαντικά, το PAA και το BC, με μονάχα δύο απομονώσεις να έχουν διαφορετικό MIC από τις υπόλοιπες σε κάθε περίπτωση, και με το BC να είναι πιο αποτελεσματικό από το PAA ως προς τους μικροοργανισμούς. Στην τελευταία δοκιμή, αξιολογήθηκε η ανάπτυξη των απομονώσεων σε διαφορετικές τιμές pH που κυμαίνονταν μεταξύ

4.8-8.0 για την εκτίμηση των οριακών τιμών pH με τη χρήση ενός μοντέλου θεμελιωδών παραμέτρων (CMP). Ενδιαφέρον, παρουσίασε η μεγάλη μεταβλητότητα των απομονώσεων, ακόμα και σε επίπεδο ορότυπου, μέσα σε ένα μεγάλο εύρος τόσο ελάχιστων (3.2-4.7) όσο και μέγιστων (8.5-10) θεωρητικών οριακών τιμών. Τα φαινοτυπικά δεδομένα για κάθε πείραμα συσχετίστηκαν για την εύρεση πιθανής αλληλεξάρτησης αλλά και για την καλύτερη γνώση της συμπεριφοράς κάθε απομόνωσης.

Επιστημονική περιοχή: Γεωπονικές Επιστήμες, Μικροβιολογία τροφίμων

Λέξεις κλειδιά: κρέας, *Salmonella* spp., pH, βιοϋμένια, MIC, απολυμαντικά, οπτική πυκνότητα, τρυβλία μικροτιτλοδότησης

Abstract

After campylobacteriosis, salmonellosis is the second most commonly reported zoonosis at EU countries. Currently, at a global level, the main sources of humans' infection include meat products, despite of the success of *Salmonella* spp. control measures implemented in food-animal production of industrialized countries. *Salmonella* spp. microorganism is known to colonize the gastrointestinal tract of animals without always producing clinical signs. Therefore, carcasses can become contaminated with *Salmonella* at the time of slaughter and the whole meat production procedure. During a 5-year period, a total of 2.152 of raw meat samples, final products, meat by-products, from several production animals, as well as environmental and hygienic samples were obtained from a Greek meat industry. These samples were analyzed for the detection of *Salmonella* spp. and 142 isolations of the microorganism were found. Pathogen isolates were serotyped and further characterized for their phenotypic profile according to their response to different environments. The purpose of the present study was to: (i) control and characterize the occurrence and spread of *Salmonella* serotypes in the meat and environment samples, and (ii) investigate their variability in their growth at different pH, exposure to different disinfectants' concentrations to find MIC and their survival with the ability to grow biofilms. To achieve the goals, molecular as well as microbiological techniques were applied. Indeed, the microorganism has developed mechanisms to cope with adverse conditions even in processed foods and disinfected areas. The formation of biofilms is one of them and concerns the food industry. Specifically, in the present study, the findings showed that the microorganism contamination was common in retail meat and that *Salmonella* isolates were phenotypically diverse. Regarding the ability to form biofilms, none of the isolates were characterized as inadequate, whereas 2 produce strong biofilms and belong to *S. Infantis*. This ability gives all strains greater resistance to disinfection, to immune responses as well as antimicrobial therapies. The MIC of the isolates was also examined in two widely used food industry disinfectants, PAA and BC, with only two isolates having a different MIC from the others, in each case, and with BC being more effective than PAA against microorganisms. At the last test, the growth of the isolates at different pH values ranging from 4.8-8.0 was evaluated to estimate pH growth limit values using a Cardinal Parameter Model (CMP). The high variability of isolates was really interesting, even at the level of the serotype, within a wide range of both minimum (3.2-4.7) and maximum (8.5-10) theoretical limit values. The phenotypic data for each experiment were correlated to find possible interdependence and to better understand the behavior of each isolate.

Scientific area: Agricultural Sciences, Food Microbiology

Keywords: meat, *Salmonella* spp., pH, biofilms, MIC, disinfectants, optical density, microtiter plates

Ευχαριστίες

Σαν ελάχιστο δείγμα εκτίμησης και ευγνωμοσύνης...

Θα ήθελα αρχικά να εκφράσω τις θερμότερες ευχαριστίες και τη βαθύτατη ευγνωμοσύνη μου στον επιβλέποντα αυτής της μεταπτυχιακής ερευνητικής μελέτης και Αναπληρωτή Καθηγητή του τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων κ. Σκανδάμη Παναγιώτη για την ανάθεση του θέματος και για την εμπιστοσύνη του στο πρόσωπό μου, και κυρίως για την πολύτιμη βοήθεια, καθοδήγηση, γνώση και εν γένει συμβολή του καθ' όλη τη διάρκεια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών.

Οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στις μεταδιδασκαλικές ερευνήτριες Ζιλελίδου Ευαγγελία και Ποιμενίδου Σοφία οι οποίες σαν άριστες δασκάλες ήταν δίπλα μου σε όλη τη διάρκεια υλοποίησης των πειραματικών διαδικασιών ενώ με αστείρευτη δεξιοτεχνία μου μετέφεραν τις πρακτικές και γνώσεις τους. Οι πολύτιμες συμβουλές τους, βοήθησαν στην ομαλή εξέλιξη των πειραμάτων. Επιπλέον, είχα την τύχη να συνεργαστώ με τον μεταπτυχιακό φοιτητή Γιαννούλη Νικόλαο, ο οποίος αποτελεί μέρος της παρούσας μελέτης και τον ευχαριστώ θερμά για το όμορφο κλίμα που δημιουργούσε και την οργάνωση του ως άτομο που αποτέλεσαν καθοριστικά στοιχεία για την ολοκλήρωση όλων των καθηκόντων μας. Και οι τρεις είχαν θεμελιώδη συμβολή στην παρούσα μελέτη και ήταν δίπλα μου κάθε στιγμή.

Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω κ. Πανάγου Ευστάθιο, Αναπληρωτή Καθηγητή του ΓΠΑ, και κ. Παπαδημητρίου Κωνσταντίνο, επίκουρο καθηγητή στο Πανεπιστήμιο Πελοποννήσου, που συνέβαλαν στην ανάπτυξη των γνώσεων μου κατά τη διάρκεια του μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών, και ήταν πρόθυμοι να βοηθήσουν σε κάθε δυσκολία που αντιμετώπιζα καθώς και για την κρίση τους ως μέλη της εξεταστικής επιτροπής.

Θα ήταν παράλειψή μου να μην ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη του Εργαστηρίου που συνέβαλαν στη δημιουργία ενός θετικού κλίματος εργασίας, ενώ παράλληλα μέσω των δικών τους αρμοδιοτήτων, μου προσέφεραν γνώσεις πέραν της παρούσας πτυχιακής.

Τέλος, ευχαριστώ τους γονείς μου Χαράλαμπο και Στυλιανή, για την αμέριστη ηθική και υλική υποστήριξη τους, και τα αδέρφιά μου Γεωργία και Γιάννη που είναι στο πλευρό μου πραγματικοί συνοδοιπόροι και συμπαραστάτες καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου. Βρίσκονται πάντα στο πλευρό μου να ομορφαίνουν και να απαλύνουν τις δύσκολες στιγμές της ζωής μου. Πέραν αυτών ευχαριστώ τη δεύτερη οικογένειά μου, τους φίλους μου, για την συμπαράστασή, την κατανόηση και την υποστήριξη τους καθ' όλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών.

Ρούσσα Τσικαλά
Αθήνα, Δεκέμβριος 2019

Στην οικογένειά μου!

“The role of infinitely small in nature is infinitely great.”

Louis Pasteur

Περιεχόμενα

Περίληψη	iii
Abstract.....	v
Ευχαριστίες.....	vi
Πίνακας Συντμήσεων.....	xi
Πρόλογος	xii
1. Εισαγωγή-Θεωρητικό Μέρος	1
1.1 Ο μικροοργανισμός <i>Salmonella</i> spp.	1
1.1.1 Ιστορικά στοιχεία και ταξινόμηση του γένους <i>Salmonella</i>	1
1.1.2 Χαρακτηριστικά <i>Salmonella</i> spp.	4
1.2 Μικροβιακή Ανάπτυξη, Συνθήκες καταπόνησης και τρόποι επιβίωσης	7
1.2.1 Κινητική ανάπτυξης των κυττάρων	7
1.2.2 Μαθηματικά μοντέλα ανάπτυξης.....	8
1.2.3 Καταπονήσεις και «Θεωρία των εμποδίων».....	11
1.2.4 Αντοχή και Ανθεκτικότητα	20
1.2.5 Μεταβλητότητα της συμπεριφοράς των στελεχών	28
1.3 Ανίχνευση και ορολογική τυποποίηση του παθογόνου	28
1.3.1 Μέθοδοι ανίχνευσης του <i>Salmonella</i> spp.	28
1.3.2 Οροτυποποίηση <i>Salmonella</i> spp.	30
1.4 <i>Salmonella</i> spp. και Δημόσια Υγεία	31
1.4.1 Επιδημιολογικά στοιχεία.....	31
1.4.2 Μολυσματικότητα.....	34
1.4.3 Συμπτωματολογία σαλμονελάσεων.....	35
1.4.4 Επιδημικά κρούσματα από τον παθογόνο μικροοργανισμό	36
1.5 Το κρέας.....	38
1.5.1 Διατροφική αξία.....	38
1.5.2 Η ποιότητα του κρέατος.....	39
1.5.3 Από την ποιότητα στην ασφάλεια.....	41

1.5.4 Ανάπτυξη μικροοργανισμών σε προϊόντα κρέατος	42
1.5.5 Νομοθεσίες σχετικές με την παραγωγική διαδικασία προϊόντων ζωικής προέλευσης...	46
2. Σκοπός της εργασίας.....	48
3. Υλικά και Μέθοδοι-Πειραματικό Μέρος	49
3.1 Βακτηριακές απομονώσεις <i>Salmonella enterica</i>	49
3.1.1 Έλεγχος καθαρότητας και καθαρισμός, ανακαλλιέργεια απομονώσεων stock	49
3.1.2 Μικροβιολογικά υλικά	49
3.2 Μοριακός χαρακτηρισμός απομονώσεων <i>Salmonella</i> spp. σε επίπεδο ορότυπου	51
3.2.1 Απομονώσεις <i>Salmonella</i> spp. που αναλύθηκαν	51
3.2.2 Απομόνωση και ποσοτικοποίηση του DNA	51
3.2.3 Ορολογική τυποποίηση των απομονώσεων	52
3.3 Φαινοτυπικός χαρακτηρισμός απομονώσεων <i>Salmonella</i> spp.	56
3.3.1 Απομονώσεις <i>Salmonella</i> spp. που χρησιμοποιήθηκαν.....	56
3.3.2 Ενεργοποίηση των κυττάρων και προετοιμασία εμβολίων πριν τις πειραματικές διαδικασίες.....	57
3.3.3 Ικανότητα Σχηματισμού Βιοϋμενίων.....	58
3.3.4 Προσδιορισμός της επίδρασης του pH στην κινητική συμπεριφορά του μικροοργανισμού	60
3.3.5 Επίδραση απολυμαντικών στην ανάπτυξη των απομονώσεων <i>Salmonella enterica</i>	64
3.3.6 Στατιστική ανάλυση.....	65
4. Αποτελέσματα και Συζήτηση	67
4.1 Οροτυποποίηση του μικροοργανισμού <i>Salmonella</i> spp.	67
4.2 Προσδιορισμός ικανότητας σχηματισμού βιοϋμενίων	74
4.2.1 Συσχέτιση της ικανότητας σχηματισμού βιοϋμενίων με τον ορότυπο	75
4.2.2 Συσχέτιση της ικανότητας σχηματισμού βιοϋμενίων με την πηγή απομόνωσης.	78
4.3 Προσδιορισμός MIC των απομονώσεων με χρήση απολυμαντικών.....	79
4.4 Προσδιορισμός των οριακών τιμών pH για την ανάπτυξη των απομονώσεων <i>Salmonella</i> spp.	83

4.4.1 Συσχέτιση οριακών τιμών pH με τους ορότυπους.....	87
4.4.2 Συσχέτιση των οριακών τιμών pH με την ανάπτυξη βιοϋμενίων και την ανθεκτικότητα τους στα απολυμαντικά.....	90
Συμπεράσματα	93
Παράρτημα.....	96
Βιβλιογραφία	104

Πίνακας Συντμήσεων

ΓΠΑ: Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΕΠΕΥΤΠ: Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων

WHO (World Health Organization): Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας

EFSA (European Food Safety Authority): Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων

CDC (Centers for Disease Control): Κέντρα Ελέγχου Νόσων

ASM (American Society of Microbiology): Αμερικανική Εταιρεία Μικροβιολογίας

CPMs (Cardinal Parameters Models): Μοντέλα Θεμελιωδών Παραμέτρων

MIC (Minimum Inhibitory Concentration): Ελάχιστη Ανασταλτική Συγκέντρωση

HACCP (Hazard Analysis Critical Control Points): Ανάλυση Επικινδυνότητας και Κρίσιμων Σημείων Ελέγχου

cfu (colony forming unit): Αριθμός αποικιών

μ_{max} : Μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης

YOPIs (Young, Old, Pregnant, Immunocompromised): Νέοι, Ηλικιωμένοι, Έγκυες, Ανοσοκατεσταλμένοι

Πρόλογος

Η εφαρμογή ορθών πρακτικών υγιεινής αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση κατά μήκος όλης της παραγωγικής διαδικασίας για την δημιουργία ασφαλών προϊόντων ως προς τον καταναλωτή (from the farm to the fork). Οι αρχές του HACCP (Hazard Analysis Critical Control Points), κατά την εφαρμογή του οποίου γίνεται η ανάλυση επικινδυνότητας και των κρίσιμων σημείων ελέγχου, όπως και διάφορα συστήματα διαχείρισης ποιότητας και ασφάλειας τροφίμων, τα οποία καλείται μια επιχείρηση να ακολουθεί, στηρίζουν αυτές τις πρακτικές. Ωστόσο, οι εκδηλώσεις διαφόρων κρουσμάτων τροφικής δηλητηρίασης κατά της δημόσιας υγείας, προερχόμενων από την κατανάλωση τροφίμων, αποδεικνύει τη συνεχή ανάγκη βελτίωσης των πρακτικών καθώς και της ταυτοποίησης και αξιολόγησης των πηγών επιμόλυνσης των τροφίμων σε κάθε στάδιο επεξεργασίας, από την πρωτογενή παραγωγή έως το τελικό προϊόν.

Οι κίνδυνοι ανάλογα με τα χαρακτηριστικά του κάθε τροφίμου είναι χημικοί, φυσικοί ή/και μικροβιολογικοί και ενώ δύναται να πηγάζουν από τις πρώτες ύλες που εισέρχονται στη βιομηχανία τροφίμων και να διαχέονται ταχύτατα κατά μήκος όλου του περιβάλλοντος επεξεργασίας και παραγωγής του τροφίμου. Όσον αφορά τους μικροβιολογικούς κινδύνους, η εμφάνιση τους οφείλεται σε παθογόνους μικροοργανισμούς, με πρωταρχικούς κατά το έτος 2017, τον *Campylobacter*, *Salmonella* spp., και τον *Listeria monocytogenes* όπως και πολλών άλλων μικροοργανισμών υπεύθυνων για την πρόκληση λοιμώξεων στους καταναλωτές (EFSA & ECDC, 2018). Βασικοί παράγοντες της επιβίωσης, βιοποικιλότητας, εξάπλωσης και προσαρμογής των μικροοργανισμών στη βιομηχανία τροφίμων, αποτελούν τα διαφορετικά στελέχη ανά διαφορετική γεωγραφική εμβέλεια που εισέρχονται και επιπολάζουν τελικά στη γραμμή παραγωγής και το τελικό προϊόν.

Το ρίσκο είναι πολύπλευρο καθώς οι μικροοργανισμοί εγκαθίστανται, διασπείρονται πολύ συχνά λόγω διασταυρούμενης επιμόλυνσης και προσκολλώνται σε ελλιπώς καθαρισμένες επιφάνειες και δημιουργούν σταθερά μικροβιακά συσσωματώματα, γνωστά ως βιοϋμένια (biofilms), ή εμφανίζουν κάποια προσαρμογή η οποία τους δίνει τη δυνατότητα να επιβιώσουν σε δυσμενείς συνθήκες. Η προσαρμογή των μικροοργανισμών ενισχύεται από την έκθεση τους σε εχθρικούς παράγοντες ενώ μπορεί να μεταβάλλει το φαινοτυπικό προφίλ των μικροοργανισμών με αποτέλεσμα όχι μόνο την προσαρμογή και αντοχή σε αντίξοες καταστάσεις όπως τα καθαριστικά, όξινες ή αλκαλικές συνθήκες, αντιβιοτικά αλλά ακόμα και στην αυξημένη μολυσματικότητα τους.

Η ικανότητα προσαρμογής που έχουν αναπτύξει οι μικροοργανισμοί σε διαφορετικές συνθήκες, δηλώνει την ανάγκη για εξελιγμένες σύγχρονες ταχείες τεχνικές που δίνουν περαιτέρω γενετικές πληροφορίες για την ταυτότητα των μικροοργανισμών όπως και μικροβιολογικές τεχνικές που

πλαισιώνουν το φαινοτυπικό προφίλ τους, έτσι ώστε να εφαρμόζονται και οι κατάλληλες στρατηγικές μείωσής τους.

Στόχος της παρούσας μελέτης ήταν η μικροβιολογική ανάλυση δειγμάτων που συλλέχτηκαν από μια ελληνική βιομηχανία κρέατος από το 2014 έως σήμερα, για τη διεξαγωγή συμπερασμάτων αναφορικά με την επικινδυνότητα των τροφίμων και την προέλευση των επιμολύνσεων και τελικά την καταχώριση αυτών στη διαδικτυακή πλατφόρμα e-platon. Η πλατφόρμα αυτή αποτελεί ένα εργαλείο που θα συνδυάζει πολύ-μετρικές πληροφορίες (μικροβιολογικές και χημικές αναλύσεις, οργανοληπτικά στοιχεία, φαινοτυπικά και μοριακά δεδομένα και δεδομένα επεξεργασίας εικόνας). Κάτι αντίστοιχο στην Ελλάδα δεν έχει αναπτυχθεί, ενώ σε διεθνές επίπεδο, η υπάρχουσα βάση μικροβιολογικών δεδομένων (Food Microbe Tracker) διαθέτει περιορισμένα διαθέσιμα κριτήρια αυτών.

Συγκεκριμένα αντικείμενο της μελέτης είναι η παραγωγή μικροβιολογικών δεδομένων από τα δείγματα που αφορούν τα φαινοτυπικά και μοριακά χαρακτηριστικά απομονωθέντων στελεχών του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella* spp. που σχετίζεται με τις Α' ύλες και το περιβάλλον επεξεργασίας των τροφίμων.

Στο πρώτο μέρος παρουσιάζεται το θεωρητικό υπόβαθρο στο οποίο βασίστηκε η έρευνα και στη συνέχεια ακολουθεί η ανάλυση των πειραματικών διαδικασιών. Κατά την υλοποίηση της έρευνας το πρώτο στάδιο της αποτελούσε η οροτυποποίηση των απομονώσεων της *Salmonella* spp. που είχαν συλλεχθεί από τα τρόφιμα και τα διάφορα στάδια επεξεργασίας αυτών στη βιομηχανία κρέατος. Στη συνέχεια ακολούθησε η διαλογή ορισμένων απομονώσεων και η *in vitro* μελέτη τους ως προς: α) τις οριακές τιμές pH, β) την ικανότητά τους να σχηματίσουν βιοϋμένια, γ) την ανθεκτικότητά τους σε δυο απολυμαντικά.

1. Εισαγωγή-Θεωρητικό Μέρος

1.1 Ο μικροοργανισμός *Salmonella* spp.

1.1.1 Ιστορικά στοιχεία και ταξινόμηση του γένους *Salmonella*

Το γένος *Salmonella* ανήκει στην οικογένεια των Εντεροβακτηριδίων (Enterobacteriaceae), μελετάται για περισσότερα από 100 χρόνια και αποτελεί ένα παράγοντα υψηλής επικινδυνότητας τόσο για τον άνθρωπο όσο και για τα ζώα (Evangelopoulou, 2010; Ryan *et al.*, 2017).

Ο μικροοργανισμός *Salmonella* πήρε το όνομά του από τον Daniel E. Salmon, ο οποίος ήταν ο κτηνίατρος που πρώτος απομόνωσε, το λεγόμενο τότε, "*Bacillus choleraesuis*" από τα έντερα των χοίρων το 1884. Το όνομα αυτό άλλαξε το 1900 σε "*Salmonella choleraesuis*" από τον Lignieres προς τιμήν του Daniel E. Salmon (Ryan *et al.*, 2017). Η τρέχουσα ταξινόμηση και ονοματολογία του γένους *Salmonella* αποτέλεσε αντικείμενο συζήτησης από τότε που οι Le Minor και Poroff (1987) πρότειναν αλλαγές στη δεκαετία του 1980 (Tindall *et al.*, 2005).

Η ονοματολογία του μικροοργανισμού είναι πολύπλοκη και οι επιστήμονες χρησιμοποιούν διαφορετικά συστήματα για να αναφέρονται και να επικοινωνούν σχετικά με αυτό το γένος. Ωστόσο, η ομοιομορφία στην ονοματολογία είναι απαραίτητη για την επικοινωνία μεταξύ επιστημόνων, υπαλλήλων υγείας και του κοινού. Δυστυχώς, η τρέχουσα χρήση συχνά συνδυάζει διάφορα ονοματολογικά συστήματα τα οποία χωρίζουν το γένος σε διαφορετικά υπογένη, είδη, υποείδη, υποκατηγορίες, ομάδες, υποομάδες και ορότυπους με ασυνεπές τρόπο (Brenner *et al.*, 2000; Ryan *et al.*, 2017).

Σήμερα το γένος *Salmonella* χωρίζεται σε 2 είδη: *Salmonella enterica* και *Salmonella bongori*, με το *S. enterica* να χωρίζεται σε 6 επιπλέον υποείδη (Beaubrun *et al.*, 2012): *S. enterica* subsp. *enterica*, *S. enterica* subsp. *salamae*, *S. enterica* subsp. *arizonae*, *S. enterica* subsp. *diarizonae*, *S. enterica* subsp. *houtenae* and *S. enterica* subsp. *Indica* (**Σχήμα 1**) (Grimont & Weill, 2007). Αυτά είναι βιοχημικά διαφοροποιημένα σε ορότυπους με βάση τη σύνθεση των δομών των υδατανθράκων, των μαστιγίων και των λιποπολυσακχαρίδων (LPS) (Hurley *et al.*, 2014).

Στο παρελθόν, τα υποείδη της *S. enterica* θεωρήθηκαν ως υπογένη και οι ορότυποι (serovars) θεωρήθηκαν ξεχωριστά είδη, τα οποία, αν εξακολουθούσαν να ακολουθούνται σήμερα, θα είχαν ως αποτέλεσμα περισσότερα από 2600 είδη *Salmonella* (Hurley *et al.*,

2014; Ryan *et al.*, 2017), που αποτελούν σήμερα τους ορότυπους της (2.659 ορότυποι)(Bethesda, 2019; Graziani *et al.*, 2017).

Οι όροι «serovars» και «serotypes» θεωρούνται γενικά συνώνυμοι. Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO-World Health Organization) και το Ινστιτούτο Παστέρ (Institut Pasteur) χρησιμοποιούν τον όρο «serovar», ενώ τα Κέντρα Ελέγχου Νόσων (CDC-Centers for Disease Control) και η Αμερικανική Εταιρεία Μικροβιολογίας (ASM-American Society of Microbiology) χρησιμοποίησαν αρχικά τη λέξη «serotype» αλλά την άλλαξαν στη συνέχεια σε «serovar» προκειμένου να διατηρηθεί η διεθνής συνέπεια (Ryan *et al.*, 2017).

Βασίλειο	Bacteria
Φύλο	Proteobacteria
Κλάση	Gammaproteobacteria
Τάξη	Enterobacterales
Οικογένεια	Enterobacteriaceae
Γένος	<i>Salmonella</i>
Είδη	<i>enterica</i> , που περιλαμβάνει τα: I, II, IIIa, IIIb, IV, και VI <i>bongori</i> (πρώην υποείδος V)
Ορότυπος	Την πρώτη φορά που αναφέρεται ένας ορότυπος στο κείμενο το όνομα θα πρέπει να προηγείται από τη λέξη “serovar” ή “ser.” Οι ορότυποι ονομάζονται σε υποείδη I και ορίζονται από αντιγονικές φόρμουλες στα υποείδη II έως IV, και VI και <i>S. bongori</i> . Τα μέλη των υποειδών II, IV, και VI και <i>S. bongori</i> διατηρούν τα ονόματά τους αν έχουν ονομαστεί πριν από 1966

Πίνακας 1 Ταξινόμηση του μικροοργανισμού *Salmonella* (Bethesda, 2019; Brenner *et al.*, 2000).

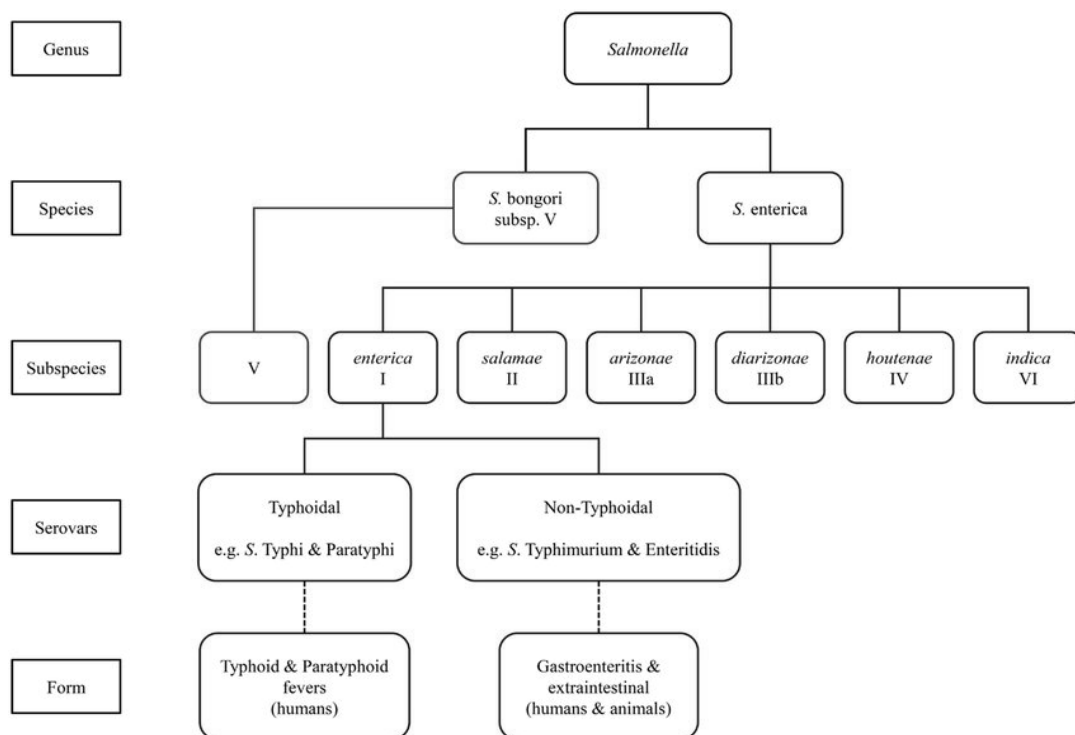
Το 1966 προτάθηκε από τον Kauffmann ότι κάθε serovar να θεωρούνταν ως ξεχωριστό είδος. Όλοι οι serovars (πριν και μετά το 1966) αρχικά προσδιορίστηκαν από τον αντιγονικό τους τύπο. Πριν το 1966 οι serovars έφεραν όνομα ανεξάρτητα από τα υποείδη, αλλά εξαρτώμενο από τη νόσο που προκαλούσαν (*S. typhi*), από την πρόκληση της νόσου σε συγκεκριμένο ξενιστή (*S. typhi-murium*, *S. cholerae-suis*), και/ή από τον ξενιστή ή τη γεωγραφική περιοχή απ’ όπου απομονώθηκαν (Hurley *et al.*, 2014; Ryan *et al.*, 2017). Το 1968 αποφασίστηκε η συγχώνευση αυτών των ονομασιών, χωρίς να επιδεικνύουν το είδος. Οι ονομασίες διατηρήθηκαν μόνο για τους ορότυπους του είδους *enterica* που

αντιπροσωπεύουν περισσότερο από το 99,5% των απομονωμένων στελεχών του βακτηρίου (Πινάκας 2)(Hurley *et al.*, 2014).

<i>Salmonella</i>	Αριθμός
Subspecies <i>enterica</i>	1586
Subspecies <i>salamae</i>	522
Subspecies <i>arizonae</i>	102
Subspecies <i>diarizonae</i>	338
Subspecies <i>houtenae</i>	76
Subspecies <i>indica</i>	13
<i>Salmonella bongori</i>	22
Σύνολο	2659

Πινάκας 2 Ο αριθμός των οροτύπων *Salmonella* σύμφωνα με το υποείδος (Graziani *et al.*, 2017).

Το γένος και είδος γράφονται με πλάγια γραφή ενώ ο ορότυπος με κεφαλαίο το πρώτο γράμμα χωρίς πλάγια γραφή (Brenner *et al.*, 2000). Στην πράξη, για το *S. enterica* subsp. *enterica*, το όνομα υποείδους (subsp. *enterica*) δεν χρειάζεται να αναγράφεται, καθώς μόνο οι ορότυποι αυτού του υποείδους φέρουν ένα όνομα. Συνεπώς τα παρακάτω παραδείγματα είναι σωστά και έχουν την ίδια σημασία: *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium, ή *S. enterica* serovar Typhimurium, ή *Salmonella* ser. Typhimurium (Hurley *et al.*, 2014).

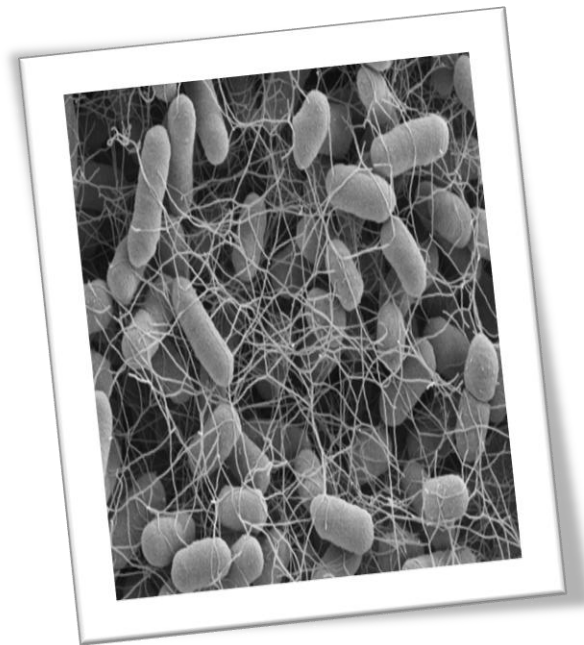


Σχήμα 1 Ταξινόμηση των ειδών και υποειδών *Salmonella* (Hurley *et al.*, 2014).

1.1.2 Χαρακτηριστικά *Salmonella* spp.

1.1.2.1 Μορφολογικά χαρακτηριστικά

Όπως όλα τα Εντεροβακτήρια οι μικροοργανισμοί του γένους *Salmonella* αποτελούν Gram αρνητικά, ραβδόμορφα βακτήρια, που δεν σχηματίζουν σπόρια (Ryan *et al.*, 2017). Έχουν διαστάσεις 0.7-1.5x2.0-5.0 μm και σχεδόν όλα τα είδη *Salmonella* διαθέτουν μαστίγια περιμετρικά (peritrichous flagella) του βακτηριακού κυττάρου, που τα καθιστούν ικανά να κινούνται με εξαίρεση το παθογόνο των πουλερικών *Salmonella enterica* ser. Gallinarium και ser. Pullorum (Percival & Williams, 2014; Ryan *et al.*, 2017). Τα *S. Paratyphi*, *S. Typhi* και *S. Dublin* διαθέτουν ένα ειδικό ελυτροειδές περίβλημα αποτελώντας εξαίρεση από τα υπόλοιπα (Percival & Williams, 2014).



Εικόνα 1 *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Typhimurium, αποικία. Λήψη με χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου. Bar = 1 μm (Muhsin *et al.*, 2019).

1.1.2.2 Συνθήκες ανάπτυξης του μικροοργανισμού

Ο μικροοργανισμός *Salmonella* είναι προαιρετικά αναερόβιος (Percival & Williams, 2014; Ryan *et al.*, 2017). Οι περισσότεροι από τους ορότυπους του βακτηρίου παρουσιάζουν βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης 35–37°C. Πέραν όμως των ιδανικών συνθηκών η ανάπτυξη του έχει καταγραφεί μεταξύ 2 και 4°C και έως και 54°C (Ryan *et al.*, 2017).

Το βακτήριο είναι ευαίσθητο στην υψηλή θερμοκρασία και συνήθως θανατώνεται σε θερμοκρασίες $\geq 70^\circ\text{C}$. Αναπτύσσεται σε εύρος pH=3.8-9.5 με τις βέλτιστες τιμές μεταξύ 6.5 και 7.5 (Ryan *et al.*, 2017). Αυτοί οι μικροοργανισμοί απαιτούν υψηλή ενεργότητα ύδατος (a_w -water activity) μεταξύ 0.94 και 0.99 (a_w καθαρού νερού=1.00), αλλά μπορούν να επιβιώσουν στο $a_w < 0.2$ (Graziani *et al.*, 2017).

Η πλήρης αναστολή της ανάπτυξης συμβαίνει σε θερμοκρασίες $< 7^\circ\text{C}$, pH < 3.8 , ή $a_w < 0.94$ (Graziani *et al.*, 2017; Ryan *et al.*, 2017). Ωστόσο, σε ορισμένες θερμοκρασίες, ένα χαμηλό a_w πιστεύεται ότι έχει προστατευτική επίδραση στο μικροοργανισμό (Ryan *et al.*, 2017).

1.1.2.3 Βιοχημικά χαρακτηριστικά

Τα βακτήρια αυτά είναι αρνητικά στο τεστ οξειδάσης, θετικά στο τεστ καταλάσης, δε ζυμώνουν τη λακτόζη (εξαιρέση αποτελεί το *S. arizonae*), ενώ ζυμώνουν τη γλυκόζη, τη μαννιτόλη, τη ραμνόζη, τη σορβιτόλη κτλ. για την παραγωγή οξέος ή οξέος και αερίου. Είναι ικανά να ζυμώσουν τη σακχαρόζη αλλά σπάνια την αδονιτόλη και κατά συνέπεια δεν σχηματίζουν ινδόλη και μπορούν να χρησιμοποιήσουν το κιτρικό άλας ως μοναδική πηγή άνθρακα (Percival & Williams, 2014). Τα βιοχημικά χαρακτηριστικά που χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση του βακτηρίου *Salmonella* spp. περιλαμβάνουν την ανικανότητα υδρόλυσης της ουρίας, το σχηματισμό H₂S (hydrogen sulphide) σε άγαρ τριπλού σακχάρου και το σχηματισμό λυσίνης και αποκαρβοξυλίωσης της οριθίνης εκτός από τα *S. Paratyphi* και *S. Typhi* (Andino & Hanning, 2015; Percival & Williams, 2014; Ryan *et al.*, 2017).

Στον **Πίνακα 3** παρουσιάζονται οι απαντήσεις των ειδών και υποειδών του μικροοργανισμού σε διαφορετικά βιοχημικά τεστ για την διάκριση μεταξύ τους (Hurley *et al.*, 2014).

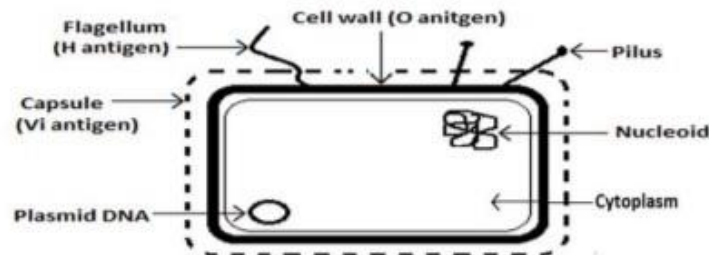
Species	<i>S. enterica</i>					<i>S. bongori</i>	
	<i>enterica</i>	<i>salamae</i>	<i>arizonae</i>	<i>diarizonae</i>	<i>houtenae</i>	<i>indica</i>	
Characters							
Dulcitol	+	+	-	-	-	d	+
ONPG (2 h)	-	-	+	+	-	d	+
Malonate	-	+	+	+	-	-	-
Gelatinase	-	+	+	+	+	+	-
Sorbitol	+	+	+	+	+	-	+
Growth with KCN	-	-	-	-	+	-	+
L(+)-tartrate ^(a)	+	-	-	-	-	-	-
Galacturonate	-	+	-	+	+	+	+
γ-glutamyltransferase	+ ^(*)	+	-	+	+	+	+
β-glucuronidase	d	d	-	+	-	d	-
Mucate	+	+	+	-(70%)	-	+	+
Salicine	-	-	-	-	+	-	-
Lactose	-	-	-(75%)	+(75%)	-	d	-
Lysed by phage O1	+	+	-	+	-	+	d
Usual habitat	Warm-blooded animals		Cold-blooded animals and environment				

(a) = *d*-tartrate.
 (*) = Typhimurium d, Dublin -.
 + = 90 % or more positive reactions.
 - = 90 % or more negative reactions.
 d = different reactions given by different serovars.

Πίνακας 3 Βιοχημικά χαρακτηριστικά ειδών και υποειδών *Salmonella* spp. (Hurley *et al.*, 2014).

1.1.2.4 Αντιγονική σύσταση

Ο μικροοργανισμός *Salmonella* μπορεί να χαρακτηριστεί ανοσολογικά μέσω της διάθεσης τους σε σωματικά αντιγόνα (αντιγόνα O), βλεφαριδικά αντιγόνα (αντιγόνα H) και αντιγόνα κάψας (αντιγόνα Vi) (McQuiston *et al.*, 2011).



Εικόνα 2 Η δομή των αντιγόνων του κυττάρου *Salmonella enterica* serovar Typhi (Kaur & Jain, 2012).

- * **Αντιγόνα O:** Είναι λιποσακχαρίτες του κυτταρικού τοιχώματος και συμβολίζονται με λατινικούς αριθμούς. Αποτελούνται από επαναλήψεις ολιγοσακχαριτών (μονάδες O), που συνήθως περιέχουν δύο έως οκτώ υπολείμματα σακχάρων. Υπάρχουν 46 O οροομάδες που περιγράφονται στο σχήμα Kauffmann-White-Le Minor. Τα γονίδια που αφορούν τη σύνθεση του O-αντιγόνου συνήθως υπάρχουν ως γονιδιακό σύμπλεγμα στο χρωμόσωμα, το οποίο χαρτογραφεί μεταξύ *galF* και *gnd* στη *Salmonella*, *E. coli*, και *Shigella*, αλλά μερικές φορές, ένα ή περισσότερα τέτοια γονίδια βρίσκονται έξω από το γονιδιακό σύμπλεγμα (Liu *et al.*, 2013). Είναι ανθεκτικά και μπορούν να επιβιώσουν σε κατάσταση βρασμού (100°C) μέχρι και 2 ½ ώρες, όπως και σε συνθήκες όξινης καταπόνησης με χρήση αλκοόλης ή αραιών οξέων (Grimont & Weill, 2007). Αυτά τα χαρακτηριστικά καθιστούν την παρουσία του αντιγόνου O απαραίτητη για την επιβίωση των βακτηρίων στο φυσικό τους περιβάλλον στη βακτηριακή μολυσματικότητα (Liu *et al.*, 2013).
- * **Αντιγόνα H:** Είναι αντιγόνα πρωτεϊνικής φύσης και συμβολίζονται είτε με αραβικούς αριθμούς, είτε με γράμματα του λατινικού αλφάβητου. Υπάρχουν 114 H αντιγόνα στο μικροοργανισμό *Salmonella* (Liu *et al.*, 2013; McQuiston *et al.*, 2011). Είναι θερμοευαίσθητα και οξυευαίσθητα. Αυτά μεταξύ οροτύπων διαφέρουν ως προς την ποικιλία και τον συνδυασμό αντιγονικών συστατικών και διακρίνονται σε δυο φάσεις. Το βλεφαριδικό αντιγόνο της «φάσεως 1» εμφανίζεται σε λίγα μόνο είδη του μικροοργανισμού και έτσι η φάση αποκαλείται ως ειδική ενώ η «φάση 2» αποτελεί τη μη ειδική καθώς εμφανίζεται σε πολλά είδη. Οι μικροοργανισμοί που βρίσκονται σε μια φάση αποκαλούνται «μονοφασικοί» (π.χ. *S. Enteritidis*), ενώ αυτοί που βρίσκονται και

στις δυο φάσεις «διφασικοί» (π.χ. *S. Typhimurium*). Ωστόσο ορισμένα βακτήρια στερούνται βλεφαρίδων (π.χ. *S. Gallinarum* και *S. Pullorum* (Grimont & Weill, 2007).

- * **Αντιγόνα Vi:** Αυτά τα αντιγόνα πήραν το όνομα τους από τη λέξη virulence (μολυσματικότητα) καθώς αρχικά θεωρήθηκε ότι οφείλονταν για τη μολυσματικότητα των βακτηρίων *Salmonella*. Το αντιγόνο Vi είναι ένα γραμμικό πολυμερές αποτελούμενο από α-1,4-συνδεδεμένο-N-ακετυλο-γαλακτοσαμινουρονικό, η έκφραση του οποίου ελέγχεται από τρεις χρωμοσωμικές γραμμές, *viaA*, *viaB* και *ompB*. Τόσο η περιοχή *viaA* όσο και η περιοχή *viaB* είναι παρούσες στο νησί παθογένειας-7, ένα μεγάλο, γενετικό νησί (Kaur & Jain, 2012). Παρατηρούνται στους παθογόνους για τον άνθρωπο *S. Typhi*, *S. Paratyphi* και *S. Dublin*. Λόγω του ότι λειτουργούν ως περίβλημα του κυτταρικού τοιχώματος, εμποδίζουν την ταυτοποίηση του αντιγόνου O. In vitro μελέτες έχουν δείξει ότι το Vi αντιγόνο αυξάνει το επίπεδο αντίστασης του μικροοργανισμού και την ικανότητα μολυσματικότητας στον ξενιστή (Wain *et al.*, 2005).

1.2 Μικροβιακή Ανάπτυξη, Συνθήκες καταπόνησης και τρόποι επιβίωσης

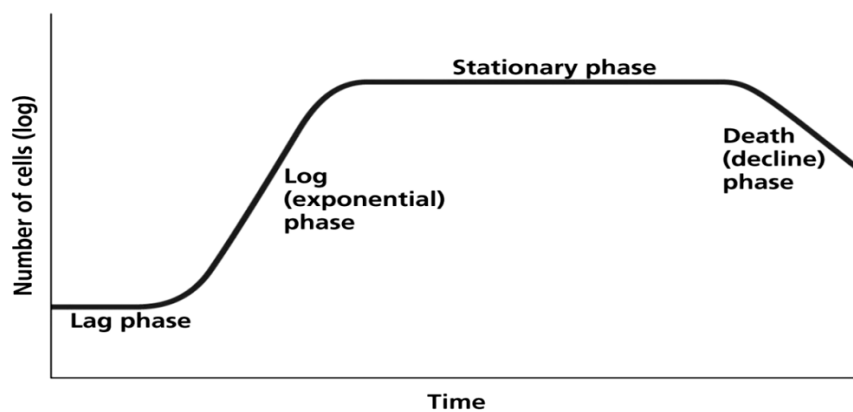
1.2.1 Κινητική ανάπτυξης των κυττάρων

Οι μικροοργανισμοί είναι σε θέση να δημιουργήσουν μεγάλες κοινότητες που προκαλούν θετικά, αρνητικά ή ουδέτερα αποτελέσματα ανάλογα με τον χρόνο και τον τόπο εποίκισμους. Η βακτηριακή φυσιολογία επηρεάζεται από πολλαπλές παραμέτρους οι οποίες μπορούν να αναστείλουν ή να επιταχύνουν την βακτηριακή ανάπτυξη, να παρέμβουν στην επιβίωση ή να προκαλέσουν βακτηριακό θάνατο (Leistner, 2000). Οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες μέθοδοι για την απενεργοποίηση μικροοργανισμών περιλαμβάνουν την εφαρμογή συνθηκών καταπόνησης.

Ο τρόπος ανάπτυξης των μικροοργανισμών αποτελεί απαραίτητο στοιχείο για την πρόβλεψη της αντίδρασής τους σε διάφορες συνθήκες και την αξιολόγηση της μικροβιολογικής ασφάλειας και ποιότητας των τροφίμων. Αυτό είναι εξαιρετικά σημαντικό για τα μικρόβια με μολυσματική δράση. Η ολοκληρωμένη ανάλυση της μικροβιακής ανάπτυξης συνήθως διευκολύνεται από μαθηματικά μοντέλα (Vaidyanathan & Goodacre, 2005).

Η κινητική ενός βακτηριακού πληθυσμού μπορεί να θεωρηθεί ως μια διαδοχή τεσσάρων φάσεων (Achinas *et al.*, 2019; Swinnen *et al.*, 2004) (**Εικόνα 3**):

- **Φάση προσαρμογής:** Τα κύτταρα των μικροοργανισμών προσπαθούν να προσαρμοστούν στο νέο περιβάλλον. Τα κύτταρα δεν αυξάνουν τον πληθυσμό τους (Swinnen *et al.*, 2004).
- **Εκθετική φάση:** Αυτή η φάση ακολουθεί τη φάση υστέρησης. Ο λογάριθμος του βακτηριακού πληθυσμού αυξάνεται εκθετικά με το χρόνο. Αυτός ο πληθυσμός μπορεί να φτάσει σε ένα μέγιστο συγκεκριμένο ρυθμό ανάπτυξης.
- **Στατική φάση:** Σε αυτή τη φάση λόγω της μείωσης της διαθεσιμότητας ή της εξάντλησης θρεπτικών ουσιών, ορισμένα κύτταρα αυξάνουν τον πληθυσμό τους και άλλα πεθαίνουν. Ο ζωντανός πληθυσμός παραμένει σταθερός.
- **Θάνατος ή Φάση μείωσης:** Σε αυτό το στάδιο πεθαίνουν περισσότερα κύτταρα από αυτά που πολλαπλασιάζονται.



Εικόνα 3 Ιδανική καμπύλη ανάπτυξης των βακτηρίων (Achinas *et al.*, 2019; Swinnen *et al.*, 2004).

Η αλλαγή του βέλτιστου περιβάλλοντος για την ανάπτυξη μικροβίων σε ένα λιγότερο ευνοϊκό γι' αυτούς περιβάλλον τείνει να αυξήσει τη διάρκεια της φάσης υστέρησης και να μειώσει τον ρυθμό ανάπτυξης και το μέγεθος του τελικού πληθυσμού που επιβιώνει (Beales, 2004; J. M. Jay *et al.*, 2008).

1.2.2 Μαθηματικά μοντέλα ανάπτυξης

Τα τελευταία χρόνια, το ενδιαφέρον για την ανάπτυξη μαθηματικών μοντέλων που περιγράφουν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών έχει αυξηθεί καθώς μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την προσομοίωση της επίδρασης των περιβαλλοντικών συνθηκών στην ανάπτυξη των κινητικών παραμέτρων. Η θερμοκρασία και το pH είναι οι κύριοι περιβαλλοντικοί παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη, οι οποίοι μελετώνται περισσότερο λόγω της σπουδαιότητάς τους στη θεμελιώδη έρευνα (ταξινόμηση, μικροβιακός

μεταβολισμός) και της πρακτικής τους σημασίας (έλεγχος της βιοτεχνολογίας και ασφαλούς χειρισμού των προϊόντων, ειδικά στη γεωργία και τις βιομηχανίες τροφίμων).

Τα μοντέλα μικροβιακής ανάπτυξης συνήθως περιγράφουν την διακύμανση στον μέγιστο ειδικό ρυθμό ανάπτυξης (μ_{\max}), ο οποίος αποτελεί αντανάκλαση της μεταβολικής δραστηριότητας των μικροοργανισμών (Rosso *et al.*, 1995). Αρκετοί συγγραφείς έχουν προτείνει μοντέλα για να περιγράψουν τα συνδυασμένα αποτελέσματα θερμοκρασίας και pH στο μ_{\max} (McKellar & Lu, 2003; Rosso *et al.*, 1995).

Τα μοντέλα χωρίζονται σε πρωτογενή, δευτερογενή και τριτογενή. Ένα πρωτογενές μοντέλο ανάπτυξης μικροβίων έχει ως στόχο να περιγράψει την κινητική της διεργασίας (χρόνος γενεάς, μ_{\max} , διάρκεια της φάσης προσαρμογής, μέγιστη πυκνότητα πληθυσμού) με όσο το δυνατόν λιγότερες παραμέτρους, ενώ παράλληλα είναι σε θέση να προσδιορίσει με ακρίβεια τα διαφορετικά στάδια ανάπτυξης (**Εικόνα 3**) (McKellar & Lu, 2003). Τα μοντέλα που περιγράφουν την επίδραση των περιβαλλοντικών συνθηκών, π.χ. φυσικών, χημικών και βιοτικών χαρακτηριστικών, στις τιμές των παραμέτρων ενός πρωτογενούς μοντέλου ορίζονται ως «δευτερογενή» (Ross & Dalgaard, 2004). Τα τριτογενή μοντέλα αποτελούν λογισμικά που ενσωματώνουν τα πρωτογενή και τα δευτερογενή μοντέλα (McKellar & Lu, 2003).

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιείται ένα δευτερογενές μοντέλο που κατηγοριοποιείται στα Μοντέλα Θεμελιωδών Παραμέτρων (Cardinal Parameters Models, CPMs). Η βασική ιδέα πίσω από τα CPM είναι η χρήση παραμέτρων μοντέλων που έχουν μια βιολογική ή γραφική ερμηνεία. Όταν τα μοντέλα προσαρμόζονται σε πειραματικά δεδομένα με μη γραμμική παλινδρόμηση, αυτό έχει ως πλεονέκτημα ότι οι κατάλληλες αρχικές τιμές είναι εύκολο να προσδιοριστούν. Τα CPM βασίζονται στην παραδοχή ότι η ανασταλτική επίδραση των περιβαλλοντικών παραγόντων είναι πολλαπλασιαστική. Έτσι, τα CPM αποτελούνται από ένα διακριτό όρο για κάθε περιβαλλοντικό παράγοντα, με κάθε έναν από τους όρους να εκφράζεται ως ο ρυθμός ανάπτυξης σε σχέση με εκείνον όταν αυτός ο παράγοντας είναι βέλτιστος. Οι τιμές του κάθε όρου κυμαίνονται μεταξύ 0 και 1. Στις βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης όλοι οι όροι έχουν τιμή 1 και έτσι το μ_{\max} είναι ίσο με το μ_{opt} (Ross & Dalgaard, 2004).

Οι εξισώσεις **(1.1)** έως **(1.3)** αποτελούν ένα παράδειγμα CPM που περιλαμβάνει την επίδραση της θερμοκρασίας (T), της ενεργότητας ύδατος (a_w), του pH, των ανασταλτικών ουσιών (c_i) και των ποιοτικών παραγόντων (k_j) στο μ_{\max} , όπως παρουσιάστηκε από τους Augustin και Carlier, το 2000 (Augustin & Carlier, 2000a, 2000b).

$$\mu_{\max} = \mu_{opt} \cdot CM_2(T) \cdot CM_2(a_w) \cdot CM_1(pH) \cdot \prod_{i=1}^n \gamma(c_i) \cdot \prod_{j=1}^p k_j \quad (1.1)$$

$$CM_n = \begin{cases} 0, & X \leq X_{\min} \\ \frac{(X - X_{\max}) \cdot (X - X_{\min})^n}{(X_{opt} - X_{\min})^{n-1} \cdot [(X_{opt} - X_{\min}) \cdot (X - X_{opt}) - (X_{opt} - X_{\max})] \cdot ((n-1) \cdot X_{opt} + X_{\min} - n \cdot X)}, & X_{\min} < X < X_{\max} \\ 0, & X \geq X_{\max} \end{cases} \quad (1.2)$$

$$\gamma(c_i) = \begin{cases} (1 - c_i / MIC_i)^2, & c_i < MIC_i \\ 0, & c_i \geq MIC_i \end{cases} \quad (1.3)$$

όπου το X είναι θερμοκρασία, η a_w ή το pH. Τα X_{\min} και X_{\max} είναι αντίστοιχα οι τιμές του X_i κάτω και πάνω από τις οποίες δεν παρατηρείται ανάπτυξη, το X_{opt} είναι η τιμή στην οποία το μ_{\max} είναι ίσο με τη βέλτιστη τιμή μ_{opt} . Το MIC_i είναι η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση συγκεκριμένων ενώσεων πάνω από τις οποίες δεν παρατηρείται ανάπτυξη.

Στο πλαίσιο της προορητικής μικροβιολογίας αναπτύχθηκαν διάφορα μοντέλα CPM κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του 1990. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το μοντέλο του Rosso, για την ποσοτικοποίηση της επίδρασης του pH στις κινητικές παραμέτρους της ανάπτυξης του μικροοργανισμού *Salmonella* spp. (Rosso *et al.*, 1995; Rosso *et al.*, 1993).

$$\mu_{\max} = \mu_{opt} * \tau(T) * \gamma(a_w) * \rho(pH) \quad (1.4)$$

$$\tau(T) = \frac{(T - T_{\min})^2 (T - T_{\max})}{(T_{opt} - T_{\min}) \left[(T_{opt} - T_{\min})(T - T_{opt}) - (T_{opt} - T_{\max})(T_{opt} + T_{\min} - 2T) \right]} \quad (1.5)$$

$$\gamma(a_w) = \frac{(a_w - a_{w_{\min}})^2 (a_w - a_{w_{\max}})}{(a_{w_{opt}} - a_{w_{\min}}) \left[(a_{w_{opt}} - a_{w_{\min}})(a_w - a_{w_{opt}}) - (a_{w_{opt}} - a_{w_{\max}})(a_{w_{opt}} + a_{w_{\min}} - 2a_w) \right]} \quad (1.6)$$

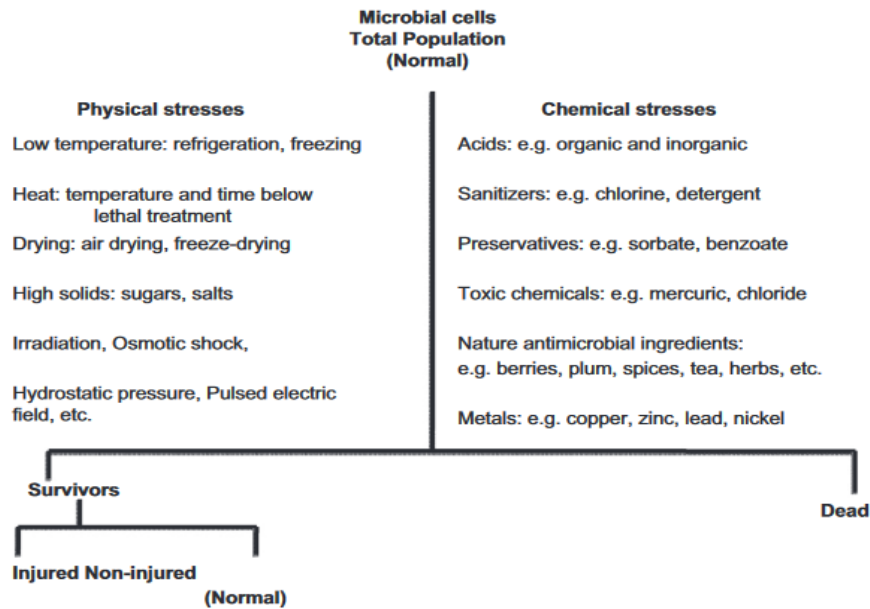
$$\rho(pH) = \frac{(pH - pH_{\min})^2 (pH - pH_{\max})}{(pH_{opt} - pH_{\min}) \left[(pH_{opt} - pH_{\min})(pH - pH_{opt}) - (pH_{opt} - pH_{\max})(pH_{opt} + pH_{\min} - 2pH) \right]} \quad (1.7)$$

όπου μ είναι ο ρυθμός ανάπτυξης, μ_{opt} είναι ο ρυθμός ανάπτυξης υπό άριστες συνθήκες, $\tau(T)$, $\rho(pH)$ και $\gamma(a_w)$ είναι οι παράγοντες Rosso για τη θερμοκρασία, το pH και το a_w , αντίστοιχα, T_{min} και T_{max} είναι η ελάχιστη και η μέγιστη θερμοκρασία ανάπτυξης, αντίστοιχα, pH_{min} και pH_{max} είναι το ελάχιστο και το μέγιστο pH ανάπτυξης, αντίστοιχα, και a_{wmin} είναι το ελάχιστο a_w ανάπτυξης.

1.2.3 Καταπονήσεις και «Θεωρία των εμποδίων»

Κατά την επεξεργασία των τροφίμων αναπτύσσονται νέα περιβάλλοντα για τους μικροοργανισμούς που βρίσκονται σε αυτά ως φυσικές, χημικές ή βιολογικές καταπονήσεις (Εικόνα 4). Οι φυσικές καταπονήσεις μπορούν να προκληθούν από διακυμάνσεις της θερμοκρασίας, πίεσης, ακτινοβολίας, οσμωτικού στρες, ενώ οι χημικές καταπονήσεις περιλαμβάνουν τη χρήση χημικών ενώσεων όπως οξέα, άλατα, συντηρητικά και άλλα αντιμικροβιακά αντιδραστήρια. Τέλος, ο όρος βιολογικό στρες, αναφέρεται στον μικροβιακό ανταγωνισμό και τον συναγωνισμό (Chen, 2017).

Ανάλογα με την έντασή τους, τα βακτηριακά στρες μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις διαφορετικές κατηγορίες, ως ήπια (mild), μέτρια (moderate), ή ακραία (severe). Οι ήπιες καταπονήσεις οδηγούν σε διακοπή ή μείωση του ρυθμού ανάπτυξης, ενώ οι μέτριες έχουν πιο σοβαρή επίδραση, με αποτέλεσμα την απώλεια κυτταρικής βιωσιμότητας. Σε περιπτώσεις ακραίας καταπόνησης το ποσοστό βακτηριακής θνησιμότητας είναι υψηλότερο, με σοβαρές απειλές για το κύτταρο που οδηγούν στο θάνατο της πλειοψηφίας του πληθυσμού (lethal stresses) (Yousef & Juneja, 2002).



Εικόνα 4 Η επίδραση φυσικών και χημικών καταπονήσεων στα μικροβιακά κύτταρα (Wu, 2008).

Η εφαρμογή συνθηκών καταπόνησης όπως η μεταβολή της θερμοκρασίας, του pH, του a_w κ.λπ. αποτελούν τρόπους ελέγχου της βακτηριακής επιβίωσης. Αν και η εφαρμογή μιας από αυτές τις καταπονήσεις μπορεί να επηρεάσει την ανάπτυξη των μικροβίων, αρκετές μελέτες αναφέρονται σε μια πιο αποτελεσματική προσέγγιση, που αναφέρεται ως «*Τεχνολογία των Εμποδίων (Hurdle Technology)*». Αποτελεί μια εφαρμογή που συνδυάζει ανασταλτικούς παράγοντες (π.χ. θερμοκρασία, pH, Eh κ.λπ.) για μια ήπια αλλά αποτελεσματική συντήρηση των τροφίμων. Η γενική λογική της τεχνολογίας εμπόδιο είναι η εφαρμογή των «διαφορετικών εμποδίων χαμηλής έντασης κάθε φορά», αντί «ένα εμπόδιο υψηλής έντασης». Διαφορετικά εμπόδια, που στοχεύουν διαφορετικές παραμέτρους ταυτόχρονα, μπορεί να δημιουργήσουν μια συνεργατική αποδιοργάνωση στην ομοίωση των μικροοργανισμών. Αυτό θα μπορούσε να είναι πιο αποτελεσματικό στην εξάλειψη του μικροοργανισμού σε σύγκριση με την εφαρμογή ενός έντονου εμποδίου (Leistner, 2000).

1.2.3.1 *Salmonella* spp. σε αντίξοες συνθήκες

Καταπόνηση με μεταβολή του pH

Οι τεχνικές που βασίζονται σε μεταβολές του pH, χρησιμοποιούνται συνήθως στην επεξεργασία τροφίμων για την ενίσχυση της γεύσης και την διαρκέστερη συντήρησή τους (Abee & Wouters, 1999; Lund *et al.*, 2014).

Οι μικροοργανισμοί μπορούν να αναπτυχθούν σε ένα ευρύ φάσμα pH, αλλά συνήθως βέλτιστες γι' αυτούς τιμές pH αποτελούν οι τιμές γύρω στο 7 (pH=6.6-7.5) ενώ ορισμένοι

μπορούν να αναπτυχθούν κάτω από το $\text{pH}=4$. Σύμφωνα με τις προτιμήσεις των βακτηρίων ως προς το pH , μπορούν να διαιρεθούν σε οξινόφιλα (κάτω από $\text{pH}=7$), ουδετερόφιλα (γύρω από το $\text{pH}=7$) και αλκαλόφιλα (pH υψηλότερα από $\text{pH}=7$) (Moat *et al.*, 2002). Τα βακτήρια και ειδικά τα παθογόνα, επηρεάζονται σε μεγάλο βαθμό από τις τιμές pH σε σύγκριση με τους μύκητες και τις ζύμες που τείνουν να είναι λιγότερο ευαίσθητες (J. M. Jay *et al.*, 2008). Τα περισσότερα από αυτά τα βακτήρια είναι ουδετερόφιλα ($\text{pH}= 6.5-7.0$) (Lund *et al.*, 2014).

Όσον αφορά το μικροοργανισμό *Salmonella* spp. έρχεται αντιμέτωπος με διαφορετικές καταπονήσεις, στο περιβάλλον, καθώς και στο γαστρεντερικό σωλήνα των ξενιστών του. Μετά την κατανάλωση τροφίμων στα οποία παρευρίσκεται, εκτίθεται σε ακραίο στομαχικό pH , και αργότερα σε χολικά άλατα, υψηλή όσμωση και χαμηλή περιεκτικότητα οξυγόνου στο έντερο. Επιπλέον, ο ανταγωνισμός για θρεπτικές ουσίες με γαστρεντερικά βακτήρια και με τους μεταβολίτες με αντιμικροβιακή δράση που παράγουν εκείνοι, αποτελούν σημαντική πρόκληση. Ως εκ τούτου, η ικανότητα αίσθησης και αντίδρασης σε περιβαλλοντικές αλλαγές είναι κρίσιμη για τον κύκλο ζωής του. Ο μικροοργανισμός έχει αναπτύξει διάφορα ρυθμιστικά δίκτυα σχεδιασμένα για την προστασία της σε δυσμενείς συνθήκες pH γνωστές και ως Αντίδραση Όξινης Ανοχής (ATR-Acid Tolerance Response). Το ATR μπορεί να οριστεί ως η αντοχή που προκαλείται σε φυσιολογικά θανατηφόρο χαμηλό pH (πρόκληση οξέος) μετά την ανάπτυξη σε μετρίως χαμηλό pH , ή μετά από έκθεση σε ήπιες συνθήκες οξέος (προσαρμογή οξέος)(Álvarez-Ordóñez *et al.*, 2012; Foster & Hall, 1990).

Οι Foster και Hall (1990) χρησιμοποίησαν υδροχλωρικό οξύ για να εμβολιάσουν τον μικροοργανισμό σε θρεπτικά μέσα με μια ποικιλία τιμών pH (7.0, 6.3, 6.1, 5.9 και 5.7) και έδειξαν ότι η προστασία της ATR αυξήθηκε καθώς το pH μειωνόταν (Foster & Hall, 1990). Οι Koutsoumanis *et al.*, 2003 έδειξαν ότι καλλιέργειες *S. Typhimurium* που βρίσκονταν στη στατική φάση και εκτέθηκαν για μικρές χρονικές περιόδους σε μέτρια όξινες συνθήκες ανέπτυξαν ATR (Koutsoumanis & Sofos, 2004). Ο Greenacre *et al.* (2003) ανέφερε ότι η προσαρμογή του οξέος επιτεύχθηκε με σύντομη έκθεση (1 έως 6 ώρες) σε διάφορα pH (5.0, 5.5 και 5.8) παρουσία οξικού και γαλακτικού οξέος. Αποδείχθηκε υψηλότερη ανοχή οξέος για τα κύτταρα που εκτέθηκαν σε pH 5.5 τόσο με οξικό και όσο και με γαλακτικό οξύ (Greenacre *et al.*, 2003). Σε μια άλλη μελέτη, διερευνήθηκαν οι διαφορές των μέγιστων τιμών ειδικού ρυθμού ανάπτυξης (Maximum specific growth rate- μ_{max} values). Η μεταβλητότητα του μ_{max} μεταξύ των στελεχών *S. Enterica* ήταν σημαντική και αυξήθηκε καθώς οι συνθήκες ανάπτυξης έγιναν πιο αντίξοες ως προς το pH όσο και το NaCl (Lianou & Koutsoumanis, 2011).

Απολυμαντικά

Η καθαριότητα (cleaning) είναι απαραίτητη στις εγκαταστάσεις επεξεργασίας τροφίμων. Ο καθαρισμός καθιστά φυσικά καθαρές επιφάνειες, δηλαδή να μην υπάρχουν ορατά απόβλητα, ξένα σώματα ή λάσπη στις επιφάνειες του εξοπλισμού. Χημικά δε, καθαρές επιφάνειες είναι εκείνες από τις οποίες έχουν αφαιρεθεί ανεπιθύμητα χημικά κατάλοιπα, ενώ οι μικροβιολογικά καθαρές επιφάνειες υποδηλώνουν την ελευθερία από την αλλοίωση των μικροβίων και των παθογόνων (Gould, 1994; Wirtanen & Salo, 2003).

Η απολύμανση (disinfecting) και η εξυγίανση (sanitizing) περιλαμβάνει τη θανάτωση μικροβίων σε μια επιφάνεια ή ένα αντικείμενο με στόχο τη μείωση του μικροβιακού πληθυσμού σε επίπεδο που θα ελαττώσει το ενδεχόμενο μόλυνσης των τροφίμων ώστε να είναι ασφαλέστερα για τους καταναλωτές. Γενικά, ο στόχος των απολυμαντικών είναι να αδρανοποιούν τους μη σπορογόνους παθογόνους μικροοργανισμούς, για να μειώσουν το συνολικό βακτηριακό φορτίο (Sansebastiano *et al.*, 2007; Wirtanen & Salo, 2003). Τα απολυμαντικά πρέπει να έρχονται σε επαφή με μια επιφάνεια ή ένα αντικείμενο για ένα συγκεκριμένο χρονικό διάστημα (που ονομάζεται «χρόνος παραμονής») προκειμένου να απομακρυνθούν αποτελεσματικότερα ορισμένα μικρόβια. Τα απολυμαντικά για να δρουν σωστά, η περιοχή πρέπει πρώτα να έχει καθαριστεί (Sansebastiano *et al.*, 2007). Επίσης, η αύξηση της θερμοκρασίας αντιστοιχεί γενικά σε αύξηση της ταχύτητας αντίδρασης των απολυμαντικών. Η απολύμανση πραγματοποιείται συνήθως με ουδέτερο pH, παρόλο που ένα όξινο pH βελτιώνει την αποτελεσματικότητα των απολυμαντικών με οξειδωτικές ιδιότητες.

Τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα απολυμαντικά στη βιομηχανία τροφίμων είναι τα αλογόνα (υποχλωριώδους, διοξειδίου του χλωρίου και ιώδιο), τα υπεροξειδία (συμπεριλαμβανομένου του υπεροξειδίου του υδρογόνου και του υπεροξικού οξέος), οι επιφανειοδραστικές ουσίες που περιλαμβάνουν κατιονικές ουσίες με απολυμαντικά χαρακτηριστικά και τις αμφοτερικές (amphotheric) επιφανειοδραστικές ουσίες που αποτελούν διακριτές απολυμαντικές ουσίες. (Sansebastiano *et al.*, 2007). Τα απολυμαντικά είναι αμφίφιλα μόρια, φέρουν μία υδρόφιλη κεφαλή και μία υδρόφοβη ουρά από υδρογονάνθρακες. Τα υδρόφιλα μόρια της κεφαλής καθορίζουν εάν η ουσία είναι ανιονική, κατιονική, μη ιονική ή αμφοτερική γεγονός που καταδεικνύει τον τρόπο δράσης της (McDonnell & Russell, 1999). Ορισμένα από αυτά παρουσιάζονται στον **Πίνακα 4** (Wirtanen & Salo, 2003).

Είδος απολυμαντικού	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
Αλκοόλες (Alcohols)	Μη τοξικό, εύκολο στη χρήση, άχρωμο, ακίνδυνο στο δέρμα, διαλυτό σε νερό, πτητικό	Αναποτελεσματικά έναντι σπορίων
Υπεροξικό οξύ (Peracetic acid)	Αποτελεσματικό σε χαμηλή συγκέντρωση, ευρύ μικροβιακό φάσμα, σκοτώνει σπόρους, διεισδύει σε βιοϋμένια, μη τοξικό (οξικό οξύ και νερό)	Διαβρωτικό, ασταθές, μη συμβατό με το χλώριο, καταναλώνεται από θειούχα και σουλφίδια, μειωμένη κατά το ήμισυ διάρκεια ζωής πάνω από pH 8.5, ταχεία αποσύνθεση στην παρουσία μετάλλου (Sansebastiano <i>et al.</i> , 2007).
Χλώριο (Chlorine)	Αποτελεσματική σε χαμηλή συγκέντρωση, ευρύ μικροβιακό φάσμα, εύκολο στη χρήση, υποστηρίζει μικροβιακή αποκόλληση, φθηνό	Τοξικά υποπροϊόντα, ανάπτυξη προσαρμογής, υπολείμματα, διαβρωτικό, προκαλεί αποχρωματισμό, εκρηκτικό αέριο
Υποχλωριώδες (Hypochlorite)	Φθηνό, αποτελεσματικό σε ένα ευρύ μικροβιακό φάσμα, εύκολο στη χρήση, υποστηρίζει την αποκόλληση	Ασταθής, τοξική, οξειδωτική, διαβρωτική, ταχεία αναγέννηση, αποχρωματισμός των προϊόντων
Παράγοντες του τεταρτοταγούς αμμωνίου (Quaternary ammonium agents)	Αποτελεσματικοί, μη τοξικοί, αποτρέπουν την αναγέννηση των κυττάρων, υποστηρίζουν τη μικροβιακή αποκόλληση, μη ερεθιστικοί, μη διαβρωτικοί, άοσμοι	Αδρανοποιημένοι σε χαμηλό pH και με άλατα (Ca^{2+} και Mg^{2+}), ανάπτυξη προσαρμογής μικροοργανισμών

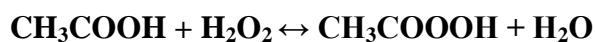
Πίνακας 4 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα ορισμένων απολυμαντικών που χρησιμοποιούνται στην παραγωγή τροφίμων (Wirtanen & Salo, 2003).

Η βακτηριοστατική τους δράση ξεκινά όταν η ουσία χρησιμοποιείται πέρα από την ελάχιστη συγκέντρωση, κάτω από την οποία δεν παρατηρείται δράση της ενεργούς ουσίας ακόμα και αν η εφαρμογή γίνεται σε μεγάλο χρονικό διάστημα. Η συγκέντρωση αυτή αποκαλείται Ελάχιστη Ανασταλτική Συγκέντρωση (Minimum Inhibitory Concentration-MIC) (Tamburro *et al.*, 2015).

Συγκεκριμένα, στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε η χρήση των παρακάτω απολυμαντικών:

PAA

Το υπεροξυδικό οξύ (Peroxyacetic acid-C₂H₄O₃) είναι δημοφιλές με διάφορα ονόματα ως υπεροξικό οξύ (Peracetic Acid), ακετυλουπεροξειδίο (Acetyl Hydroperoxide), οξικό υπεροξειδίο (Acetic Peroxide), Desoxon, Persan κ.α. και αποτελεί ένα υδατικό μίγμα οξικού οξέος και υπεροξειδίου του υδρογόνου. Στις διάφορες εμπορικές λύσεις που διατίθενται στην αγορά, το υπεροξικό οξύ προέρχεται από την αντίδραση ισορροπίας μεταξύ 15-20% οξικού οξέος και υπεροξειδίου του υδρογόνου, σύμφωνα με την ακόλουθη αντίδραση (Gawande *et al.*, 2013):



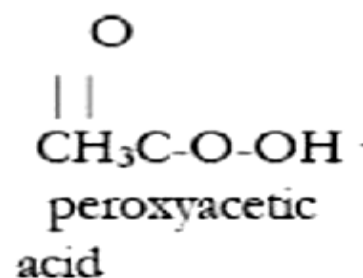
Το υγρό PAA είναι διαυγές και άχρωμο χωρίς αφρώδες δυναμικό και έχει έντονη οσμή οξικού οξέος. Έχει όξινο pH=2.8 και ζυγίζει 0,924 kg/cm³. Είναι αποτελεσματικό και σταθερό σε τιμές pH από 1 έως 9, με ελαφρώς αυξημένο ρυθμό υδρόλυσης πάνω από pH 8.3 (Gawande *et al.*, 2013). Το υπεροξικό οξύ έχει μεγαλύτερη οξειδωτική ικανότητα σε όξινες τιμές pH, αν και για πρακτικούς σκοπούς η απολύμανση πραγματοποιείται σε ουδέτερες τιμές pH (Sansebastiano *et al.*, 2007). Η αποτελεσματικότητά του δεν επηρεάζεται από χαμηλές θερμοκρασίες (T=2°C) για τους περισσότερους μικροοργανισμούς, αποσυντίθεται όμως εντελώς σε νερό και οξυγόνο σε θερμοκρασία πάνω από 73°C (Gawande *et al.*, 2013).

Το υπεροξικό οξύ είναι ένα απολυμαντικό με ένα ευρύ φάσμα δράσης, δεδομένου ότι μπορεί να δράσει σε Gram+ και Gram- βακτήρια, σε ζύμες και μύκητες, ενώ είναι δραστικά και κατά των σπορίων και των ιών σε περιβαλλοντικές θερμοκρασίες (Humayoun *et al.*, 2018; Sansebastiano *et al.*, 2007).

Σε σύγκριση με άλλα απολυμαντικά, όπως το χλώριο, έχει το πλεονέκτημα ότι δεν επηρεάζεται ιδιαίτερα από την παρουσία οργανικών ουσιών και δεν σχηματίζει υποπροϊόντα τοξικών αντιδράσεων, εκτός από πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις και, ως εκ τούτου, αμελητέες (Humayoun *et al.*, 2018).

Το συγκεκριμένο απολυμαντικό είναι οξειδωτικό και μειώνεται με την επακόλουθη απελευθέρωση του ενεργού οξυγόνου (O₂), είναι διαλυτό σε νερό και σε λίπος, και δεδομένου ότι δεν αδρανοποιείται από τα κυτταρικά ένζυμα και, ως εκ τούτου, από τα βακτήρια, είναι εξαιρετικά αποτελεσματικό στην μικροβιοκτόνο δραστηριότητά του. Δρα στις σουλφιδικές ομάδες πρωτεϊνών και αμινοξέων, καθώς και στους κυτταρικούς χημειοσμητικούς μηχανισμούς, καθορίζοντας έτσι την αποκατάσταση των βακτηριακών και

Εικόνα 5 Δομή του υπεροξικού οξέος (Gawande *et al.*, 2013).



ιογενών πρωτεϊνών ή τη θραύση της εξωτερικής τους επένδυσης (Humayoun *et al.*, 2018). Διεισδύει στο κυτταρικό τοίχωμα και την κυτταρική μεμβράνη και δρα οξειδώνοντας τα ομόλογα H-S και S-S στο ένζυμο του κυττάρου. Ο μηχανισμός της οξείδωσης είναι η μεταφορά των ηλεκτρονίων, επομένως όσο ισχυρότερη είναι η οξείδωση, τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται ταχύτερα στον μικροοργανισμό και τόσο γρηγορότερα αδρανοποιείται ή θανατώνεται ο μικροοργανισμός (Gawande *et al.*, 2013).

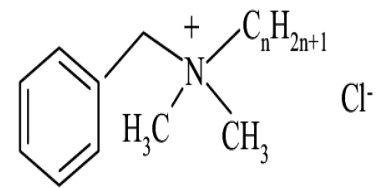
Το PAA χρησιμοποιήθηκε πρώτη φορά σε άμεση επαφή με φρούτα και λαχανικά για την μείωση της αλλοίωσης τους από βακτήρια. Χρησιμοποιείται για την απολύμανση, την βελτίωση της οσμής και την εξάλειψη των βιοϋμενίων σε επιφάνειες επαφής με τα τρόφιμα και ως μικροβιακός παράγοντας ελέγχου στη βιομηχανία τροφίμων, όπου χρησιμοποιείται ως απολυμαντικό για την αποστείρωση ανοξειδωτού χάλυβα και γυάλινων δεξαμενών, σωληνώσεων, φορητών, γραμμών εμφιάλωσης για γυαλί ή πλαστικά μπουκάλια, γραμμών παστερίωσης (Gawande *et al.*, 2013; Humayoun *et al.*, 2018; Sansebastiano *et al.*, 2007). Χρησιμοποιείται ευρέως και στο στάδιο του CIP (Clean-in-Place) της απολύμανσης. Για την εξάλειψη, ή τουλάχιστον τη μείωση στο σχηματισμό των βακτηριακών μητρών και βιοϋμενίων, χρησιμοποιείται 0.1 έως 0.5% υπεροξικό οξύ (Humayoun *et al.*, 2018).

Διάφορες μελέτες που διεξήχθησαν υπό πειραματικές συνθήκες σχετικά με τις βακτηριοκτόνες επιδράσεις του οξέος τόνισαν την αποτελεσματικότητά του έναντι των βακτηρίων σε συγκεντρώσεις που είναι γενικά χαμηλότερες από 100 ppm με χρόνο επαφής 5 λεπτά. Ωστόσο, απαιτούνται πολύ υψηλότερες συγκεντρώσεις για να επιτευχθεί αδρανοποίηση των σπόρων, από 500 έως 30000 ppm για τους χρόνους επαφής που κυμαίνονται από 15 δευτερόλεπτα έως 15 λεπτά σε περιβαλλοντικές θερμοκρασίες (Baldry, 1983; Humayoun *et al.*, 2018). Σύμφωνα με το CDC, το PAA αδρανοποιεί τόσο τα θετικά όσο και τα αρνητικά Gram βακτήρια, καθώς και τους μύκητες, και τις ζύμες σε λιγότερο από 5 λεπτά στα 100 ppm (CDC, 2008). Στη μελέτη που ολοκλήρωσαν οι Humayoun *et al.*, 2018, το 75% των απομονώσεων *Salmonella* spp. ήταν ευαίσθητα σε 880 $\mu\text{g ml}^{-1}$ και το υπόλοιπο 25% ήταν ευαίσθητα στο 1.760 $\mu\text{g ml}^{-1}$, το οποίο είναι υψηλότερο από το συνιστώμενο από το CDC (Humayoun *et al.*, 2018). Αυτό μπορεί να οφείλεται στην παρουσία υψηλής οργανικής ύλης στο ζωμό ΜΗ που χρησιμοποιήθηκε κατά το πείραμα, καθώς έχει αναφερθεί ότι η αντιβακτηριακή δραστηριότητα του PAA μπορεί να μειωθεί παρουσία οργανικής ύλης (Inatsu *et al.*, 2005).

BC

Το χλωριούχο βενζαλκόνιο (Benzalkonium chloride- $C_{21}H_{38}NCl$) είναι ένας είδος κατιονικού απολυμαντικού. Το pH του κυμαίνεται από 5 έως 8 για ένα 10% w/v υδατικό διάλυμα. Έχει αντιμικροβιακή αποτελεσματικότητα ένα μεγάλο εύρος pH (pH 4-10) ενώ το υψηλό pH προκαλεί την αρνητική φόρτιση του μικροβιακού κυτταρικού τοιχώματος, ευνοώντας έτσι τη σύνδεση των κατιονικών ειδών (Rowe *et al.*, 2006).

Εικόνα 6 Δομή χλωριούχου βενζαλκόνιου (Blazheyevskiy & Kovalska, 2017).



$$n = 8, 10, 12, 14, 16, 18$$

Είναι μίγμα άλκυλβένζυλδιμεθυλαμμωνιακών χλωριδίων με τις αλκυλικές ομάδες να έχουν μήκος 12, 14 και 16 άτομα άνθρακα (Kampf, 2018). Αποτελείται από 24 ενώσεις που είναι παρόμοιες δομικά με τις ενώσεις τεταρτοταγούς αμμωνίου («Quats-QACs»). Τα QACs είναι κατιονικά (Tamburro *et al.*, 2015) και δρουν μεταβάλλοντας την διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης των μικροοργανισμών με αποτέλεσμα την αποδιοργάνωση της λιπιδικής διπλοστιβάδας και την διαρροή των κυτταρικών συστατικών. Ταυτόχρονα αποδομούνται οι πρωτεΐνες και τα νουκλεϊκά οξέα και τα αυτολυτικά ένζυμα λύουν το κυτταρικό τοίχωμα (McDonnell & Russell, 1999).

Το Benzalkonium Chloride χρησιμοποιείται για την απολύμανση επιφανειών στην ανθρώπινη και κτηνιατρική υγειονομική περίθαλψη. Έχει χρήση κυρίως ως αντισηπτικό στην βιομηχανία τροφίμων για την συντήρηση των τροφίμων, ως συστατικό φαρμάκων, ως δερματικό αντισηπτικό και ως συστατικό προϊόντων ατομικής υγιεινής (Fazlara & Ekhtelat, 2012; Kampf, 2018). Τα απολυμαντικά επιφανείας που βασίζονται στο BC είναι συχνά διαθέσιμα ως συμπυκνώματα και χρησιμοποιούνται συνήθως σε αραιώσεις προϊόντος 0,5% ή 0,25%. Η τελική συγκέντρωση BC για χρήση μπορεί να είναι 500 ppm σε αυτά τα παραδείγματα, εάν το συμπύκνωμα ήταν με βάση το 20.000 ppm BC. Η συγκέντρωση στα αντισηπτικά του δέρματος έχει περιγραφεί ότι είναι ακόμη χαμηλότερη στα 250 ppm (Kampf, 2018).

Σύμφωνα με τη μελέτη των Kang *et al.*, 2019., όπου 5 QACs χρησιμοποιήθηκαν για το πλύσιμο φύλλων σπανακιού για την απομάκρυνση των μικροοργανισμών *E. coli O157:H7*, *S. Typhimurium*, *L. monocytogenes*, η συγκέντρωσή τους καθορίστηκε να είναι μεταξύ 10 και 80 ppm (Kang *et al.*, 2019). Τα απολυμαντικά έδειξαν να είναι αποτελεσματικά πρωτίστως ως προς το μικροοργανισμό *L. monocytogenes*. Τα αποτελέσματα αυτά είναι συμβατά με τα αποτελέσματα προηγούμενων μελετών, υποδεικνύοντας ότι τα QACs είναι πιο αποτελεσματικά ως προς τα Gram+ από ότι τα Gram- βακτήρια (Meireles *et al.*, 2016). Το

MIC για το μικροοργανισμό *S. Typhimurium* βρέθηκε να είναι η συγκέντρωση 39.1 ppm BC που αποτελούσε σημαντικά μεγαλύτερα συγκέντρωση σε σχέση με την τιμή 2.4 ppm που ήταν ικανή να αποτρέψει την ανάπτυξη για το μικροοργανισμό *L. monocytogenes*. Σε μια άλλη μελέτη (Long *et al.*, 2016), όπου ελέγχθηκε η ευαισθησία 195 απομονώσεων *Salmonella* σε 4 απολυμαντικά, φάνηκε ότι ο ορότυπος *Salmonella* Enteritidis ήταν περισσότερο ανθεκτικός (128 mg l^{-1}) στο BC σε σχέση με τις άλλες απομονώσεις και τα άλλα απολυμαντικά. Οι υπόλοιποι ορότυποι (*Salmonella* Derby, *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Braenderup, *Salmonella* Jerusalem, και άλλοι ορότυποι) είχαν MIC σε συγκέντρωση 64 mg l^{-1} BC. Σύμφωνα με τους Fazlara & Ekhtelat, 2012, το MIC για το μικροοργανισμό *S. Typhimurium* ήταν 80 mg/l (Fazlara & Ekhtelat, 2012).

Στόχος	Αντισηπτικό ή απολυμαντικό	Μηχανισμός δράσης
Κυτταρικό περίβλημα (κυτταρικό τοίχωμα, Εξωτερική μεμβράνη)	Glutaraldehyde, other permeabilizers	Διασταυρούμενη σύνδεση πρωτεϊνών EDTA, Gram-αρνητικά βακτήρια: απομάκρυνση του Mg^{2+} , απελευθέρωση ορισμένων LPS
Κυτταρική (εσωτερική) μεμβράνη	QACs Chlorhexidine Diamines, PHMB, alexidine Phenols	Γενικευμένη βλάβη μεμβράνης που περιλαμβάνει στρώματα φωσφολιπιδίων Οι χαμηλές συγκεντρώσεις επηρεάζουν την ακεραιότητα της μεμβράνης, υψηλές συγκεντρώσεις προκαλούν την ανάφλεξη του κυτταροπλάσματος Επαγωγή διαρροής αμινοξέων Διαχωρισμός φάσης και σχηματισμός τομέων των λιπιδίων της μεμβράνης Διαρροή: κάποια προκαλούν αποσύζευξη
Διασταυρούμενη σύνδεση μακρομορίων	Formaldehyde Glutaraldehyde	Διασταυρούμενη σύνδεση πρωτεϊνών, RNA και DNA Διασταυρούμενη σύνδεση πρωτεϊνών στο κυτταρικό περίβλημα και σε άλλα σημεία του κυττάρου
Παρεμβολή DNA	Acridines	Παρεμβολή ενός μόριου απυριδίνης μεταξύ δύο στρωμάτων ζευγών βάσεων στο DNA
Αλληλεπίδραση μεθειόλες	Silver compounds	Ένζυμα που δεσμεύονται στη μεμβράνη (αλληλεπίδραση μεθειόλες)
Επιδράσεις στο DNA	Halogens Hydrogen peroxide, silver ions	Αναστολή της σύνθεσης του DNA Σπάσιμο σκέλους DNA
Οξειδωτικές ουσίες	Halogens Peroxygens	Οξείδωση των ομάδωνθειόλης σε δισουλφίδες, σουλφοξείδες ή δισουλφοξείδες Υπεροξειδίου του υδρογόνου: δραστηριότητα λόγω του σχηματισμού ελεύθερων υδροξυ-ριζών ($\cdot\text{OH}$), που οξειδώνουν τις ενώσειςθειοόλης σε ένζυμα και πρωτεΐνες. PAA: διαταραχή τωνθειολών σε πρωτεΐνες και ένζυμα

Πίνακας 5 Μηχανισμοί αντιμικροβιακής δράσης απολυμαντικών (McDonnell & Russell, 1999).

1.2.4 Αντοχή και Ανθεκτικότητα

Προκειμένου να αντιμετωπιστούν τα περιβάλλοντα καταπόνησης, οι μικροοργανισμοί έχουν αναπτύξει τόσο φυσιολογικούς όσο και γενετικούς μηχανισμούς (Beales, 2004). Η επιβίωσή τους εξαρτάται από την έκταση του εφαρμοζόμενου στρες και τους μηχανισμούς αντίδρασης που έχουν εξελίξει (Beales, 2004; Leistner, 2000). Αυτοί οι μηχανισμοί περιλαμβάνουν συνήθως μια αντίδραση προσαρμογής και άμυνας. Σύμφωνα με τους Yousef και Juneja (2002), η μικροβιακή απάντηση στις πιέσεις μπορεί να περιλαμβάνει:

- Παραγωγή πρωτεϊνών που αποκαθιστούν βλάβη ή διατηρούν το μικροβιακό κύτταρο σε μια σταθερή κατάσταση (stress shock proteins)
- Αντοχή ή ανθεκτικότητα σε επιβλαβείς παράγοντες
- Μετασχηματισμός κυττάρων σε αδρανή κατάσταση, δηλαδή σχηματισμός βακτηριακών σπορίων
- Προσαρμοστικές μεταλλάξεις
- Αίσθηση απαρτίας (Quorum sensing)
- Ο σχηματισμός βιοϋμενίων (Biofilms)

Σήμερα, το αίτημα των καταναλωτών για λιγότερο επεξεργασμένα τρόφιμα υψηλής ποιότητας, που βασίζονται σε λιγότερα συντηρητικά, οδήγησε στην εισαγωγή μερικών νέων τεχνικών επεξεργασίας. Αυτές οι τεχνικές, οι οποίες είναι πολύ διαφορετικές από τις παραδοσιακές μεθόδους επεξεργασίας τροφίμων, προκαλούν μικρές περιβαλλοντικές αλλαγές, καθιστώντας ευκολότερη την προσαρμογή των μικροοργανισμών (Abee & Wouters, 1999; Chen, 2017). Σε τέτοιες περιπτώσεις, μπορούν να αποκτήσουν την ικανότητα «διασταυρούμενης ανοχής» (cross tolerance), για να παρακάμψουν τα εμπόδια. Επιπλέον, οι μικροοργανισμοί επιδεικνύουν ανοχή μετά την έκθεση σε πολλαπλές καταπονήσεις (Chen, 2017). Πρέπει όμως να σημειωθεί ότι η χρήση μεγαλύτερου αριθμού εμποδίων καθιστά πιο δύσκολο για τους μικροοργανισμούς να επιβιώσουν και να αποκτήσουν «διασταυρούμενη ανοχή» (Leistner, 2000). Τα βακτήρια επικοινωνούν από κύτταρο σε κύτταρο (quorum sensing) μέσω των εξωκυτταρικών μορίων, που ονομάζονται αυτοεπαγωγείς. Αυτή η σηματοδότηση είναι σημαντική για τις λειτουργίες και τις αντιδράσεις των κυττάρων όπως τον σχηματισμό βιοϋμενίων, τη μολυσματικότητα και τη δημιουργία σπορίων (Gandhi & Chikindas, 2007). Τα κύτταρα μπορεί να τραυματιστούν, όπως και να προσαρμοστούν ή να γίνουν ανθεκτικά στις καταπονήσεις:

Προσαρμογή: Όταν ένας μικροοργανισμός προσαρμοστεί σε μια καταπόνηση. Συνήθως ακολουθεί μια προσαρμοστική και προστατευτική για το κύτταρο απάντηση (Yousef & Juneja, 2002).

Αντοχή: Η ικανότητα των μικροοργανισμών να επιβιώνουν και να είναι πιο ανθεκτικοί, μετά την έκθεσή τους σε μια θανατηφόρα κατάσταση ή στρες (Beales, 2004).

Τραυματισμός: Αναφέρεται στα κύτταρα που γίνονται ευαίσθητα μετά την έκθεση σε στρες. Τα τραυματισμένα κύτταρα μπορεί να καταναλώνουν πολλή ενέργεια και να πεθαίνουν από μεταβολική εξάντληση ή μπορεί να αναρρώσουν και να επανέλθουν (Yousef & Juneja, 2002).

1.2.4.1 Βιοϋμένια

Τα βιοϋμένια είναι κοινότητες μικροοργανισμών (ενός ή περισσότερων) που μπορούν να προσκολληθούν σε μια επιφάνεια αποτελούμενα από κύτταρα που είναι συνδεδεμένα σ' ένα υπόστρωμα ή μεσεπιφάνεια ή μεταξύ τους, συνήθως παρουσία οργανικής ύλης. Παράγουν μια μήτρα εξωκυτταρικών πολυμερών ουσιών (extracellular polymeric substance matrix-EPS), αποτελούμενη από πρωτεΐνες, πολυσακχαρίτες, νουκλεϊκά οξέα, λιπίδια και εξωκυτταρικό DNA (Azeredo *et al.*, 2017) από την οποία περιβάλλονται και παρουσιάζουν διαφορετικό φαινότυπο όσον αφορά το ρυθμό αύξησης τους και τη γονιδιακή τους έκφραση (Donlan, 2002; Donlan & Costerton, 2002; Srey *et al.*, 2013). Τα βιοϋμένια αλλοιογόνων και παθογόνων βακτηρίων μπορούν να βρεθούν σε επιφάνειες διαφόρων υλικών, οργανικών ή ανόργανων, όπως ζωντανούς ιστούς, ιατρικές συσκευές, εγκαταστάσεις επεξεργασίας τροφίμων κτλ (Donlan, 2002). Προφανώς, η προσκόλληση αυτών των βακτηρίων και η δημιουργία βιοϋμενίων πάνω σε επιφάνειες που έρχονται σε επαφή με τρόφιμα είναι κάτι ανεπιθύμητο, καθώς η πιθανή αποκόλληση των κυττάρων από τη βιοϋμενική δομή μπορεί να οδηγήσει σε επιμόλυνση των τροφίμων, διακυβεύοντας τη διάρκεια ζωής τους, την ποιότητα αλλά και την καταλληλότητά τους προς τους καταναλωτές (Srey *et al.*, 2013). Η ικανότητά τους να αντιστέκονται σε αντιμικροβιακούς παράγοντες πιο αποτελεσματικά σε σχέση με τα κύτταρα υπό πλαγκτονική μορφή (μη προσκολλημένα), καθιστά δύσκολη την απομάκρυνσή τους (Gandhi & Chikindas, 2007; Srey *et al.*, 2013).

Ανάπτυξη και κύκλος ζωής των βιοϋμενίων

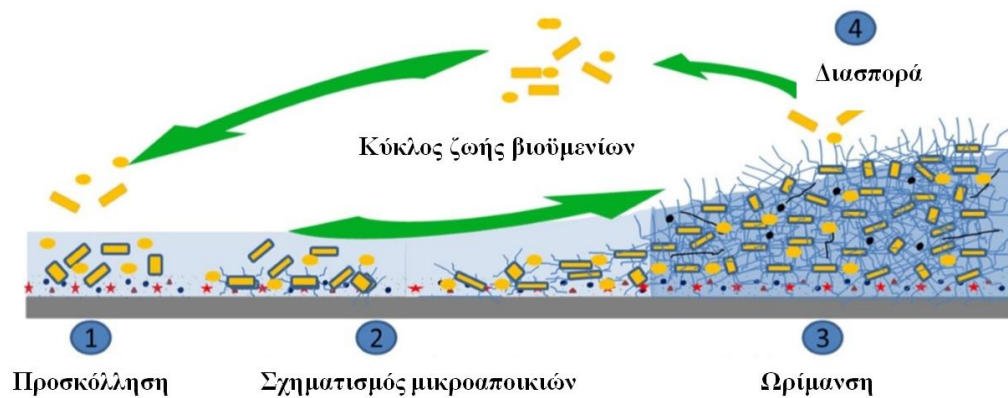
Ο σχηματισμός βιοϋμενίων είναι μια σταδιακή και δυναμική διαδικασία που αποτελείται από τα παρακάτω στάδια (Abdallah *et al.*, 2014; Achinas *et al.*, 2019; Srey *et al.*, 2013)(**Εικόνα 8**):

- (i) *Αρχική προσκόλληση των κυττάρων* (Initial attachment)
- (ii) *Παραγωγή εξωκυτταρικών πολυμερών ουσιών* και σχηματισμός μονοστοιβάδας
- (iii) *Σχηματισμός μικροαποικιών* (Formation of microcolonies),
- (iv) *Ωρίμανση των βιοϋμενίων* (Biofilms maturation),
- (v) *Αποκόλληση πλαγκτονικών κυττάρων από τα βιοϋμένια και διάχυση* (Dispersion)

Σε πρώτο στάδιο τα πλαγκτονικά κύτταρα πλησιάζουν στην επιφάνεια του υλικού ενεργητικά ή παθητικά. Αυτό προκαλείται από έναν συνδυασμό φυσικών δυνάμεων (π.χ. ελκυστικών Van der Waals) και χημικών δυνάμεων (π.χ. τη συνοχή μεταξύ μικροβιακών κυττάρων) (Bispo *et al.*, 2015). Τα βοηθητικά εξαρτήματα που διαθέτουν οι μικροοργανισμοί (π.χ. βλεφαρίδες, μαστίγια, κτλ) ενισχύουν την πρόσδεση ενώ οι περιβαλλοντικοί παράγοντες και οι ιδιότητες του υλικού της επιφάνειας επίσης την επηρεάζουν (Jamal *et al.*, 2018). Αυτό αποτελεί ένα αναστρέψιμο στάδιο καθώς τα κύτταρα διατηρούν την κινητικότητά τους, πράγμα που το καθιστά κατάλληλο για την αντιμετώπιση των βιοϋμενίων (Hoffman *et al.*, 2015).

Στη συνέχεια λαμβάνουν χώρα ισχυρότερες δυνάμεις, όπως δεσμοί υδρογόνου, αλληλεπιδράσεις διπόλου-διπόλου, ομοιοπολικοί ή ιοντικοί δεσμοί και ακολουθεί η διαδικασία του πολλαπλασιασμού κατά το οποίο γίνεται η ενίσχυση της μήτρας (EPS) (Kuchma & O'Toole, 2000) και συντίθενται μια δομή διαφορετικών μικροαποικιών. Οι αμοιβαίες δράσεις μεταξύ των μικροαποικιών επηρεάζουν τα μεταβολικά προϊόντα. Η ικανότητα των κυττάρων να επικοινωνούν μέσω της ανίχνευσης απαρτίας (quorum sensing) είναι καταλυτική γι' αυτό το στάδιο καθώς παρέχει στα βακτήρια την ικανότητα να αναπτυχθούν σε μια τρισδιάστατη δομή όπου τα κύτταρα αντλούν τα θρεπτικά συστατικά με μεγάλη ευκολία. Τα βακτηριακά κύτταρα έχουν την ικανότητα να ανταλλάσσουν γενετικά συστατικά με αυξημένο ρυθμό και αυτό μπορεί να διευκολύνει την απόκτηση νέων γονιδίων για τη βιωσιμότητα και την περιβαλλοντική επιβίωση τους (Merino *et al.*, 2019). Αυτό καθιστά το στάδιο μη αντιστρέψιμο για τον βιοϋμενικό θάνατο (Hoffman *et al.*, 2015).

Στο τελευταίο στάδιο παρατηρείται υπερπληθυσμός κυττάρων, πράγμα που οδηγεί την προσωρινή αφαίρεση του εξωτερικού προστατευτικού στρώματος. Τα βακτήρια διασκορπίζονται σε υγρή μορφή με μεγάλη ικανότητα κινητικότητας με αποτέλεσμα τη διασπορά του μικροβιακού κυττάρου (Achinas *et al.*, 2019)



Εικόνα 7 Ο κύκλος ζωής του βιοϋμενίου (Abdallah *et al.*, 2014).

Συνθήκες που επηρεάζουν την ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίων

Η δημιουργία και η ανάπτυξη των βιοϋμενίων επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες που περιλαμβάνουν το είδος του βακτηριακού στελέχους (υδροφοβία, παραγωγή εξωκυτταρικών πολυμερών ουσιών, κτλ), τις ιδιότητες του υλικού επιφάνειας (υδροφοβία, τραχύτητα, κτλ) και τους περιβαλλοντικούς παράγοντες (pH, τα επίπεδα θρεπτικών και η θερμοκρασία) (Srey *et al.*, 2013).

1. Φυσικές ιδιότητες του υλικού επιφάνειας επαφής

Τα επιφανειακά υλικά που έρχονται σε επαφή με τα τρόφιμα έχουν ουσιαστική επίδραση στη σύνδεση και τον σχηματισμό βιοϋμενίων. Τα υλικά που χρησιμοποιούνται για τις επιφάνειες επαφής με τρόφιμα είναι κυρίως ανοξείδωτος χάλυβας, γυαλί, καουτσούκ, πολυουρεθάνη (Akbaş, 2015; Chia *et al.*, 2009).

Η πρόσφυση στην αβιοτική επιφάνεια επηρεάζεται από τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του επιφανειακού υλικού όπως η τραχύτητα (Donlan, 2002), το επιφανειακό φορτίο (Abdallah *et al.*, 2014), η υδροφοβία (Donlan, 2002), το pH, η θερμοκρασία και η θρεπτική σύνθεση του διαλύματος προετοιμασίας (Akbaş, 2015). Οι υδροφοβικές/υδρόφιλες αλληλεπιδράσεις διαπιστώθηκε ότι είναι αποτελεσματικές για την προσκόλληση των βακτηρίων στις αβιοτικές επιφάνειες (Hood & Zottola, 1995). Οι μεταλλικές επιφάνειες είναι αρνητικά φορτισμένες και αναφέρονται ως υδρόφιλες, ενώ το Teflon είναι λιγότερο ηλεκτροστατικά φορτισμένο και αναφέρεται ως υδρόφοβη επιφάνεια (Faille, 2002). Σε μια μελέτη, οι Sinde και Carballo, διαπίστωσαν ότι τα είδη *Salmonella* και *Listeria* μπορούν να προσκολληθούν σε υψηλότερους αριθμούς σε υδρόφοβες επιφάνειες από τις υδρόφιλες (Sinde & Carballo, 2000). Αναφέρθηκε επίσης ότι οι μικροοργανισμοί *Salmonella* spp. και *L. monocytogenes* μπορούν να παράγουν βιοϋμένια σε πλαστικές επιφάνειες.

2. Φυσικοχημικές ιδιότητες των βακτηριακών κυττάρων

Η υδρόφοβη κυτταρική επιφάνεια, οι δομές κυτταρικής επιφάνειας όπως τα μαστίγια, άλλες πρωτεΐνες, και η μήτρα EPS παίζουν σημαντικούς ρόλους στην προσκόλληση βακτηρίων στο υπόστρωμα. Τα μαστίγια, μερικές πρωτεΐνες και τα μυκολικά οξέα των θετικών κατά Gram βακτηρίων παίζουν σημαντικό ρόλο για την προσκόλληση σε υδρόφοβες επιφάνειες. Τα EPS και τα λιποπολυσακχαρίδια είναι πιο σημαντικά στην πρόσδεση σε υδρόφιλα υλικά (Akbaş, 2015).

3. Βιοσύνθεση εξωκυτταρικών πολυμερών

Τα μόρια του εξωπολυσακχαρίτη (EPS) αποτελούν τον κύριο παράγοντα για τον σχηματισμό των βιοϋμενίων. Τα μόρια EPS ενισχύουν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των βακτηριδίων για τον σχηματισμό μικροαποικιών στο αβιοτικό υπόστρωμα. Τα EPS έχουν διαφορετικές χημικές και φυσικές ιδιότητες ανάλογα με τη χημική τους σύνθεση (Akbaş, 2015). Η σύνθεση EPS επηρεάζεται από περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως η παροχή άνθρακα ή αζώτου, η τιμή pH, η θερμοκρασία καλλιέργειας και η συγκέντρωση οξυγόνου (Akbaş, 2015). Οι Leriche et al., 2000, έδειξαν ότι διάφοροι οργανισμοί παράγουν διαφορετικές ποσότητες EPS και ότι η ποσότητα του EPS αυξάνει με την ηλικία του βιοϋμενίων (Leriche et al., 2000). Το EPS μπορεί να διαθέτει υδρόφοβα χαρακτηριστικά, ωστόσο, οι περισσότεροι τύποι EPS είναι εξίσου υδρόφιλοι και υδρόφοβοι (Sutherland, 2001).

4. Άλλοι περιβαλλοντικοί παράγοντες

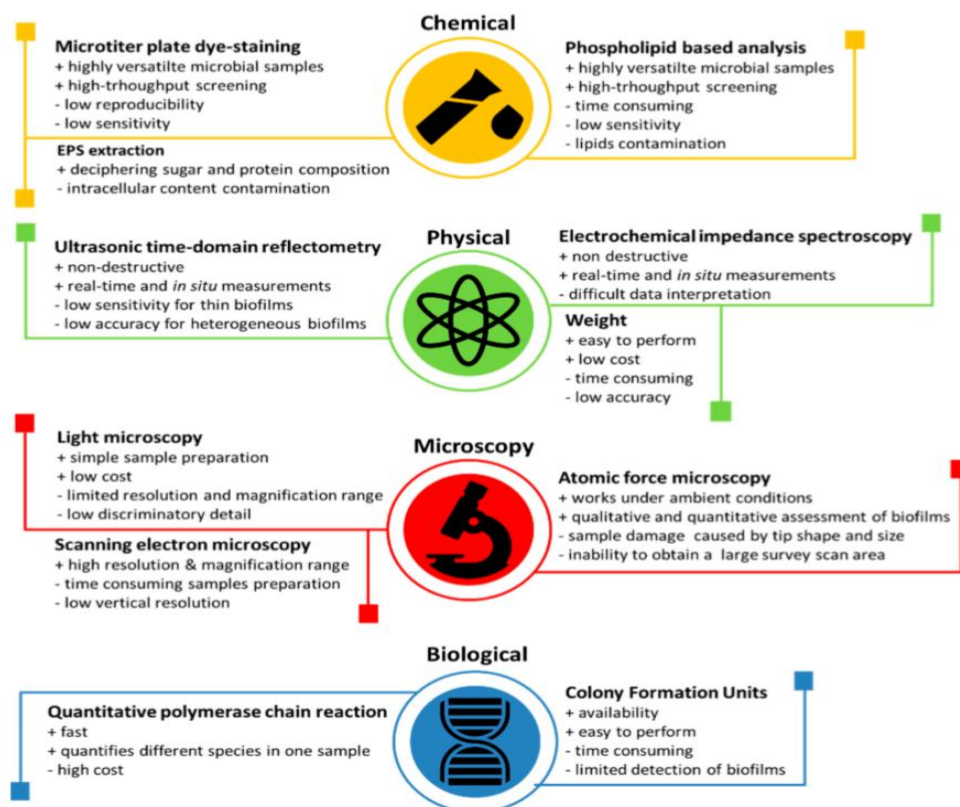
Περιβαλλοντικές συνθήκες όπως η έλλειψη ή αντίθετα η διαθεσιμότητα θρεπτικών ουσιών μπορούν να ξεκινήσουν το σχηματισμό βιοϋμενίων. Σε μερικές από τις εργαστηριακές έρευνες, η έλλειψη θρεπτικών συστατικών προκάλεσε την κυτταρική προσκόλληση, ενώ σε άλλες μελέτες η διαδικασία βακτηριακού αποικισμού αυξήθηκε με υψηλή ποσότητα θρεπτικών ουσιών (Akbaş, 2015). Έχει αποδειχθεί ότι τόσο το pH όσο και η θερμοκρασία είναι σημαντικά για τη βακτηριακή προσκόλληση στην επιφάνεια ανοξειδωτού χάλυβα (Herald & Zottola, 1988). Ο Fletcher ανέφερε ότι η αύξηση της συγκέντρωσης κατιόντων όπως το νάτριο, ο ασβέστος, ή ο σίδηρος επηρέασαν την προσκόλληση του *P. Fluorescens* σε γυάλινες επιφάνειες (M. Fletcher, 1988).

Αξιολόγηση σχηματισμού βιοϋμενίων και εξάλειψη

Η βιομάζα και η βιωσιμότητα των βιοϋμενίων μπορούν να αξιολογηθούν με διαφορετικές μεθόδους που βασίζονται σε μικροβιολογικές και μοριακές αναλύσεις, ή σε φυσικές ή χημικές ιδιότητες των βιοϋμενίων. Οι μέθοδοι με χρήση μικροσκοπίου είναι επίσης

σημαντικά εργαλεία για την αξιολόγηση των ιδιοτήτων της βιοκινηματογραφικής βιομάζας, καθώς επιτρέπουν την περιγραφή της όλων των σταδίων ανάπτυξης με πιο άμεσο τρόπο (Azeredo *et al.*, 2017). Στην **Εικόνα 9** παρουσιάζονται οι σημαντικότερες μέθοδοι σύμφωνα με τους Achinas *et al.*, 2019 ενώ αναφέρονται και τα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματά τους.

Η πρόληψη και η αντιμετώπιση των βιοϋμενίων αποτελεί σημαντικό καθήκον της βιομηχανίας τροφίμων. Ο καθαρισμός και η απολύμανση (CIP) αποτελούν απαραίτητες διαδικασίες κατά την παραγωγή των προϊόντων, μέσα από την εφαρμογή ανάλυσης κινδύνου και των κρίσιμων σημείων ελέγχου (HACCP), όπως και ορθών βιομηχανικών πρακτικών (GMPs). Ωστόσο, οι μέθοδοι αυτοί μπορεί να είναι αναποτελεσματικοί, ειδικά σε ορισμένα «κρυφά» σημεία των γραμμών παραγωγής, με αποτέλεσμα την παραμονή μικροοργανισμών στις επιφάνειες και την δημιουργία βιοϋμενίων (Kumar & Anand, 1998).



Εικόνα 8 Εντοπισμός βιοϋμενίων και τρόποι μέτρησης τους (Achinas *et al.*, 2019).

Στρατηγικές που αφορούν την τροποποίηση των ιδιοτήτων της επιφάνειας έχουν προκύψει ως πιο πρωτοπόρες και αποτελεσματικές (Verran & Whitehead, 2005). Για παράδειγμα, ο σχεδιασμός των υπερυδροφοβικών επιφανειών έχει διαπιστωθεί ότι είναι αποτελεσματικός στην πρόληψη της προσκόλλησης των κυττάρων και του σχηματισμού

βιοϋμενίων αρκετών βακτηρίων, όπως *P. aeruginosa* και *S. aureus* (Loo *et al.*, 2012). Πρόσφατα, προτάθηκαν διαφορετικές προσεγγίσεις, οι οποίες αποτελούνται από επιφάνειες με αντιμικροβιακή επίστρωση, προκειμένου να μειωθούν οι επιμολύνσεις. Επιπλέον, τεχνολογίες για την ακινητοποίηση των ενεργών παραγόντων στις αβιοτικές επιφάνειες, όπως τα αντιμικροβιακά πεπτιδία, η ανίχνευση κατά της αίσθησης απαρτίας (quorum sensing), τα αιθέρια έλαια, τα ένζυμα και το τεταρτοταγές αμμώνιο (QA) έχουν διερευνηθεί (Karam *et al.*, 2013). Αυτές οι επιφάνειες έχουν βρεθεί κατάλληλες για την αναστολή του σχηματισμού βιοϋμενίων είτε με τη θανάτωση βακτηρίων είτε με την αποτροπή της προσκόλλησης τους. Ωστόσο, η επιστρώσεις μπορεί να είναι τοξικές για τον άνθρωπο, περιορίζοντας την εφαρμογή αυτών των μεθόδων και χρίζοντας περισσότερης έρευνας (Abdallah *et al.*, 2014).

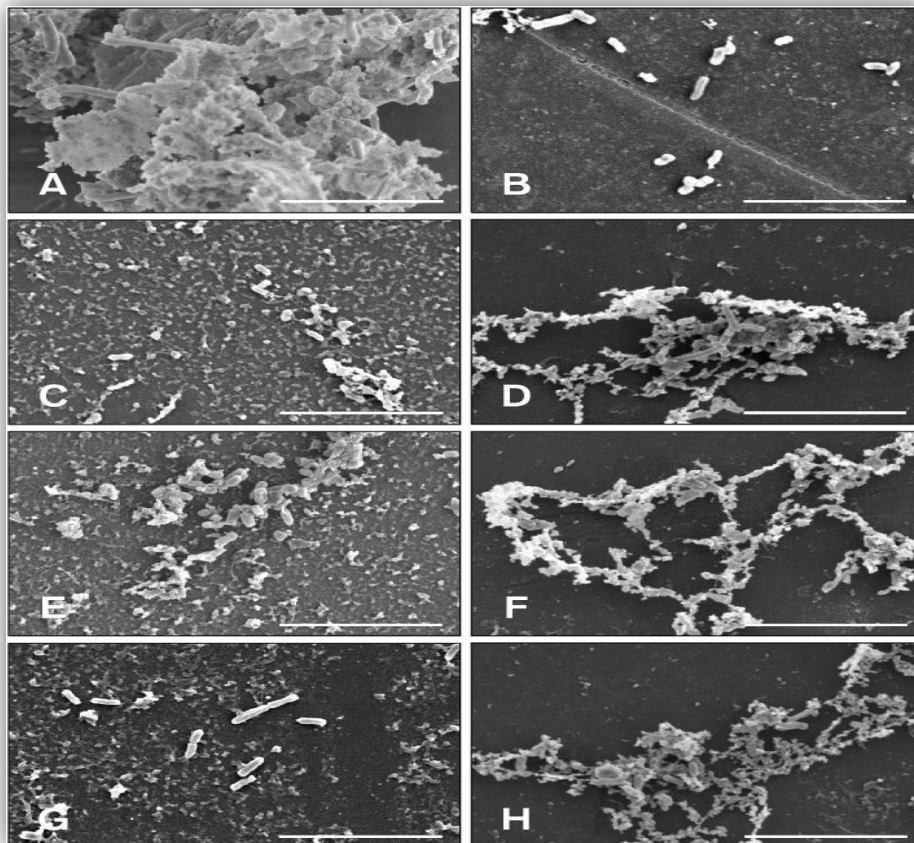
***Salmonella spp.* και ανάπτυξη βιοϋμενίων**

Η προσκόλληση του βακτηρίου στις επιφάνειες των τροφίμων ήταν τα πρώτα φαινόμενα που αναφέρθηκαν και δημοσιεύθηκαν στα τρόφιμα σχετικά με τα βιοϋμένια (Merino *et al.*, 2019). Στο πλαίσιο πολλών ερευνών, έχει διαπιστωθεί ότι η σκόνη, οι επιφάνειες, τα κόπρανα, οι ζωοτροφές πουλερικών και η μεταφορά ζώντων πουλερικών μεταξύ μονάδων παραγωγής και μεταποίησης αποτελούν τους σημαντικούς παράγοντες κινδύνου για τη μόλυνση από *Salmonella spp.* (Marin *et al.*, 2009; Srey *et al.*, 2013). Μελέτες έχουν βρει ότι τα συστατικά βακτηριακής κυτταρικής επιφάνειας όπως η κυτταρίνη και τα μαστίγια είναι σημαντικά για την προσάρτηση των διαφορετικών επιφανειών της *Salmonella spp.* (Merino *et al.*, 2019).

Περίπου το 50% των στελεχών που απομονώθηκαν σε πτηνοτροφικές εκμεταλλεύσεις ήταν σε θέση να παράγουν βιοϋμένια (Marin *et al.*, 2009). Μελετήθηκε η προσκόλληση 25 στελεχών *Salmonella spp.* σε τέσσερα διαφορετικά υλικά (επίσης γνωστό ως τεφλόν, ανοξείδωτο ατσάλι, καουτσούκ και πολυουρεθάνης), τα οποία χρησιμοποιούνται συνήθως στη βιομηχανία πουλερικών. Μεταξύ αυτών, οι απομονώσεις *Salmonella ser. Sofia* έδειχναν γενικά να προσκολλούνται σε μεγαλύτερο βαθμό στις διάφορες επιφάνειες από ότι οι άλλες απομονώσεις. Προτάθηκε ότι ίσως η *Salmonella ser. Sofia* μπορεί να έχει περισσότερους κινητικούς μηχανισμούς σε σχέση με άλλους ορότυπους (Chia *et al.*, 2009). Σύμφωνα με την ίδια μελέτη προέκυψε ότι το *S. Typhimurium* μπορεί να προσκολλάται πιο εύκολα στον ανοξείδωτο χάλυβα από το καουτσούκ (Marin *et al.*, 2009).

Σε μια διαφορετική μελέτη, αξιολογήθηκε ο χαρακτηρισμός του σχηματισμού βιοϋμενίων και η προσκόλληση του *S. Typhimurium* DT104 (S. H. Kim & Wei, 2009), με τα

αποτελέσματα να υποδεικνύουν ότι πολλοί παράγοντες, όπως η παραγωγή EPS και η αποδοτική μεταφορά τους μέσω των εξωτερικών μεμβρανών, η έκφραση των μαστίγιων και η ρύθμιση της δεσμευτική πρωτεΐνης RNA (RNA binding protein), προτάθηκαν να συμμετέχουν σε σχηματισμό βιοϋμενίων και το την προσκόλληση του *S. Typhimurium* DT104 στις επιφάνειες επαφής. Τα βακτήρια *Salmonella* spp. έχουν ένα προσάρτημα-οργανίδιο στην κυτταρική της επιφάνεια (κηλίδες, κνήμες SEF-17, SEF-17 fimbriae) για προσάρτηση σε επιφάνειες και αντίσταση σε μηχανικές δυνάμεις (Akbaş, 2015).



Εικόνα 9 Παρατηρήσεις μικροδομής βιοϋμενίων διαφόρων στελεχών *Salmonella* spp. παρουσία αντιβιοτικών σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, υπό σάρωση ηλεκτρονικής μικροσκοπίας. (A) Μη μεταχειρισμένο, πολυανθεκτικό στέλεχος *Salmonella*. (B) Μη μεταχειρισμένο στέλεχος *Salmonella Gallinarum*. (C) Πολυανθεκτικό στέλεχος με συγκέντρωση CIP $1/2 \times \text{MIC}$. (D) Πολυανθεκτικό στέλεχος με συγκέντρωση CIP $1/4 \times \text{MIC}$. (E) Πολυανθεκτικό στέλεχος με συγκέντρωση βερβερίνης $1/2 \times \text{MIC}$. (F) Πολυανθεκτικό στέλεχος με συγκέντρωση $1/4 \times \text{MIC}$. (G) Πολυανθεκτικό στέλεχος με συγκέντρωση $1/2 \times \text{FIC}$ του συνδυασμού βερβερίνης και CIP. (H) Πολυανθεκτικό στέλεχος με συγκέντρωση $1/4 \times \text{FIC}$ του συνδυασμού (Shi *et al.*, 2018).

MIC, ελάχιστη συγκέντρωση αναστολής. CIP, σιπροφλοξασίνη. FIC, κλασματική ανασταλτική συγκέντρωση.

Γραμμές κλίμακας = 100 μm (A-H).

1.2.5 Μεταβλητότητα της συμπεριφοράς των στελεχών

Με τον όρο μεταβλητότητα στελέχους νοούνται οι εγγενείς διαφορές μεταξύ στελεχών ίδιας ταυτότητας, του ίδιου μικροβιακού είδους (Whiting & Golden, 2002). Αυτό σημαίνει ότι τα αποτελέσματα ερευνών που αναφέρονται σε ένα συγκεκριμένο μικροβιακό στέλεχος δεν μπορούν να επεκταθούν σε άλλα στελέχη του ίδιου είδους. Τα δεδομένα μεταβλητότητας των στελεχών αναφέρονται σε τέσσερις συμπεριφορές των τροφιμογενών παθογόνων, συμπεριλαμβανομένων της μολυσματικότητας, της ανάπτυξης, της αδρανοποίησης και του σχηματισμού βιοϋμενίων (Lianou & Koutsoumanis, 2013).

Η επιλογή στελέχους είναι μια απόφαση ζωτικής σημασίας κατά τον σχεδιασμό και τη διεξαγωγή μελετών πρόκλησης με στόχο την αξιολόγηση της συμπεριφοράς των βακτηριακών παθογόνων σε προϊόντα διατροφής ή σε συστήματα που προσομοιώνουν περιβάλλοντα που σχετίζονται με τα τρόφιμα (Lianou & Koutsoumanis, 2013). Έχει προταθεί ότι, προκειμένου να υπάρξουν διακυμάνσεις στην ανάπτυξη και την επιβίωση μεταξύ των στελεχών, πολλαπλά στελέχη (3–5) τροφιμογενών παθογόνων (ατομικά ή σε συνδυασμό) θα πρέπει να χρησιμοποιούνται σε ερευνητικές μελέτες ασφάλειας τροφίμων (Lianou & Koutsoumanis, 2013; NACMCF, 2005). Εκτός όμως από τον αριθμό των στελεχών που χρησιμοποιούνται για την προετοιμασία του εμβολίου, μια άλλη παράμετρος που θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη όταν χαρακτηρίζουν και επιλέγοντας στελέχη για χρήση σε μελέτες πρόκλησης είναι η προέλευση της απομόνωσής τους και η πηγή τους (Lianou & Koutsoumanis, 2013).

1.3 Ανίχνευση και ορολογική τυποποίηση του παθογόνου

1.3.1 Μέθοδοι ανίχνευσης του *Salmonella* spp.

Το σχέδιο δειγματοληψίας είναι η πρώτη διαδικασία η οποία πρέπει να υλοποιηθεί για τον έλεγχο του παθογόνου. Ο μεγάλος αριθμός δειγμάτων και η κατάλληλη επεξεργασία τους είναι απαραίτητοι παράγοντες για τον εντοπισμό του μικροοργανισμού. Επίσης, πρέπει να ξεπεραστεί η ανταγωνιστική μικροχλωρίδα η οποία μπορεί να υπερισχύει έναντι του μικρού αριθμού κυττάρων *Salmonella* spp. αλλά και η χημική σύσταση του τροφίμου που μπορεί να δρα ως παρεμποδιστικός παράγοντας για την ανίχνευσή του. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση του μικροοργανισμού συνήθως χωρίζονται στις (Lee *et al.*, 2015):

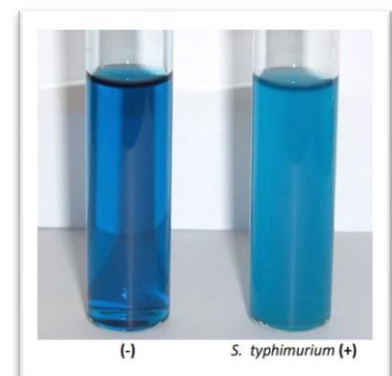
- Κλασσικές μικροβιολογικές που χρησιμοποιούν καλλιεργητικές τεχνικές και παραμένουν στις μεθόδους αναφοράς που αναγνωρίζονται από τις ελεγκτικές αρχές.
- Ανοσολογικές που στηρίζονται στη χρήση αντισωμάτων. Κάποια τέτοια μέθοδος απαιτείται έστω και στο τελικό στάδιο της ταυτοποίησης του στελέχους που απομονώνεται για να βρεθεί ο ορολογικός του τύπος.
- Μοριακές που στηρίζονται στην ανίχνευση κάποιας ακολουθίας DNA που είναι χαρακτηριστική για το παθογόνο. Οι μέθοδοι αυτοί συχνά χρησιμοποιούν κάποια παραλλαγή της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR).

Ο χρόνος ανάλυσης των συμβατικών αλλά και γρήγορων μεθόδων μπορεί να ποικίλλει ανάλογα με τα βήματα εμπλουτισμού των κυττάρων για να επιτευχθεί ελάχιστη συγκέντρωση κυττάρων τα οποία θα είναι αρκετά για την ανίχνευση. Ο εμπλουτισμός των κυττάρων είναι μια διαδικασία συνήθως χρονοβόρα σε μια συμβατική μέθοδο, ενώ η μέθοδος ταχείας ανίχνευσης απαιτεί γενικά συγκέντρωση τουλάχιστον 10^4 κύτταρα ml^{-1} (Lee *et al.*, 2015).

1.3.1.1 Καλλιεργητικές μέθοδοι ανίχνευσης του *Salmonella* spp.

Η παραδοσιακή απομόνωση του βακτηρίου περιλαμβάνει έναν μη εκλεκτικό προ-εμπλουτισμό ενός καθορισμένου βάρους ή όγκου του δείγματος, ένα στάδιο επιλεκτικού εμπλουτισμού, επίστρωση σε εκλεκτικά υποστρώματα, βιοχημική και ορολογική επιβεβαίωση υποψήφιων αποικιών. Οι διαφορετικές προσεγγίσεις του εμπλουτισμού έχουν τυποποιηθεί από αρκετούς ρυθμιστικούς οργανισμούς, όπως ο Διεθνής Οργανισμός Τυποποίησης (ISO), ο το FDA και το USDA (ISO, 2017; Lee *et al.*, 2015; Percival & Williams, 2014).

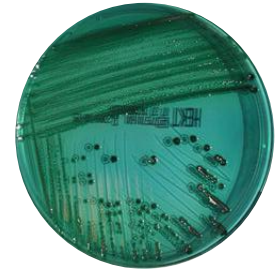
- ✓ **Προ-εμπλουτισμός:** Εμβολιασμός με το δείγμα στο υλικό του προ-εμπλουτισμού, σε αναλογία 1:9 (δείγμα: διάλυμα). που συνήθως είναι πεπτονούχο νερό (buffered peptone water) και ακολουθεί επώαση.
- ✓ **Εμπλουτισμός:** Εμβολιασμός από το υλικό του προ-εμπλουτισμού σε υλικό εμπλουτισμού. Πολύ συχνά επιλέγονται 2 τέτοια υλικά για να μην αποκλειστούν στελέχη που δεν ενισχύονται με το ένα μόνο υλικό εμπλουτισμού. Συνήθως είναι το Rappaport–Vasiliadis broth (R-V) σε



Εικόνα 10 *S. Typhimurium* σε υγρό υπόστρωμα Rappaport–Vasiliadis.

αναλογία 1:100, το Selenite-Cysteine υλικό (SC) σε αναλογία 1: 10, το Tetrathionate broth (TT) σε αναλογία 1: 10. Το R-V περιέχει πράσινο του μαλαχίτη και χλωριούχο μαγνήσιο σε συγκεντρώσεις οι οποίες παρεμποδίζουν την αύξηση των μικροοργανισμών που κατοικούν στο έντερο, όχι όμως και των στελεχών *Salmonella* (με κάποιες εξαιρέσεις όπως τα *S. Typhi* και *S. Paratyphi*).

- ✓ **Επίστρωση σε εκλεκτικά υλικά:** Γίνεται γραμμική διασπορά σε τρυβλία με εκλεκτικά υποστρώματα από τις καλλιέργειες του εμπλουτισμού. Τα υποστρώματα αυτά μπορεί να είναι το Xylose Lysine Desoxycholate agar (XLD), το Salmonella Shigella agar (SS), το Bismuth Sulfite agar (BS) ή και άλλα. Ακολουθεί επώαση.
- ✓ **Έλεγχος για την παρουσία τυπικών αποικιών:** Στο στάδιο αυτό γίνεται έλεγχος για την παρουσία τυπικών αποικιών και πιθανόν να χρειάζεται να γίνουν και κάποιες πρώτες βιοχημικές δοκιμές.
- ✓ **Επιβεβαίωση και ταυτοποίηση:** Γίνεται η επιβεβαίωση του βιοχημικού προφίλ του στελέχους και η ανίχνευση των O ή H αντιγόνων. Επίσης μπορεί να ακολουθηθούν περαιτέρω μοριακές και μικροβιολογικές μέθοδοι προσδιορισμού του φαινοτυπικού προφίλ του μικροοργανισμού (Percival & Williams, 2014).



Εικόνα 11 Ανάπτυξη *Salmonella* σε θρεπτικό υλικό BS.

1.3.2 Οροτυποποίηση *Salmonella* spp.

Οι μικροοργανισμοί ανάλογα το είδος τους διαθέτουν κάποια γονοτυπικά χαρακτηριστικά (χαρακτηριστικά του συνόλου των γονιδίων ενός μικροοργανισμού) που τους καθιστούν διαφορετικούς στις αντιδράσεις τους ανάλογα με τα περιβάλλοντα στα οποία βρίσκονται. Ανάμεσα στο ίδιο είδος διακρίνονται διαφορετικά «στελέχη» (strains), απομονώσεις δηλαδή που μπορούν να εντοπιστούν και να ξεχωρίσουν από άλλες του ίδιου είδους μέσω διαφορετικών γονοτυπικών ή/και φαινοτυπικών χαρακτηριστικών (Wiedmann, 2002). Ειδικότερα η πληροφορία αυτές αποτελούν ιδιαίτερα σημαντικό παράγοντα για την πιθανή εμπλοκή τους σε κάποια επιδημία. Η διαδικασία διαφοροποίησης των στελεχών πέρα από επίπεδο είδους που βασίζεται σε γονοτυπικά ή φαινοτυπικά (δηλ. ορατά, εκφρασμένα χαρακτηριστικά επηρεασμένα τόσο από το γονότυπο όσο και από τους περιβαλλοντικούς παράγοντες) χαρακτηριστικά ονομάζεται «μικροβιακή τυποποίηση» (strain typing) ή «υποτυποποίηση» (subtyping). Οι μέθοδοι υποτυποποίησης μπορούν να διαχωριστούν σε i) κλασσικές (οροτυποποίηση, λυσιτυπία κτλ), ii) και μοριακές μεθόδους (PCR, Ριβοτυπία,

PFGE, MLVA, κτλ). Η επιλογή της κατάλληλης μεθόδου μπορεί να είναι συνάρτηση της ισχύς διάκρισης, την αναπαραγωγιμότητας, της εφαρμοσιμότητας, της ευκολίας χρήσης, καθώς και του σχετικού κόστους της μεθόδου (Lianou & Koutsoumanis, 2013).

Η οροτυποποίηση αποτελεί μια από τις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες μεθόδους τυποποίησης της *Salmonella* spp. με το σχέδιο που προτάθηκε από τον Kaufmann-White να έχει επικρατήσει (Barco *et al.*, 2013; Beaubrun *et al.*, 2012). Αυτό βασίζεται στην ορολογική διάκριση και μεταβλητότητα των αντιγόνων: Ο (πολυσακχαρίτες της εξωτερικής λιποπρωτεϊνικής μεμβράνης), Η (πρωτεΐνες του μαστιγίου-H1 και H2 αντιγόνα) και το Vi (πολυσακχαρίτες της κάψας) (Barco *et al.*, 2013; Hurley *et al.*, 2014). Το αντιγόνο Ο προσδιορίζει την ομάδα στην οποία η απομόνωση *Salmonella* ανήκει, ενώ το αντιγόνο Η καθορίζει τον ορότυπο (Liu *et al.*, 2013). Τα μειονεκτήματα των παραδοσιακών μεθόδων (χρήση ακριβών ορών, χρονοβόρα διαδικασία, εξειδικευμένο προσωπικό) οδήγησαν τους ερευνητές στην αναζήτηση εναλλακτικών μεθόδων που βασίζονται στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) αν και αυτές συνήθως περιορίζονται σε έναν μόνο ορότυπο (Barco *et al.*, 2011). Η τεχνική της PCR προϋποθέτει ότι γνωρίζουμε τη νουκλεοτιδική αλληλουχία ενός τμήματος του επιθυμητού γονιδίου για την επιλογή των κατάλληλων εκκινήτων οι οποίοι είναι συμπληρωματικοί στις αλληλουχίες του γονιδίου ή των γονιδίων που μας ενδιαφέρουν. Τα μεγέθη γονιδιώματος του μικροοργανισμού *Salmonella* spp. ποικίλλουν μεταξύ των ορότυποι με εύρος από 4460 έως 4857 kb (Andino & Hanning, 2015).

1.4 *Salmonella* spp. και Δημόσια Υγεία

1.4.1 Επιδημιολογικά στοιχεία

Τα βακτήρια *Salmonella* spp. αντιπροσωπεύουν την πιο συνηθισμένη αιτία τροφικής δηλητηρίασης σε πολλές χώρες για τουλάχιστον πάνω από 100 χρόνια. Παρά τις καθιερωμένες οδηγίες και μέτρα για την πρόληψη της σαλμονέλλωσης (τροφική δηλητηρίαση από *Salmonella* spp.), η συχνότητα και η σοβαρότητα της στον άνθρωπο έχει αυξηθεί σημαντικά (Lee *et al.*, 2015). Οι περισσότερες περιπτώσεις σαλμονέλλωσης αφορούν ένα μεμονωμένο περιστατικό (περίπου 80%), ενώ μεγάλα κρούσματα που προκαλούνται σε σχολεία, νοσοκομεία και τα εστιατόρια δεν είναι πολύ συνηθισμένα (Lee *et al.*, 2015; Percival & Williams, 2014).

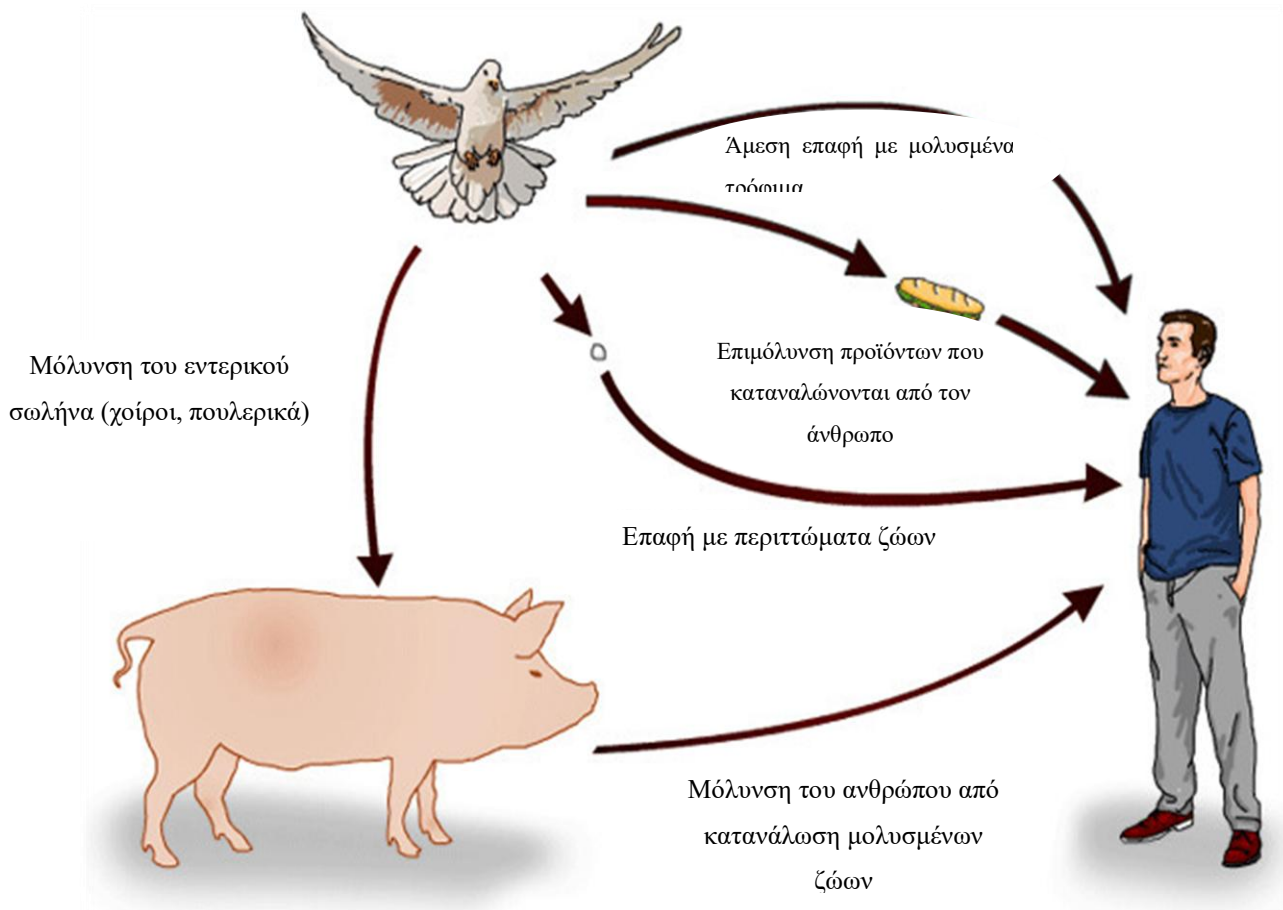
Ο μικροοργανισμός δεν θεωρείται θανατηφόρος για υγιή άτομα μπορεί όμως να προκαλέσει σοβαρές τροφιμογενείς ασθένειες (Lee *et al.*, 2015). Όπως και πολλές άλλες μολυσματικές

ασθένειες, η πορεία και το αποτέλεσμα της λοίμωξης εξαρτώνται από μεταβλητούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένου του ορότυπου, της φάσης της ανάπτυξης, της δόσης του εμβολίου και της ανοσολογικής κατάστασης του ξενιστή (Andino & Hanning, 2015). Έτσι, ο αριθμός των βακτηρίων που απαιτούνται για να προκληθεί ανθρώπινη λοίμωξη ποικίλλει ανάλογα με την ηλικία του ατόμου, τη γενική υγεία και την παρουσία άλλων νοσημάτων (Percival & Williams, 2014). Ένα μεγάλο εμβόλιο συνδέεται με υψηλότερα ποσοστά ασθένειας και μικρότερες περιόδους επώασης. Η μολυσματική δόση του μικροοργανισμού κυμαίνεται από 1 έως 10^9 cfu/g. Για τους ορότυπους που δεν παρουσιάζουν ιδιαίτερες προσαρμογές σε έναν ξενιστή, πειραματικές μελέτες έδειξαν ότι μεταξύ 10^5 έως 10^7 βακτήρια απαιτούνταν για την εμφάνιση μιας λοίμωξης. Ωστόσο, άλλες μελέτες υποδεικνύουν ότι οι λοιμώξεις μπορούν να προκληθούν από την κατάποση ακόμα και 10-45 κυττάρων (Lehmacher *et al.*, 1995). Έχει επανειλημμένα αναφερθεί ότι η μολυσματική δόση είναι χαμηλότερη όταν υπάρχουν βακτήρια *Salmonella* spp. σε τρόφιμα με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά ή πρωτεΐνες, ουσίες που προστατεύουν τα βακτήρια από το χαμηλό pH των γαστρικών υγρών (Blaser & Newman, 1982). Κρούσματα με πηγή κάποιο τρόφιμο έδειξαν ότι μόλις 1 έως 10 κύτταρα μπορούν να προκαλέσουν σαλμονέλωση στις πιο ευπαθείς σε μόλυνση YOPIs ομάδες (Bhunia, 2008).

Μελέτες για την επιβίωση της *Salmonella* spp. που προέρχονται από ποικίλες πηγές, για μεγάλο χρονικό διάστημα (Andino & Hanning, 2015), σε διάφορα περιβάλλοντα έχουν αναφερθεί περιοδικά (Bell & Kyriakides, 2009). Ένας τρόπος μετάδοσης του μικροοργανισμού είναι μέσω του νερού του εδάφους όπου μπορεί να επιβιώσει και αυτά τα περιβάλλοντα με τη σειρά τους μπορούν να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο στη διάδοση του οργανισμού, άμεσα ή έμμεσα, σε ζώα και καλλιέργειες (Bell & Kyriakides, 2009). Αφού βρεθεί στον γαστρεντερικό σωλήνα των ζώων (κατοικίδια και άγρια) όπως κοτόπουλα, γαλοπούλες, χοίρους, αγελάδες, χελώνες, ερπετά και πτηνά μπορεί να αναπτυχθεί και να μολύνει τον ξενιστή (Andino & Hanning, 2015). Η διατροφή των ανθρώπων με μολυσμένα τρόφιμα και νερό, αποτελεί στη συνέχεια τον πλέον συνηθισμένο τρόπο μετάδοσης του μικροοργανισμού. Ιδίως τα προϊόντα από πουλερικά και χοίρους, θεωρούνται ως οι σημαντικότερες μεταφορείς του μικροοργανισμού (Andino & Hanning, 2015; Zhao *et al.*, 2016). Περισσότερο από το 70% της σαλμονέλωσης του ανθρώπου στις ΗΠΑ έχει αποδοθεί στην κατανάλωση μολυσμένων κοτόπουλων, γαλοπούλας ή αυγών (Andino & Hanning, 2015). Άλλοι τρόποι επίσης μετάδοσης του μικροοργανισμού αποτελούν η επαφή του ανθρώπου με τα ζώα-ξενιστές (κατοικίδια και ζώα παραγωγής) όπως και η επαφή υγιούς με ασθενές άτομο. Είναι σαφές ότι τα περιβάλλοντα που έχουν μολυνθεί με *Salmonella* spp.

από οποιαδήποτε πηγή παρουσιάζουν κίνδυνο μόλυνσης για την αλυσίδα εφοδιασμού πρώτων υλών τροφίμων και τις διαδικασίες παρασκευής τροφίμων (ζωοτροφές, επεξεργασία, εξοπλισμός, κτλ) (Bell & Kyriakides, 2009; Wong *et al.*, 2002).

Όλοι αυτοί οι τρόποι μετάδοσης συνεχίζουν τον κύκλο της μόλυνσης από το μικροοργανισμό, πράγμα που καθιστά αναγκαία την περαιτέρω μελέτη του (Andino & Hanning, 2015).



Εικόνα 12 Πιθανοί τρόποι μετάδοσης του μικροοργανισμού *Salmonella* spp. από τα ζώα στον άνθρωπο (wiki, 2019).

Ο μικροοργανισμός *Salmonella* spp. εισέρχεται στον ανθρώπινο οργανισμό ύστερα από κατανάλωση μολυσμένου τροφίμου ή νερού. Τα βακτήρια αφού βρεθούν στο γαστρεντερικό σωλήνα του ανθρώπου έχουν να ξεπεράσουν σημαντικά εμπόδια με βασικότερα το χαμηλό pH του γαστρικού υγρού όπως και τον ανταγωνισμό με τη φυσιολογική μικροχλωρίδα του ξενιστή. Αφού ξεπεράσουν τα πρώτα εμπόδια στο στομάχι διαπερνούν στο έντερο και ύστερα προσκολλώνται και στα κύτταρα του εντερικού επιθηλίου (Velge *et al.*, 2012). Ο μικροοργανισμός προκειμένου να συνεχίσει την πορεία του και να πολλαπλασιαστεί

ακολουθεί διαφορετικά στάδια: προσκόλληση και πρόσφυση σε επιφάνειες υποδοχής, και παραγωγή βακτηριακών παραγόντων, οι οποίοι διευκολύνουν τη διείσδυση, τον αρχικό πολλαπλασιασμό και την ικανότητα να ξεπεράσουν ή να παρακάμψουν τους αμυντικούς μηχανισμούς του ξενιστή (Wiedemann *et al.*, 2015).

1.4.2 Μολυσματικότητα

Το δυναμικό μολυσματικότητας ενός μικροοργανισμού αξιολογείται συνήθως με μοντέλα ιστοκαλλιέργειας (*in vitro*) και με μοντέλα σε ζώα (*in vivo* και *ex vivo*) (Lianou & Koutsoumanis, 2013). Με τη χρήση τέτοιων μοντέλων μόλυνσης, έχουν προσδιοριστεί πολλοί μολυσματικοί παράγοντες, οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για την πρόκληση φλεγμονώδους ανοσολογικής απόκρισης στον μολυσμένο ξενιστή από το *Salmonella* spp. (Hurley *et al.*, 2014).

Τα νησιά παθογένειας του *Salmonella* spp. (SPI-*Salmonella* Pathogenicity Islands), τα οποία αποκτήθηκαν ιστορικά μέσω γεγονότων μεταφοράς γονιδίων, περιλαμβάνουν μολυσματικά γονίδια, τα οποία κωδικοποιούν τους μηχανισμούς μέσω των οποίων το βακτήριο ενεργεί ως μολυσματικό παθογόνο (Graziani *et al.*, 2017; Hurley *et al.*, 2014; Lianou & Koutsoumanis, 2013). Αυτά τα γενετικά νησιά βρίσκονται στο βακτηριακό χρωμόσωμα ή σε πλασμίδια (Hurley *et al.*, 2014). Προς το παρόν 23 SPI (Hurley *et al.*, 2014) έχουν περιγραφεί, τα οποία κατανέμονται διαφορετικά ή δεν περιλαμβάνονται σε όλους τους ορότυπους της *S. enterica* (Lianou & Koutsoumanis, 2013) εκτός από τα SPI-1 έως SPI-5 που είναι κοινά σε όλους. Αν και το μέγεθος, η δομή και η λειτουργία των SPI μπορεί να είναι σημαντικά διαφορετική, υπάρχουν πολλά κοινά μοτίβα μεταξύ του SPI (Hensel, 2004). Οι λειτουργίες των γονιδίων που περιέχονται σε κάθε νησί δεν έχουν ακόμη αποσαφηνιστεί πλήρως (Hurley *et al.*, 2014), ενώ φαίνεται να είναι δυο γενικές κατηγορίες τύπων υπεύθυνες για την ποικιλομορφία μολυσματικότητας (Lianou & Koutsoumanis, 2013):

- i) Γονίδια που κωδικοποιούν τις επιφανειακές δομές όπως λιποπολυσακχαρίτες, μαστίγια και τριχίδια (O, H, Vi antigens-**Κεφάλαιο 1.1.2.4**) και λειτουργούν ως παράγοντες προσκόλλησης,
- ii) Ειδικά μολυσματικά γονίδια (*inv*) που κωδικοποιούν παράγοντες που τροποποιούν τη φυσιολογία του κυττάρου ξενιστή ή προστατεύουν το παθογόνο από τα αντιμικροβιακά συστήματα που αναπτύσσει ο ξενιστής.

Μεγάλη προσοχή έχει δοθεί στα SPI-1 και SPI-2, οι οποίες είναι κρίσιμες για την εισβολή των μη φαγοκυτταρικών κυττάρων και για την αναπαραγωγή σε μη φαγοκυτταρικά και φαγοκυτταρικά κύτταρα, αντίστοιχα (Graziani *et al.*, 2017).

1.4.3 Συμπτωματολογία σαλμονελώσεων

Η σαλμονέλωση αποτελεί μια τροφιμογενή λοίμωξη, καθώς αποτελεί ασθένεια τροφικής προέλευσης η οποία προκαλείται από την είσοδο στο σώμα μέσω του πεπτικού συστήματος με την κατανάλωση μολυσμένων τροφών και βασίζεται στην αντίδραση του σώματος στην παρουσία ή τα προϊόντα του μεταβολισμού τους. Κλινικά οι λοιμώξεις από το μικροοργανισμό *Salmonella* spp. στον ανθρώπινο οργανισμό παρουσιάζονται υπό δυο μορφές συμπτωματολογικής εικόνας:

ι. Γαστρεντερίτιδα (Τυφοειδής και παρατυφοειδής πυρετός)

Η σαλμονέλωση μπορεί να εκδηλωθεί ως γαστρεντερίτιδα, σηψαιμία ή εντερικό πυρετό (Andino & Hanning, 2015) και εμφανίζεται μία έως δύο εβδομάδες μετά τον βακτηριακό εμβολιασμό (Coburn *et al.*, 2007). Δόσεις από 10^3 έως 10^9 cfu/ml για την *Salmonella* Typhi είναι γνωστό ότι προκαλούν εντερικό πυρετό (Andino & Hanning, 2015). Συγκεκριμένα, η ασθένεια εμφανίζεται με γενικευμένο πυρετό και δυσφορία, κοιλιακό άλγος με ή χωρίς άλλα συμπτώματα, όπως κεφαλαλγία, μυαλγίες, ναυτία, ανορεξία και δυσκοιλιότητα. Η διάρροια συμβαίνει περιστασιακά, αλλά είναι τυπική μόνο της μόλυνσης στους ανοσοκατεσταλμένους (Coburn *et al.*, 2007).

Οι εντερικοί πυρετοί προκαλούνται από τα ειδικά-παθογόνα για τον άνθρωπο *S. enterica* των ορότυπων Typhi και Paratyphi. Η σοβαρότητα της λοίμωξης μπορεί να ποικίλλει από την αντίσταση του κάθε ατόμου και του ανοσοποιητικού συστήματος, όσο και η μολυσματικότητα του απομονωμένου μικροοργανισμού. Ο ορότυπος Typhi είναι αυτός που προκαλεί τις περισσότερες ενδημικές και επιδημικές περιπτώσεις τυφοειδούς πυρετού παγκοσμίως. Οι εντερικοί πυρετοί προκαλούν 200.000 θανάτους και 22.000.000 ασθένειες ανά έτος, με την υψηλότερη επίπτωση να συμβαίνει στη Νοτιοανατολική και Κεντρική Ασία όπου είναι ενδημικοί (Andino & Hanning, 2015).

Η πρωταρχική θεραπεία για τη μόλυνση από ορόσημο Typhi είναι οι φθοροκινολόνες, αν και χρησιμοποιούνται επίσης ναλιδιξικό οξύ και άλλοι αντιμικροβιακοί παράγοντες. Η θεραπεία είναι αποτελεσματική στη συντριπτική πλειονότητα των περιπτώσεων και μειώνει το χρόνο μέχρι την βακτηριακή κάθαρση, τα ποσοστά μεταφοράς και τη νοσηρότητα και θνησιμότητα που σχετίζονται με τη μόλυνση (Coburn *et al.*, 2007).

ii. Συστηματική νόσος (Μη τυφοειδής σαλμονέλωση)

Εκτιμώμενες περιπτώσεις παγκοσμίως ξεπερνούν σε μεγάλο βαθμό εκείνες των εντερικών πυρετών. Σε αντίθεση με τους ορότυπους Typhi και Paratyphi που αποτελούν προσαρμοσμένους μικροοργανισμούς του ανθρώπινου οργανισμού, οι *Salmonella* spp. που δεν προκαλούν τυφοειδή πυρετό έχουν ένα ευρύ φάσμα ξενιστών και δεν εμφανίζονται μονάχα στον ανθρώπινο οργανισμό. Πολλοί ορότυποι που σχετίζονται στενά με τροφιμογενείς επιδημίες περιλαμβάνουν το *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Newport* και *S. Heidelberg* και εμφανίζονται σε ζώα εκτροφής (Andino & Hanning, 2015). Η ασθένεια στους ανθρώπους συνήθως ακολουθεί την κατάποση περισσότερων από 50 000 βακτηρίων σε μολυσμένα τρόφιμα ή νερό με συμπτώματα που εμφανίζονται μεταξύ 6 και 72 ώρες μετά την κατανάλωση (Coburn *et al.*, 2007).

Μεταξύ άλλων τροφιμογενών παθογόνων, αυτοί οι μικροοργανισμοί είναι η κύρια αιτία θανάτου και νοσηλείων μετά από οξεία σηψαιμία και εντοπισμό σε διάφορα όργανα όπως ο σπλήνας, το ήπαρ, το ουροποιητικό σύστημα, και ο εγκέφαλος. Οι περιπτώσεις εμφανίζονται με γαστρεντερίτιδα ή βακτηριαιμία. Συμπτώματα μπορεί να περιλαμβάνουν ναυτία, έμετο και διάρροια και διαρκούν περίπου 5-7 ημέρες (Andino & Hanning, 2015; Coburn *et al.*, 2007). Η εντεροκολλητική λοίμωξη στα παιδιά χαρακτηρίζεται από αυξημένη φλεγμονώδη σοβαρότητα, αιμορραγική διάρροια και αυξημένη διάρκεια μόλυνσης και κίνδυνο επιπλοκών (Coburn *et al.*, 2007). Μπορεί επίσης να προκαλέσει χρόνιες παθήσεις, όπως άσηπτη αντιδραστική αρθρίτιδα και σύνδρομο Ράιτερ (Reiter's syndrome) (Andino & Hanning, 2015).

Ελλείψει θεραπείας για τέτοιες λοιμώξεις, τα συμπτώματα συνήθως διαρκούν. Η αντιμετώπιση των ανωμαλιών ισορροπίας και ηλεκτρολυτών από το στόμα ή η ενδοφλέβια επανυδάτωση είναι απαραίτητη σε περιπτώσεις όπου η απώλεια υγρών είναι σημαντική. Στους ενήλικες, η ειδική αντιμικροβιακή θεραπεία ενδείκνυται μόνο με την παρουσία θετικών σημείων διεισδυτικής νόσου και δεν μειώνει τη διάρκεια του ασθενούς και τη σοβαρότητα των συμπτωμάτων. Η νεογνική εντερική λοίμωξη απαιτεί επίσης θεραπεία για την πρόληψη της εισβολής (Coburn *et al.*, 2007).

1.4.4 Επιδημικά κρούσματα από τον παθογόνο μικροοργανισμό

Τα επιδημικά ξεσπάσματα σαλμονελλώσεων σε παγκόσμιο επίπεδο απασχολούν ιδιαίτερα την επιστημονική κοινότητα και τους υγειονομικούς φορείς, καθώς τα συλλεχθέντα στοιχεία δεν δείχνουν την αναμενόμενη μείωσή τους σε παγκόσμιο επίπεδο. Ανησυχία δε αποτελεί το

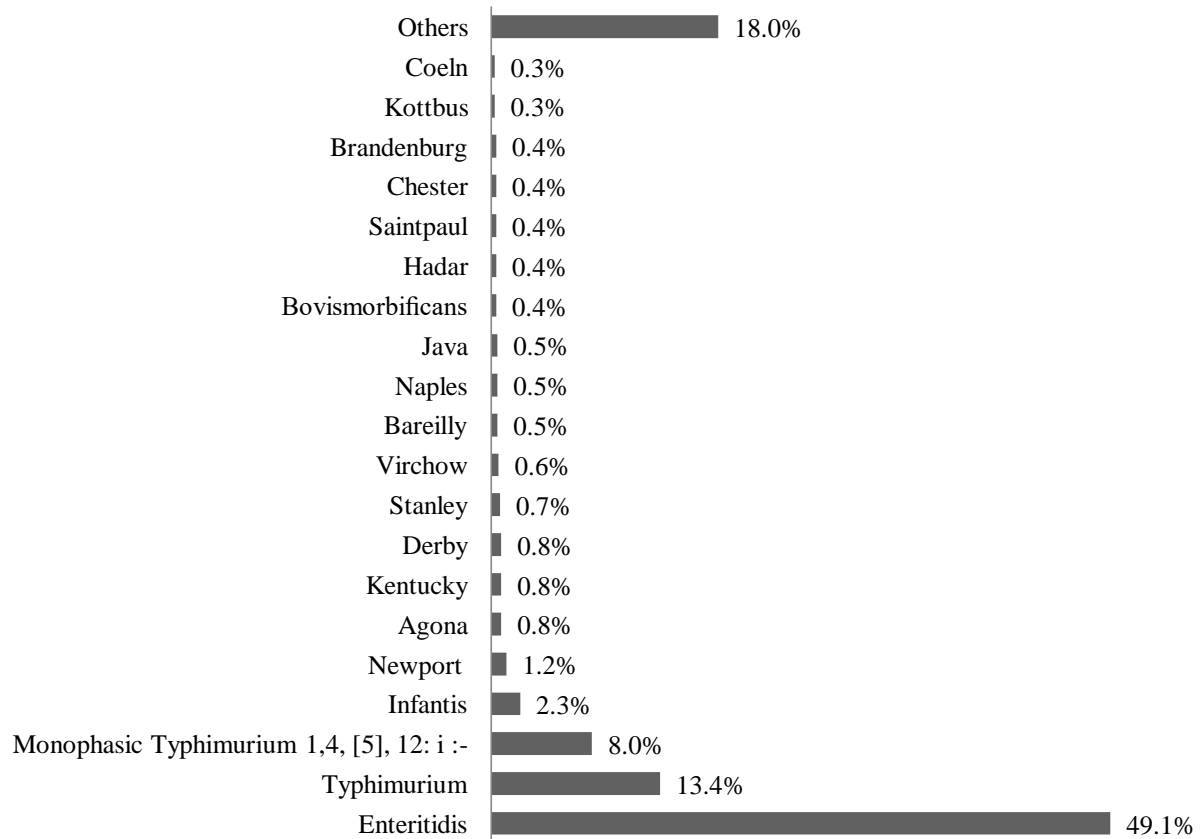
ότι πολλές περιπτώσεις παραμένουν αδήλωτες, είτε γιατί ο ασθενής αμελεί την επίσκεψή του στο γιατρό, είτε γιατί δεν λαμβάνονται δείγματα για εργαστηριακή ανάλυση, είτε τέλος γιατί τα δεδομένα δεν φθάνουν στο κέντρο αναφοράς. Αυτά καθιστούν τον αριθμό των δηλωθέντων κρουσμάτων ενδεικτικό. Η αυξημένη συχνότητα εκδήλωσης τους οφείλεται στην αυξημένη κατανάλωση τροφίμων στα οποία ευδοκμεί ο μικροοργανισμός, στη βιομηχανοποίηση της παραγωγής, στις μεγάλες ανάγκες ποσότητας παραγόμενων τροφίμων καθώς και σε λανθασμένους χειρισμούς από το στάδιο της παραγωγής έως και το χειρισμό του προϊόντος από τον καταναλωτή.

Το CDC εκτιμά ότι το βακτήριο *Salmonella* spp. προκαλεί περίπου 1.2 εκατομμύρια ασθένειες, 23.000 νοσηλείες και 450 θανάτους στις Ηνωμένες Πολιτείες κάθε χρόνο (CDC, 2019). Σύμφωνα με τα στοιχεία της EFSA ο συνολικός αριθμός κρουσμάτων σαλμονέλωσης στην Ευρωπαϊκή ένωση που οφείλονται σε τρόφιμα ήταν χαμηλότερα το 2017 σε σύγκριση με το 2016 και σε υψηλότερο επίπεδο σε σύγκριση με το 2015 και τα προηγούμενα έτη. Συνολικά, 93.583 περιπτώσεις ανθρώπινης σαλμονέλωσης αναφέρθηκαν από 28 κράτη μέλη της ΕΕ το 2017, με 91.662 επιβεβαιωμένες περιπτώσεις. Το 6.2% των κρουσμάτων προερχόταν από τη χώρα μας, στην οποία επιβεβαιώθηκαν 672 κρούσματα, λιγότερα δηλαδή από αυτά του 2016 όπου αριθμούσαν στα 735 κρούσματα. Από τα κρούσματα αυτά η πλειοψηφία φαίνεται να προήλθαν από εγχώριες πηγές μόλυνσης και μόλις 26 κρούσματα οφείλονταν σε κρούσματα συσχετισμένα με ταξίδια (EFSA & ECDC, 2018).

Βασικός παράγοντας πρόκλησης της ασθένειας αποτελεί το τρόφιμο-διανομέας του μικροοργανισμού με τις μελέτες να δείχνουν τα περισσότερα κρούσματα να οφείλονται σε κατανάλωση αυγών (36.8%) και προϊόντων που εμπεριέχουν αυγό (προϊόντα φούρνου 16.7%, αναμειγμένα προϊόντα 12.6%). Ένα πολύ σημαντικό ποσοστό οφείλεται στην κατανάλωση κρέατος και προϊόντων κρέατος (8.2%) και φυσικά ακολουθεί ένα ευρύ φάσμα τροφίμων που καθιστούν τον μικροοργανισμό ικανό να αναπτυχθεί.

Από τους ορότυπους που έχουν προσδιοριστεί οι πιο κοινοί που σχετίζονται με την ανθρώπινη ασθένεια είναι οι *S. enterica* serovar Typhimurium and *S. enterica* serovar Enteritidis στις Ηνωμένες Πολιτείες και τις Ευρωπαϊκές χώρες (Lee *et al.*, 2015). Όπως και τα προηγούμενα χρόνια, οι τρεις πιο συχνά αναφερόμενοι ορότυποι του *Salmonella* spp. το 2017 ήταν ο *S. Enteritidis*, ο *S. Typhimurium* και ο μονοφασικός *S. Typhimurium* (1,4, [5], 12: i :-), εκδηλώνοντας το 70,5% των 78.949 επιβεβαιωμένων ανθρώπινων περιστατικών και *S. Infantis* που ήταν στο ίδιο επίπεδο με το 2015 και το 2016 και αποτέλεσε τον 4^ο σε σειρά πιο κοινό ορότυπο (EFSA & ECDC, 2018; Lee *et al.*, 2015). Ο πέμπτος πιο κοινός ορότυπος *S. Newport* αυξήθηκε κατά 22,8%, και ο *S. Agona* κατά 61,8% μέσα σε 2 χρόνια από το 2015

και αντικατέστησε τον *S. Derby* ως ο έκτος πιο κοινός ορότυπος. Η κατανομή των 20 πιο κοινών ορότυπων κατά το έτος 2017, που αποτελούν και τα πιο πρόσφατα δεδομένα της EFSA παρουσιάζονται στο **Γράφημα 1**.



Γράφημα 1 Ποσοστιαία κατανομή των 20 πιο συχνά εμφανιζόμενων ορότυπων *Salmonella* spp. κατά το έτος 2017 σε 27 χώρες μεταξύ των οποίων και η Ελλάδα (EFSA & ECDC, 2018).

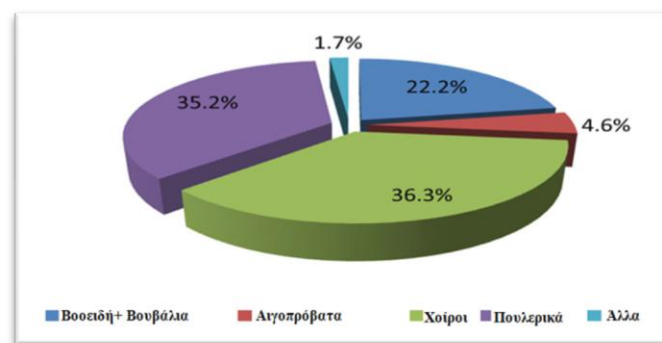
1.5 Το κρέας

1.5.1 Διατροφική αξία

Από τη νεολιθική κιάλας εποχή ο άνθρωπος εκμεταλλευόταν τα πουλερικά για το κρέας και τα αυγά που παρήγαγαν, τα βοοειδή και αιγοπρόβατα για το κρέας και γάλα που τους παρείχαν και τους χοίρους για κρεατοπαραγωγή (FAO, 2014). Σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή νομοθεσία ο όρος κρέας αναφέρεται ως τα εδάδιμα μέρη των ζώων όπως κατοικίδια οπληφόρα, πουλερικά, λαγόμορφα, άγρια θηράματα, εκτρεφόμενα θηράματα, μικρά και μεγάλα αγρία θηράματα, συμπεριλαμβανομένου του αίματος (Κανονισμός 853, /2004).

Το κρέας αποτελεί μια από τις βασικότερες τροφές του ανθρώπου ενώ συμβάλλει σημαντικά και στην εξέλιξή του. Πρόκειται για ένα απαραίτητο συστατικό για μια

ισορροπημένη διατροφή. Το κρέας αποτελεί πολύτιμη πηγή πρωτεϊνών, σιδήρου, βιταμίνης B12 καθώς και άλλων βιταμινών συμπλέγματος B, ψευδαργύρου, σεληνίου και φωσφόρου. Όσον αφορά δε τις πρωτεΐνες οι οποίες συντίθενται μόνο από 20 αμινοξέα εκ των 190 που είναι γνωστές, αυτές του κρέατος ξεχωρίζουν στη διατροφική αλυσίδα λόγω της αφθονίας τους στα 8 από τα 20 αμινοξέα τα οποία δεν μπορεί να συνθέσει ο ανθρώπινος οργανισμός και θεωρούνται απαραίτητα. Η περιεκτικότητα του σε λιπαρά, θρεπτικά συστατικά και η σύνθεση των λιπαρών οξέων στο κρέας μπορεί να είναι συνάρτηση του γενετικού μοντέλου του ζώου, της φυλής του, της διατροφής του, του συστήματος εκτροφής του, του τμήματος από το σφάγιο όπου προήλθε ή ακόμα και του μαγειρέματος και της επεξεργασίας στην οποία υπόκεινται το κρέας (Marangoni *et al.*, 2015; Pereira & Vicente, 2013)



Εικόνα 13 Πηγές κρέατος παγκοσμίως το έτος 2012 (FAO, 2014).

Το χοιρινό κρέας είναι το πιο διαδεδομένο κρέας στον κόσμο που αντιπροσωπεύει πάνω από το 36% της παγκόσμιας κατανάλωσης κρέατος. Ακολουθούν τα πουλερικά και το βόειο κρέας με περίπου 35% και 22% αντίστοιχα. Ως πουλερικά αναφέρονται τα οικόσιτα είδη πτηνών και ειδικά εκείνα που εκτρέφονται για το κρέας και τα αυγά τους όπως κοτόπουλα, γαλοπούλες, πάπιες και χήνες (FAO, 2014).

1.5.2 Η ποιότητα του κρέατος

Η ποιότητα αποτελεί το κύριο κριτήριο επιλογής του κρέατος από τον καταναλωτή και μπορεί να εξαρτάται από διάφορους παράγοντες. Οι κυριότεροι δείκτες ποιότητας του κρέατος είναι συνήθως η εμφάνιση, τα τεχνολογικά χαρακτηριστικά του, η σύσταση του, η γευστικότητα, η υγιεινή και τα ηθικά κριτήρια όσον αφορά την εκτροφή τους, με κυρίαρχα τα δυο πρώτα καθώς επιδρούν περισσότερο στην πρώτη επιλογή του καταναλωτή (D. L. Fletcher, 2002).

Η εμφάνιση του νωπού κρέατος μπορεί να αποτρέψει ένα καταναλωτή από το να αγοράσει το προϊόν αν δεν συμφωνεί με τα γούστα του όσον αφορά το χρώμα του δέρματος,

το χρώμα του κρέατος και την ύπαρξη ατελειών όπως μώλωπες και αιμορραγίες ενώ για ένα μαγειρεμένο κρέας το ροζ χρώμα υποδηλώνει ότι το κρέας δεν έχει μαγειρευτεί αρκετά. Το χρώμα μπορεί να επηρεάζεται από την ηλικία, το φύλο και τους μυς του ζώου και την επεξεργασία (π.χ. προσθήκη νιτρικών) και διαχείριση του όπως τη θερμοκρασία και το pH ενώ βασικό ρόλο διαδραματίζουν οι μορφές της χρωμοπρωτεΐνης του, της μυοσφαιρίνης. Η μυοσφαιρίνη έχει την ικανότητα να δεσμεύει οξυγόνο και έτσι παρουσία αυτού το χρώμα του κρέατος είναι λαμπερό, πορφυρό κόκκινο καθώς σχηματίζεται η οξυμυοσφαιρίνη. Αν αντί για οξυγόνωση γίνει οξειδωση της μυοσφαιρίνης σχηματίζεται η μεταμυοσφαιρίνη η οποία οφείλεται για το καστανό χρώμα του κρέατος. Το pH του μυός φαίνεται να σχετίζεται κυρίως με τη βιοχημική κατάσταση του μυός κατά τη σφαγή και την ανάπτυξη της σκληρότητας. Και οι δύο αυτοί παράγοντες συμβάλλουν στο χρώμα του κρέατος και στην εμφάνιση ελαττωμάτων χρώματος κρέατος (D. L. Fletcher, 2002).

Η υφή από την άλλη μεριά αποτελεί ένα οργανοληπτικό χαρακτηριστικό που επηρεάζει σημαντικά και την τελική αξιολόγηση ενώ η γεύση και η τρυφερότητα μπορεί να είναι συνάρτηση της διαχείρισης του στη γραμμή παραγωγής ή της προετοιμασίας του προϊόντος πριν το μαγείρεμα. Μετά από λίγες ώρες σφαγής των ζώων, οι μύες γίνονται σταθεροί και δύσκαμπτοι λόγω της σμίκρυνσης των σαρκομεριδίων, μια κατάσταση γνωστή ως νεκρική ακαμψία. Η διαδικασία της ακαμψίας εξαρτάται από το άγχος που προκαλείται στα ζώα κατά τη διάρκεια της διαδικασίας σφαγής. Μετά από αυτό το στάδιο επέρχεται η ωρίμανση και τρυφεροποίηση του κρέατος με τη δράση ενδογενών πρωτεολυτικών ενζύμων, των καλπεϊνών. Σύμφωνα με τον Fletcher το κρέας και ειδικά το κρέας κοτόπουλου πρέπει να παραμείνει σε μια μεταθανάτια περίοδο γήρανσης πριν την αφαίρεση των οστών και την κοπή έτσι ώστε να αποφευχθεί η υπερβολική σκληρότητα (D. L. Fletcher, 2002). Οι βιοχημικές μεταβολές που παίρνουν μέρος μετά τη θανάτωση του ζώου επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό την τρυφερότητα. Οι μυς διαθέτουν γλυκογόνο η περιεκτικότητά του οποίου μειώνεται όταν το ζώο βρεθεί σε συνθήκες στρες και οδηγούν στη μείωση του pH και της ικανότητας συγκράτησης νερού λόγω της παραγωγής γαλακτικού οξέος. Το γαλακτικό οξύ μαζί με άλλα μεταβολικά προϊόντα παράγεται μέσω της αναερόβιας γλυκόλυσης μετά τη διάσπαση του περιεχόμενου γλυκογόνου δίνοντας τελικά μια πιο σκληρή υφή.

Ωστόσο η ποιότητα του κρέατος δεν καθορίζεται συνολικά μόνο από τα εγγενή χαρακτηριστικά του καθώς ολόένα και περισσότερο οι καταναλωτές ενδιαφέρονται για τον τρόπο εκτροφής των ζώων και τις συνθήκες υγιεινής ενώ διανύουν τη διαδρομή «από τη φάρμα στο τραπέζι» (Addis, 2015). Στον παρακάτω πίνακα συνοψίζονται ορισμένα ποιοτικά χαρακτηριστικά του κρέατος και ορισμένοι δείκτες που τα επηρεάζουν.



Εικόνα 14 Μικροβιολογικός έλεγχος προϊόντος κρέατος με μέθοδο swabbing.

Ποιοτικό χαρακτηριστικό	Δείκτες
Σύσταση του κρέατος	Ποσοστό λίπους προς άπαχο κρέας Μέγεθος και σχήμα μυών
Εμφάνιση και τεχνολογικά Χαρακτηριστικά	Υφή και χρώμα Ποσοστό ενδομυϊκού λίπους Ατέλειες (π.χ. μώλωπες) Ικανότητα συγκράτησης νερού του άπαχου
Γευστικότητα	Κρέατος Τρυφερότητα Χυμός Άρωμα
Ηθικά κριτήρια	Τρόπος εκτροφής των ζώων Ευεξία και ευημερία των ζώων
Υγιεινή	Ασφαλής διαχείριση μικροβιολογικών, χημικών και φυσικών κινδύνων Διατήρηση θρεπτικών συστατικών

Πίνακας 6 Ποιοτικά χαρακτηριστικά κρέατος (D. L. Fletcher, 2002).

1.5.3 Από την ποιότητα στην ασφάλεια

Σύμφωνα με την προηγούμενη ενότητα ποιότητα είναι η ικανότητα ενός προϊόντος να ικανοποιεί τις ανάγκες των καταναλωτών χωρίς να φέρει ελαττώματα. Αυτή όμως η έννοια δεν αρκεί ως στόχος για μια ορθή παραγωγική διαδικασία καθώς δεν ταυτίζεται με την ασφάλεια των προϊόντων, παρά το γεγονός ότι ο καταναλωτής πολλές φορές δεν έχει τις απαραίτητες γνώσεις και τα συσχετίζει. Εδώ υπεισέρχεται λοιπόν η ανάγκη ανάπτυξης συστήματος HACCP (Hazard Analysis Critical Control Points) οπού όπως περιγράφεται στον Codex Alimentarius πρόκειται για «μια συστηματική προσέγγιση για τον εντοπισμό, την αξιολόγηση, και τον έλεγχο των κινδύνων σε όλα τα στάδια παραγωγής τροφίμων» (Codex Alimentarius, 1997). Ο λόγος που το σύστημα αυτό είναι απαραίτητο είναι ότι βασίζεται στη

πρόληψη εμφάνισης πιθανών προβλημάτων ασφάλειας κατά την παραγωγική διαδικασία με θέσπιση κρίσιμων ορίων και σε περίπτωση εμφάνισης κινδύνου λήψη διορθωτικών ενεργειών. Οι κίνδυνοι μπορεί να είναι βιολογικοί, χημικοί και φυσικοί και πρόκειται για παράγοντες που μπορούν να προκαλέσουν μια δυσμενή επίδραση στην υγεία (Tompkin, 1994). Σήμερα, οι βιομηχανίες τροφίμων επενδύουν σημαντικό μέρος των πόρων τους για να εξασφαλίσουν την ασφάλεια των τροφίμων τους για μείωση των μεγάλων οικονομικών απωλειών που οφείλονται στη μικροβιολογική αλλοίωση των τροφίμων, καθώς και στην εμφάνιση διατροφικών ασθενειών στους καταναλωτές (Tsola *et al.*, 2008).

Ειδικότερα, για τη βιομηχανία κρέατος, το κρέας σύμφωνα με τον Codex Alimentarius πρέπει να ακολουθεί τις παρακάτω προδιαγραφές ώστε να θεωρείται ασφαλές (Codex Alimentarius, 1993a; Tompkin, 1994):

- Δεν προκαλεί τροφολοιμώξεις ή τροφοτοξινώσεις αφότου προετοιμαστεί και επεξεργαστεί σύμφωνα με την αναμενόμενη χρήση του
- Δεν περιέχει υπολείμματα ουσιών σε μεγαλύτερη ποσότητα από τα καθορισμένα όρια του Codex
- Είναι απαλλαγμένο από εμφανείς επιμολύνσεις
- Είναι απαλλαγμένο από εμφανείς αλλοιώσεις που αναγνωρίζονται σαν ελαττώματα από τους καταναλωτές
- Έχει παραχθεί κάτω από επαρκείς ελεγχόμενες συνθήκες υγιεινής
- Δεν έχει υποστεί επεξεργασία με ουσίες που απαγορεύονται από την εθνική νομοθεσία κάθε κράτους.

Έχει επιτευχθεί διεθνής αποδοχή του συστήματος HACCP, των αρχών του και της εφαρμογής του με επακόλουθη διευκόλυνση του διεθνούς εμπορίου και ιδιαίτερα σε βιομηχανίες όπως του κρέατος όπου τεράστιες ποσότητες διακινούνται από χώρα σε χώρα. Πολλά μπορεί να είναι τα οφέλη μιας βιομηχανίας κρέατος και πουλερικών μέσω της εφαρμογής από τη φάρμα κιάλας ενός πλήρους και σωστά ανεπτυγμένου συστήματος HACCP. Μόνο ένα πολυπαραγοντικό σύστημα σαν και αυτό μπορεί να ελαχιστοποιήσει ή να αποτρέψει την εμφάνιση προβλημάτων ασφάλειας τροφίμων, διατηρώντας έτσι την εμπιστοσύνη των καταναλωτών και προστατεύοντας την επιχείρηση (Tompkin, 1994).

1.5.4 Ανάπτυξη μικροοργανισμών σε προϊόντα κρέατος

Μετά τη σφαγή και κατά με την πάροδο του χρόνου το κρέας χάνει τη φρεσκότητά του και ειδικά όταν βρίσκεται σε δυσμενής συνθήκες. Ωστόσο η απώλεια φρεσκότητας

μεταφράζεται αλλιώς ως αλλοίωση και πρόκειται για μια έννοια που κάθε καταναλωτής αντιλαμβάνεται διαφορετικά, ενώ μπορεί να επηρεάζεται από τις πολιτισμικές και τις οικονομικές πτυχές μιας κοινωνίας. Ύστερα από τη ραγδαία αύξηση του πληθυσμού και στη συνέχεια των αναγκών για ποιοτικά τρόφιμα, περισσότερη προσοχή δόθηκε στη μικροβιολογία και στην οικολογία του τομέα των τροφίμων (G.-J. E. Nychas *et al.*, 2008). Όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα με συγκεκριμένα παραδείγματα που αφορούσαν το χρώμα και την υφή του κρέατος βασικά αίτια αλλοίωσης είναι η μικροβιακή δράση και η ενζυμική δράση.

Το κρέας αποτελεί ένα πολύπλοκο υπόστρωμα, το οποίο ευνοεί την ανάπτυξη ενός πλήθους μικροοργανισμών, αλλοιογόνων ή παθογόνων (**Πίνακες 7 και 8**). Η ανάπτυξη αλλά και οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μικροοργανισμών επιδρούν αισθητά στη διατήρηση και στο χρόνο ζωής του. Οι παράγοντες που επιδρούν στη μικροβιακή ανάπτυξη είναι οι ενδογενείς, παράγοντες κατά την επεξεργασία, εξωγενείς, ενδογενείς βιοτικοί παράγοντες (συνεργισμός ή ανταγωνισμός μεταξύ βακτηρίων) και συνεργιστικοί παράγοντες (παράγοντες που αλληλεπιδρούν και είναι εντονότεροι από το αν δρούσαν μεμονωμένα)(G.-J. Nychas & Skandamis, 2005; G. J. Nychas *et al.*, 2008). Ένα ζώο που μπορεί να φέρει στο εσωτερικό των ιστών του μικροοργανισμούς αλλά επίσης οι εξωτερικοί παράγοντες κατά την επεξεργασία είναι αυτοί που το μολύνουν. Κατά κύριο λόγο μικροοργανισμοί που προέρχονται από τον εντερικό σωλήνα και από το τρίχωμα του ίδιου του ζώου ή από το περιβάλλον στο οποίο γίνεται η σφαγή είναι και οι πιο επίφοβοι (G. J. Nychas *et al.*, 2008; Tsola *et al.*, 2008). Επιπλέον πιθανές πηγές επιμόλυνσης από μικροοργανισμούς είναι οι κακές πρακτικές εκτροφής πριν τη σφαγή, ηλικία του ζώου κατά τη σφαγή, ο χειρισμός κατά τη σφαγή, η θερμοκρασία κατά την επεξεργασία και διανομή, ή συσκευασία και ο χειρισμός από τον καταναλωτή μετά την αγορά (Addis, 2015).

Ιδιαίτερης προσοχής χρήζουν οι μακροβιολογικοί κίνδυνοι π.χ. έντομα (αποτελούν έμμεσο κίνδυνο καθώς μεταφέρουν μικροοργανισμούς) και μικροβιολογικοί κίνδυνοι δηλαδή οι μικροοργανισμοί που ευδοκιμούν στο τρόφιμο (βακτήρια, ζύμες, μύκητες, ιοί και παράσιτα) ή οι τοξίνες που παράγουν κάποιοι από αυτούς (Αρβανιτογιάννης *et al.*, 2001). Οι παθογόνοι μικροοργανισμοί μπορεί να είναι οι αιτία τροφικών δηλητηριάσεων όταν βρεθεί ο επαρκής πληθυσμός και ειδικά αν πρόκειται για άτομα που εντάσσονται στην κατηγορία των YOPIs. Ήδη από το 1996 το USDA είχε εκδώσει κατευθυντήριες γραμμές ελέγχου των κινδύνων που αφορούν το κρέας και τα πουλερικά ενώ παρουσίασε κάποια χαρακτηριστικά ανάπτυξης των πιο συνηθισμένων παθογόνων (USDA, 1996) που μέχρι και σήμερα διαδραματίζουν κύριο ρόλο (**Πίνακας 9**).

Γένος	Χρόση Gram	Νωπό κρέας	Επεξεργασμένο κρέας	Συσκευασμένο κρέας σε κενό
Achromobacter	-	X		
Acinetobacter	-	XX	X	X
Aeromonas	-	XX	X	X
Alcaligenes	-	X		
Alteromonas	-	X	X	
Arthrobacter	-/+	X	X	
Bacillus	+	X	X	XX
Brochothrix	+	X	X	
Campylobacter	-	X		
Carnobacterium	+	X		XX
Chromobacterium	-	X		
Citrobacter	-	X		
Clostridium	+	X		
Corynebacterium	+	X	X	X
Enterobacter	-	X	X	X
Enterococcus	+	XX	X	XX
Escherichia	-	X		
Flavobacterium	-	X		
Hafnia	-	X	X	
Janthinobacteriu	-		X	
Klebsiella	-	X		
Kluyvera	-	X		
Kocuria	+	X	X	X
Kurthia	+	X		X
Lactobacillus	+	X	XX	XX
Lactococcus	+	X		
Leuconostoc	+	X	X	X
Listeria	+	X	X	
Microbacterium	+	X	X	X
Micrococcus	+	X	X	X
Moraxella	-	XX		
Paenibacillus	+	X	X	
Pantoea	-	X		
Proteus	-	X		
Providencia	-	X	X	X
Pseudomonas	-	XX	X	
Shewanella	-	X	X	X
Staphylococcus	+	X	X	X
Streptococcus	+	X	X	
Vibrio	-	X		
Weissella	+	X	X	X
Yersinia	-	X		X

Πίνακας 7 Γένη βακτηρίων που παρατηρούνται στο νωπό, επεξεργασμένο, συσκευασμένο κρέας. Όπου X: γνωστό ότι εμφανίζεται, XX: πιο συχνά απομονωμένο (G. J. Nychas *et al.*, 2007).

Μικροοργανισμός	Νωπό κρέας	Επεξεργασμένο κρέας
Ζύμες		
Candida	XX	X
Cryptococcus	X	
Debaryomyces	X	XX
Hansenula	X	
Pichia	X	
Rhodotorula	X	
Saccharomyces		X
Torulopsis	XX	
Trichosporon	X	X
Μύκητες		
Alternaria	X	X
Acremonium	X	
Aspergillus	X	XX
Aureobasidium	X	
Botrytis		X
Cladosporium	XX	X
Chrysosporium	X	
Fusarium	X	X
Geotrichum	XX	X
Monascus	X	
Monilia	X	X
Mucor	XX	X
Neurospora	X	
Penicillium	X	XX
Rhizopus	XX	X
Scopulariopsis		X
Sporotrichum	XX	
Thamnidium	XX	X

Πίνακας 8 Μικροοργανισμοί που εμφανίζονται συχνά στο νωπό και επεξεργασμένο κρέας. Όπου X: γνωστό ότι εμφανίζεται, XX: πιο συχνά απομονωμένο (G. J. Nychas *et al.*, 2007).

Παθογόνο	θ° Ανάπτυξης	pH	Ελάχιστη a_w	Χαρακτηριστικά	Παραδείγματα προληπτικών μέτρων αντιμετώπισης
<i>Bacillus cereus</i>	10-48	4.9-9.3	0.95	Παράγει δυο ειδών τοξίνες. Η μια προκαλεί διάρροια και η άλλη έμεση.	Κατάλληλη θερμοκρασία διατήρησης και ψύξης των τροφίμων
<i>Campylobacter jejuni</i>	30-47	6.5-7.5	--	Η ασθένεια που προκαλεί είναι γνωστή ως εντερίτιδα ή γαστρεντερίτιδα από καμπυλοβακτήριο.	Αποφυγή διασταυρούμενης επιμόλυνσης του εξοπλισμού, ψύξη και κατάψυξη, ατμοσφαιρική συσκευασία
<i>Clostridium botulinum</i> Ομάδα I (Τοξίνη τύπου types A,B,F) Ομάδα II (Τοξίνη τύπου B,E,F)	10-48 3.3-45	>4.6	0.94	Προκαλεί τροφική αλλαντίαση που οφείλεται στη νευροτοξίνη που παράγει ο μικροοργανισμός κατά την ανάπτυξη του.	Προσθήκη νιτρωδών και αλάτων, ψύξη σε κενό, μείωση της υγρασίας όταν $a_w < 0,93$
<i>Clostridium perfringens</i>	15-50	5.5-8.0	0.95	Η δηλητηρίαση οφείλεται στην παραγωγή εντεροτοξίνης κατά τη δημιουργία σπορίων από το μικροοργανισμό στο έντερο.	Κατάλληλη θερμοκρασία διατήρησης και ψύξης των τροφίμων
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	10-42	4.5-9.0	--	Προκαλεί αιμορραγική κολίτιδα.	Κατάλληλη θερμοκρασία διατήρησης και ψύξης των τροφίμων
<i>Listeria monocytogenes</i>	2.5-44	5.2-9.6	--	Προκαλεί λιστερίωση.	Αυστηρό πρόγραμμα καθαριότητας (SOPs), διαχωρισμός εγκαταστάσεων πρώτων υλών και έτοιμων προς διανομή προϊόντων
<i>Salmonella</i> spp.	5-47	4-9	0.94-0.99	Προκαλεί σαλμονέλωση και παρουσιάζονται από πιο ήπια έως οξεία συμπτώματα.	Διαχωρισμός εγκαταστάσεων πρώτων υλών και έτοιμων προς διανομή προϊόντων, έλεγχοι ζυμώσεων, μειωμένη a_w , απομάκρυνση των ζωοτροφών από τα ζώα πριν τη σφαγή, αποφυγή επαφής σφαγίου με δέρμα κατά την εκδορά, αντιμικροβιακές πλύσεις, κατάλληλες θερμοκρασίες, απολυμασμένα μαχαίρια
<i>Staphylococcus aureus</i>	6.5-46	5.2-9	0.86	Αιτία λοιμώξεων λόγω ανάπτυξης εντεροτοξινών από διάφορα στελέχη του <i>S.aureus</i>	Σωστή ζύμωση και έλεγχος του pH, μειωμένη a_w , σωστές θερμοκρασίες
<i>Yersinia enterocolitica</i>	2-45	4.6-9.6	--	Προκαλεί γαστρεντερίτιδα με διάρροια, εμετό, πυρετό και κοιλιακό άλγος.	Σωστή ψύξη, έλεγχος των αλάτων και της οξύτητας, αποφυγή διασταυρούμενης επιμόλυνσης

Πίνακας 9 Βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης παθογόνων μικροοργανισμών σε κατασκευάσματα και πουλερικά (USDA, 1996).

1.5.5 Νομοθεσίες σχετικές με την παραγωγική διαδικασία προϊόντων ζωικής προέλευσης

Για τα τρόφιμα πολλές είναι οι νομοθεσίες και οι κανονισμοί που λαμβάνουν χώρα καθώς αποτελούν και μέρος του διεθνούς εμπορίου. Εκτός από τους γενικούς κανονισμούς υπάρχουν και πιο εξειδικευμένοι για τρόφιμα όπου οι ανάγκες του τροφίμου, τους καθιστούν αναγκαίους. Παρακάτω αναφέρονται ορισμένοι Κανονισμοί που οφείλει κανείς να ανατρέξει για μια παραγωγική διαδικασία προϊόντων ζωικής προέλευσης:

- Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 853/2004 για τον καθορισμό ειδικών κανόνων υγιεινής για τα τρόφιμα ζωικής προέλευσης
- Οδηγία 2002/99/ΕΚ: κανόνες υγειονομικού ελέγχου που διέπουν την παραγωγή, μεταποίηση, διανομή και εισαγωγή προϊόντων ζωικής προέλευσης που προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση
- Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 178/2002 για τον καθορισμό των γενικών αρχών και απαιτήσεων της νομοθεσίας για τα τρόφιμα, για την ίδρυση της Ευρωπαϊκής Αρχής για την Ασφάλεια των Τροφίμων και τον καθορισμό διαδικασιών σε θέματα ασφαλείας των τροφίμων.
- Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 852/2004 για την υγιεινή των τροφίμων
- Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 854/2004 για τον καθορισμό ειδικών διατάξεων για την οργάνωση των επίσημων ελέγχων στα προϊόντα ζωικής προέλευσης που προορίζονται για κατανάλωση από τον άνθρωπο
- Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 882/2004 για τη διενέργεια επίσημων ελέγχων της συμμόρφωσης προς τη νομοθεσία περί ζωοτροφών και τροφίμων και προς τους κανόνες για την υγεία και την καλή διαβίωση των ζώων
- Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 2073/2005 περί μικροβιολογικών κριτηρίων για τα τρόφιμα
- Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1069/2009, περί υγειονομικών κανόνων για ζωικά υποπροϊόντα και παράγωγα προϊόντα που δεν προορίζονται για κατανάλωση από τον άνθρωπο και για την κατάργηση του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1774/2002 (κανονισμός για τα ζωικά υποπροϊόντα)
- Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1774/2002, για τον καθορισμό υγειονομικών κανόνων σχετικά με τα ζωικά υποπροϊόντα που δεν προορίζονται για κατανάλωση από τον άνθρωπο.

Ο έλεγχος της μόλυνσης των τροφίμων με το μικροοργανισμό *Salmonella* αφορά την υγιεινή των διεργασιών και τα κριτήρια ασφάλειας των τροφίμων. Οι υπεύθυνοι επιχειρήσεων τροφίμων δεσμεύονται για τις γενικές απαιτήσεις υγιεινής των τροφίμων, όπως οι διαδικασίες εφαρμογής που βασίζονται σε HACCP και ορθές πρακτικές υγιεινής, καθώς

και οι ειδικές απαιτήσεις υγιεινής όσον αφορά τα μη επεξεργασμένα και μεταποιημένα προϊόντα της ζωικής προέλευσης (κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 853/2004).

Με τον Ευρωπαϊκό Κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 2073/2005 που αφορά τα μικροβιολογικά κριτήρια στα τρόφιμα, προκύπτουν:

- ✓ Συμπληρωματικά κριτήρια υγιεινής της διαδικασίας για τη *Salmonella*, ιδίως για τα σφάγια κρεατοπαραγωγής και γαλοπούλες, καθορίζονται ενδεικτικές τιμές πάνω από τις οποίες απαιτούνται διορθωτικά μέτρα για τη διατήρηση της υγιεινής κατά τη μεταποίηση.
- ✓ Απαιτήσεις συμμόρφωσης με την απουσία του μικροοργανισμού σε αμεταποίητα και μεταποιημένα προϊόντα ζωικής προέλευσης, συμπεριλαμβανομένων του κρέατος πουλερικών και των προϊόντων με βάση το κρέας.

Σύμφωνα με τη νομοθεσία η ανίχνευση του μικροοργανισμού *Salmonella* spp. γίνεται σε 25 ή 10g δείγματος, ανάλογα με το βαθμό επικινδυνότητας του τροφίμου ή τους καταναλωτές στους οποίους απευθύνεται. Οι επίσημοι έλεγχοι των προϊόντων ζωικής προέλευσης που προορίζονται για κατανάλωση από τον άνθρωπο πρέπει να εξασφαλίζουν ότι το νομικό πλαίσιο για τις συνθήκες υγιεινής εφαρμόζεται ορθά από του υπεύθυνους ασφάλειας τροφίμων (Graziani *et al.*, 2017).

2. Σκοπός της εργασίας

Ο μικροοργανισμός *Salmonella* spp. αποτελεί ένα από τα κυριότερα τροφιμογενή βακτήρια, που εξακολουθούν να επικρατούν παρά τη βελτίωση των πρακτικών εξάλειψης του, ειδικά στα προϊόντα κρέατος. Η προσαρμογή αποτελεί έναν σημαντικό παράγοντα παραμονής, επιβίωσης και ανάπτυξης του παθογόνου. Η ικανότητα επιβίωσης από τους μικροοργανισμούς διαφέρει σε επίπεδο στελεχών, και η απόκριση τους σε διάφορα περιβάλλοντα μπορεί να οδηγεί σε διαφορετικό φαινότυπο.

Σκοπός της μελέτης είναι η μικροβιολογική ανάλυση δειγμάτων από μια ελληνική βιομηχανία κρέατος, κατά τα έτη 2014-2019, για τη διεξαγωγή συμπερασμάτων αναφορικά με την επικινδυνότητα των τροφίμων και την προέλευση των επιμολύνσεων και τελικά την καταχώριση αυτών στη διαδικτυακή πλατφόρμα e-platon. Αντικείμενο της μελέτης είναι η παραγωγή μικροβιολογικών δεδομένων που αφορούν τα φαινοτυπικά και γονοτυπικά χαρακτηριστικά απομονωθέντων στελεχών του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella* spp. που σχετίζεται με τις Α' ύλες και το περιβάλλον επεξεργασίας των τροφίμων. Τα δεδομένα αυτά μπορούν να αποτελέσουν σημαντικά στοιχεία για την πρόληψη και την αντιμετώπιση του εξεταζόμενου μικροοργανισμού στη βιομηχανία τροφίμων.

Για τις ανάγκες της παρούσας εργασίας, για τον παθογόνο μικροοργανισμό *Salmonella enterica* αναπτύχθηκαν και εφαρμόστηκαν πρωτόκολλα αναγνωρισμένα και προτεινόμενα από τη διεθνή βιβλιογραφία. Συγκεκριμένα για την επίτευξη του στόχου, υλοποιήθηκαν οι εξής διαδικασίες:

A. Μοριακός χαρακτηρισμός.

Χαρακτηρισμός και κατάταξη στους κυριότερους ορότυπους, συνολικά 142 απομονώσεων *Salmonella* spp., σύμφωνα με τους Beaubrun *et al.*, 2012.

B. Φαινοτυπικός χαρακτηρισμός.

- ✓ Προσδιορισμός ικανότητας σχηματισμού βιοϋμενίων σε τρυβλία μικροτιτλοδότησης.
- ✓ Προσδιορισμός της επίδρασης διαφορετικών τιμών pH στην ανάπτυξη του μικροοργανισμού, με μέτρηση της οπτικής πυκνότητας και ποσοτικοποίησης με τη βοήθεια μοντέλων πρόβλεψης.
- ✓ Προσδιορισμός του MIC των μικροοργανισμών σε δυο ευρέως χρησιμοποιούμενων απολυμαντικών στη βιομηχανία τροφίμων: BC, PAA.

3. Υλικά και Μέθοδοι-Πειραματικό Μέρος

3.1 Βακτηριακές απομονώσεις *Salmonella enterica*

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν απομονώσεις *Salmonella* που βρίσκονταν ήδη στη συλλογή του εργαστηρίου Υγιεινής και Ποιοτικού Ελέγχου Τροφίμων και Ποτών (ΕΠΕΥΤΠ) του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών (ΓΠΑ).

Πρόκειται για 142 απομονώσεις *Salmonella enterica* που απομονώθηκαν κατά τα τελευταία πέντε χρόνια από μια ελληνική βιομηχανία προϊόντων κρέατος και παρουσιάζονται στο **Παράρτημα**. Οι απομονώσεις διατηρούνταν αποθηκευμένες στη συλλογή (stock) του εργαστηρίου σε φιαλίδια με διάλυμα Tryptone Soy Broth (TSB) με 20% v/v γλυκερόλη, σε συνθήκες κατάψυξης (-20°C), ενώ ανακαλλιεργούνταν ανά έξι μήνες.

3.1.1 Έλεγχος καθαρότητας και καθαρισμός, ανακαλλιέργεια απομονώσεων stock

Σε πρώτο στάδιο έγινε ο καθαρισμός των απομονώσεων stock για την αποφυγή πιθανών επιμολύνσεων και η εκ νέου δημιουργία stock σε φιαλίδια (vials). Η διαδικασία καθαρισμού για κάθε απομόνωση ήταν η ακόλουθη και υλοποιούνταν σε διάρκεια 5 ημερών:

- ✓ **1^η Ημέρα:** Απόψυξη του αρχικού φιαλιδίου και μεταφορά 100μl σε δοκιμαστικό σωλήνα (falcon) με 10ml TSB, όπου επωάζονταν στους 37°C για 24 ώρες (**Ανανέωση**).
- ✓ **2^η Ημέρα:** Με χρήση κρίκου και εμβάπτισή του, μετά την επώαση, στη καλλιέργεια της Ανανέωσης και γραμμική εξάπλωση (streaking), μεταφερόταν σε τρυβλίο με υπόστρωμα Tryptone Soy Agar (TSA) και επωαζόταν στους 37°C για 24 ώρες.
- ✓ **3^η Ημέρα:** Μετά την επώαση με γραμμική εξάπλωση μια αποικία μεταφερόταν σε ένα τρυβλίο με υπόστρωμα TSA και σε ένα τρυβλίο με υπόστρωμα Xylose Lysine Deoxycholate (XLD) Agar.
- ✓ **4^η Ημέρα:** Μια αποικία μεταφερόταν σε falcon με 5ml TSB, όπου επωάζονταν στους 37°C για 24 ώρες.
- ✓ **5^η Ημέρα:** 0,2ml μεταφέρονταν σε φιαλίδιο 1,6ml διαλύματος TSB με 20% γλυκερόλη και διατηρούνταν σε συνθήκες κατάψυξης.

3.1.2 Μικροβιολογικά υλικά

Στο σύνολο των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν στα πλαίσια της συγκεκριμένης διατριβής χρησιμοποιήθηκαν τόσο επιλεκτικά όσο και γενικά θρεπτικά υλικά, τα οποία αποτελούν κατάλληλα μέσα ανάπτυξης του μικροοργανισμού στόχου (*Salmonella* spp.), ενώ

παρασκευάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες των κατασκευαστών. Παρακάτω ακολουθούν ορισμένα χαρακτηριστικά των υλικών λόγω των οποίων επιλέχθηκαν.

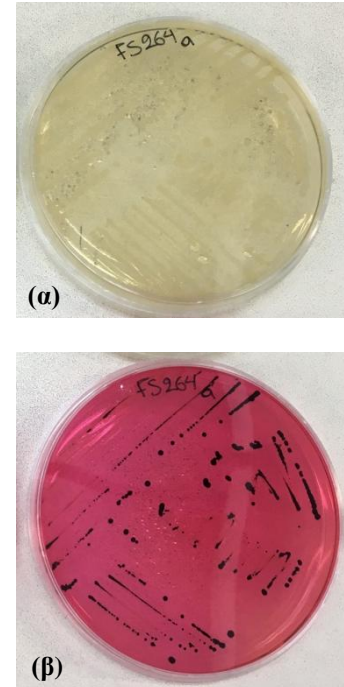
* **Tryptone Soy Broth (TSB):** Το TSB αποτελεί ένα γενικό υγρό θρεπτικό υλικού κατάλληλο για την ανάπτυξη βακτηρίων και μυκήτων. Αποτελεί ένα υλικό ιδιαίτερα κατάλληλο για τη μέθοδο αραιώσεων με στόχο τη δοκιμή ευαισθησίας των μικροοργανισμών σε αντιβιοτικά (Oxoid, 2019b).

* **Tryptone Soy Agar (TSA):** Το TSA αποτελεί ένα γενικό στερεό θρεπτικό υλικό που υποστηρίζει την ανάπτυξη ενός πλήθους μικροοργανισμών, αερόβιων και αναερόβιων, καθώς περιέχει δύο πεπτόνες (Oxoid, 2019a).

* **Xylose Lysine Deoxycholate (XLD) Agar:** Το συγκεκριμένο θρεπτικό υπόστρωμα αρχικά διαμορφώθηκε από τον Taylor ως επιλεκτικό υπόστρωμα για την απομόνωση και ταυτοποίηση των *Shigellae* από δείγματα κοπράνων. Στην πορεία βρέθηκε ότι είναι ένα ικανοποιητικό μέσο για την απομόνωση και ταυτοποίηση και των *Salmonella* spp. Τα βασικά συστατικά που είναι υπεύθυνα για την επιλεκτικότητα του υλικού είναι η ξυλόζη, η λυσίνη και

το δεσοξυχολικό νάτριο. Η ταχεία ζύμωση της ξυλόζης είναι σχεδόν καθολική μεταξύ των εντερικών βακτηρίων εκτός από *Shigella*, *Providencia* και *Edwardsiella*. Συνεπώς, η παρουσία

ξυλόζης στο μέσο διαφοροποιεί τα *Shigella* spp. από τα *Salmonella* spp. λόγω αρνητικής αντίδρασης του πρώτου και θετικής του δεύτερου. Για την διαφοροποίηση των *Salmonella* spp. από τους μη παθογόνους ζυμωτές ξυλόζης ενσωματώνεται στο υλικό η λυσίνη. Οι μικροοργανισμοί *Salmonella* spp. εξάγουν την ξυλόζη και αποκαρβοξυλιώνουν τη λυσίνη, μεταβάλλοντας έτσι το pH σε αλκαλικό (pH=7). Κοντά σε ουδέτερο pH παράγουν υδρόθειο (H₂S) από την αναγωγή του θειοθειικού νατρίου και προκύπτουν μαύρες αποικίες ή αποικίες με μαύρο κέντρο. Αυτό δεν συμβαίνει με τα υπόλοιπα κολοβακτηρίδια που είναι θετικά στη λυσίνη διότι το υψηλό επίπεδο που παράγεται με ζύμωση της λακτόζης και της σακχαρόζης του μέσου, το εμποδίζουν. Το όξινο επίπεδο εμποδίζει επίσης το μαύρισμα του μέσου από αυτούς τους μικροοργανισμούς, ενώ προκαλεί την μεταβολή του κόκκινου χρώματος της φαινόλης σε κίτρινο. Το δεσοξυχολικό νάτριο ενσωματώνεται ως



Εικόνα 15 *Salmonella* spp. σε θρεπτικά υποστρώματα: α)TSA β)XLD.

αναστολέας στο μέσο με συγκέντρωση τέτοια (1g/l) όπου επιτρέπει την αναστολή των κολοβακτηριδίων δίχως να μειώνεται η ικανότητα ανάπτυξης των *Shigella* και *Salmonella* (Oxoid, 2019c).

3.2 Μοριακός χαρακτηρισμός απομονώσεων *Salmonella* spp. σε επίπεδο ορότυπου

Ως πρωταρχικός στόχος τέθηκε η κατηγοριοποίηση των απομονωθέντων μικροοργανισμών με βάση τον ορότυπό τους. Η ορομαδοποίηση ή οροτυποποίηση προηγείται πλέον των μεθόδων διαχωρισμού των απομονώσεων σε επίπεδο στελέχους. Αυτό γίνεται όχι μόνο γιατί ο ορότυπος αποτελεί σημαντική πληροφορία για τη μικροβιολογική επιτήρηση, την ιχνηλασιμότητα στην αλυσίδα παραγωγής τροφίμων και για επιδημιολογικές έρευνες, αλλά και γιατί πρόκειται για ένα πρώτο και βασικό στάδιο διαχωρισμού των απομονώσεων. Οι μέθοδοι που εφαρμόζονται γι' αυτόν τον σκοπό είναι ευαίσθητες, επαναλήψιμες, οικονομικές και μπορούν εύκολα να συνδυαστούν με άλλες μεθόδους τυποποίησης.

3.2.1 Απομονώσεις *Salmonella* spp. που αναλύθηκαν

Αναλύθηκαν όλες οι απομονώσεις που αναφέρθηκαν στο **Κεφάλαιο 3.1**.

3.2.2 Απομόνωση και ποσοτικοποίηση του DNA

Για την εξαγωγή του DNA των απομονώσεων *Salmonella* spp., πραγματοποιήθηκε overnight ανανέωση στους 37°C από την κατάψυξη με τη μεταφορά 20μl της καλλιέργειας, σε φιαλίδια τύπου erpendorf των 2ml με Tryptone Soy Broth (TSB). Ο αναμενόμενος τελικός πληθυσμός των καλλιεργειών κυμαινόταν μεταξύ 10^8 - 10^9 cfu/ml. Ακολούθησε η απομόνωση του DNA σύμφωνα με το πρωτόκολλο του Rossmannith P. και της ομάδας του (Rossmannith *et al.*, 2006), με μικρές τροποποιήσεις:

- ✓ Φυγοκέντρηση των φιαλιδίων erpendorf για 5 min σε 8000xg.
- ✓ Απόρριψη του υπερκειμένου και προσθήκη 1ml 0,01M Tris-HCl, pH 7.0.
- ✓ Επαναιώρηση με χρήση vortex.
- ✓ Εκ νέου φυγοκέντρηση για 5 min σε 8000xg.

- ✓ Απόρριψη του υπερκειμένου και προσθήκη 100μl 0,01M Tris-HCl, pH 7.0 και 400μl Chelex solution¹.
- ✓ Καλή επαναιώρηση με χρήση vortex.
- ✓ Επώαση για 10 min στους 95°C.
- ✓ Φυγοκέντρηση για 30 sec σε 15000xg.
- ✓ Άμεση μεταφορά 100μl από το υπερκείμενο σε φιαλίδιο eppendorf 0,5ml και αποθήκευση στους 4°C για μια μέρα ή στους -20°C για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα.

Ποσότητα και ποιότητα του DNA

Μετά από την απομόνωση του DNA, ακολούθησε ποσοτικός και ποιοτικός προσδιορισμός του γενετικού υλικού που απομονώθηκε, με χρήση του νανοφωτόμετρου IMPLEN NanoPhotometer™ σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Στόχος για επιτυχημένη και επαρκή απομόνωση του γενετικού υλικού ήταν συγκέντρωση μεταξύ 5-800 ng/μl του DNA. Τέλος, το δείγμα θεωρούνταν ικανοποιητικώς καθαρό και κατάλληλο για να χρησιμοποιηθεί στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, όταν ο λόγος A_{260}/A_{280} , που μετράει την απορρόφηση στα 260nm και στα 280nm αντίστοιχα κυμαινόταν μεταξύ των τιμών 1.8 και 2.



Εικόνα 16

Νανοφωτόμετρο IMPLEN NanoPhotometer™ εργαστηρίου.

3.2.3 Ορολογική τυποποίηση των απομονώσεων

Η οροτυποποίηση των απομονώσεων του μικροοργανισμού *Salmonella enterica* εφαρμόστηκε σύμφωνα με ένα πρωτόκολλο πολυπλεκτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (**multiplex PCR**) το οποίο ανέπτυξε η Beaubrun με την ομάδα της (Beaubrun *et al.*, 2012), με κάποιες τροποποιήσεις. Η multiplex PCR αποτελεί μια ευαίσθητη και γρήγορη μέθοδο που βασίζεται στον ταυτόχρονο πολλαπλασιασμό πολλών αλληλουχιών του γονιδιώματος (DNA) χρησιμοποιώντας διαφορετικά ζευγάρια εκκινητών.

Το πρωτόκολλο αφορά σε δυο five-plex, μια two-plex και μια three-plex αντίδραση PCR, ή όπως διαμορφώθηκε από τους (Manios *et al.*, 2015) σε 4 αντιδράσεις PCR με αριθμό

¹ Για την παρασκευή 10ml Chelex solution ζυγίζονται 0,25g Chelex® 100 Resin (BioRad®) τα οποία διαλύονται σε 0,25ml 0,01M Tris-HCl, pH 7 και 9,5ml αποσταγμένο και αποστειρωμένο νερό (ddH₂O). Ακολουθεί καλή ανάδευση. Συνιστάται επίσης καλή ανάδευση πριν από κάθε χρήση.

εκκινητών 3-2-5-2, αντίστοιχα. Οι αλληλουχίες στόχοι ήταν τμήματα των γονιδίων που παρουσιάζονται στον **Πίνακα 10** για κάθε αντίδραση ξεχωριστά.

Πίνακας 10 Το σύνολο των εκκινητών (οι αλληλουχίες των μορίων τους και τα μεγέθη των προϊόντων τους) που χρησιμοποιήθηκαν στην multiplex PCR για τον προσδιορισμό του οροτύπου κάθε βακτηριακής απομόνωσης *Salmonella* spp (Manios *et al.*, 2015).

Αντίδραση PCR	Γονίδιο-Στόχος	Αλληλουχία εκκινητή (5'-3')	Μέγεθος προϊόντος (bp ^a)	Κωδικός αποτελέσματος ^b
1ⁿ Αντίδραση	STM0716	^c For: AACCGCTGCTTAATCCTGATGG ^d Rev: TGGCCCTGAGCCAGCTTTT	187	A
	STM0839	For: TCCAGTATGAAACAGGCAACGTGT Rev: GCGACGCATTGTTTCGATTGAT	137	C
	STM4538	For: TGGTCACCCGCGCTGAT Rev: CGAACGCCAGGTTTCATTTGT	93	E
2ⁿ Αντίδραση	STM1350	For: TCAAAATTACCGGGCGCA Rev: TTTTAAGACTACATACGCGCATGAA	171	B
	STM4525	For: TGGCGGCAGAAGCGATG Rev: CTTCATTCAGCAACTGACGCTGAG	114	D
3ⁿ Αντίδραση	STY0311	For: TGGTATGGTTAAGCGGAGAATGG Rev: GAGAGTCATAGCCCACACCAAAG	301	F
	STY0346	For: GGCTGGAGCAGCCTTACAAAA Rev: AAGAGTTGCCTGGCTGGTAAAA	262	G
	STY2299	For: AATCCCCCCCCCTCAAAAA Rev: GGTACACGTTTACTGTTTGCTGGA	220	H
	STM3845	For: ATATCTCATCGTCTCCTTTTCGTGT Rev: GAAGGTCCGGATAGGCATTCT	181	I
	STY2349	For: AATTACGGAGCAGCAGATCGAGG Rev: TGCGGCCAGCTGTTCAAAA	124	J
4ⁿ Αντίδραση	PT4	For: GGCGATATAAGTACGACCATCATGG Rev: GCACGCGGCACAGTTAAAA	225	K
	STM2150	For: CATAACCCGCCTCGACCTCAT Rev: AGATGTCTGTGAGAAGCGGTGG	101	L

^a Base pairs: Ζεύγη βάσεων

^b Κωδικοί για την διευκόλυνση της ερμηνείας των αποτελεσμάτων

^c Forward

^d Reverse

Ενισχύοντας τα 12 αυτά τμήματα του γονιδιώματος και συνδυάζοντας τα αποτελέσματα των τεσσάρων αντιδράσεων, οι απομονώσεις που προήλθαν από τα προϊόντα κρέατος κατατάχθηκαν σε έναν από τους 30 κύριους ορότυπους κλινικής σημασίας κατά το CDC, όπως παρουσιάστηκε από τους Beaubrun *et al.* (ανάμεσα σε περίπου 2500 που αριθμεί μέχρι σήμερα ο εν λόγω μικροοργανισμός) και παρουσιάζονται στον **Πίνακα 11** (Beaubrun *et al.*, 2012).

Πίνακας 11 Οι 28 πιο κοινοί ορότυποι *Salmonella enterica* με το αντίστοιχο προφίλ που ανιχνεύεται με τους κατάλληλους εκκινητές από τις 4 αντιδράσεις PCR, συνδυάζοντας τους κωδικούς των αποτελεσμάτων (Beaubrun *et al.*, 2012).

Ορότυποι	Προφίλ συνδυασμού ζωνών 4 αντιδράσεων PCR
<i>S. Typhi</i>	AFGHJ
<i>S. Thompson</i>	BCEJ
<i>S. Stanley</i>	ABEG
<i>S. Saintpaul</i>	ABCDEJ
<i>S. Paratyphi</i>	ABDE
<i>S. Javiana</i>	ABHJ
<i>S. Infantis</i>	BG
<i>S. Heidelberg</i>	ABDEG
<i>S. Enteritidis</i>	BCEHK
<i>S. Derby</i>	ABCEJ
<i>S. Weltevreden</i>	ABDEFIJ
<i>S. Westhampton</i>	ABCEGJ
<i>S. Oranienberg</i>	ND"
<i>S. Ohio</i>	BEJK
<i>S. Muenchen</i>	ABJ
<i>S. Montevideo</i>	EGI
<i>S. Mbandaka</i>	BCEGJ
<i>S. Hadar</i>	BCE
<i>S. Dublin</i>	BCEH
<i>S. Chester</i>	ABG
<i>S. Braenderup</i>	BEL
<i>S. Brandenburg</i>	ABG
<i>S. Bovismorbificans</i>	BCEG
<i>S. Berta</i>	BCEGH
<i>S. Anatum</i>	ABCE
<i>S. Agona</i>	BCJ
<i>S. Newport</i>	ABCE
<i>S. Typhimurium</i>	ABCDEI

Πριν την υλοποίηση των 4 αντιδράσεων multiplex PCR ολοκληρώθηκαν οι διαδικασίες της παραγράφου 3.2.3 για την παραλαβή επιτυχημένης συγκέντρωσης DNA από κάθε απομόνωση και στη συνέχεια υπολογίστηκε η κατάλληλη συγκέντρωση των αντιδραστηρίων για την προετοιμασία των μειγμάτων των αντιδράσεων (**mastermix**) σύμφωνα με το πρωτόκολλο (Manios *et al.*, 2015), με κάποιες τροποποιήσεις. Κάθε αντίδραση PCR προετοιμάστηκε με mastermix τελικού όγκου 20μl εκ των οποίων τα 2μl αποτελούσαν το απομονωμένο DNA του δείγματος, ενώ περιείχε επίσης τα συστατικά του **Πίνακα 12**.

Πίνακας 12 Σύσταση του mastermix για κάθε multiplex PCR αντίδραση (Manios *et al.*, 2015)

^a Taq DNA polymerase		2.5 Units (1U)	
dNTPs		200μM	
Buffer (Ρυθμιστικό Διάλυμα) 50 mM Tris-HCl 10 mM KCl 50 mM (NH ₄) ₂ SO ₄		1x	
^b MgCl ₂ , pH 8		2 mM	
Primers (Εκκινητές)	1 ^η Αντίδραση	STM0716	0.6 M
		STM0839	0.6 M
		STM4538	1.2 M
	2 ^η Αντίδραση	STM1350	3 M
		STM4525	1 M
	3 ^η Αντίδραση	STY0311	0.6 M
		STY0346	0.6 M
		STY2299	0.9 M
		STM3845	0.6 M
	4 ^η Αντίδραση	STY2349	0.6 M
		PT4	0.6 M
		STM2150	0.6 M

^a Παραλλαγή από (Manios *et al.*, 2015)

Στις αντιδράσεις χρησιμοποιήθηκαν τρεις θετικοί (positive), και ένας αρνητικός (negative) μάρτυρας:

- Θετικοί μάρτυρες: Enteritidis: PS12 (**BCEHK**)
Typhimurium: PS13 (**ABCDEI**)
Agona: 17.1654 (**BCJ**)
- Αρνητικός μάρτυρας: H₂O

Οι συνθήκες του προγράμματος της δοκιμής της multiplex PCR στον θερμοκυκλοφορητή ProFlex™ PCR System, ήταν οι εξής (Manios *et al.*, 2015):

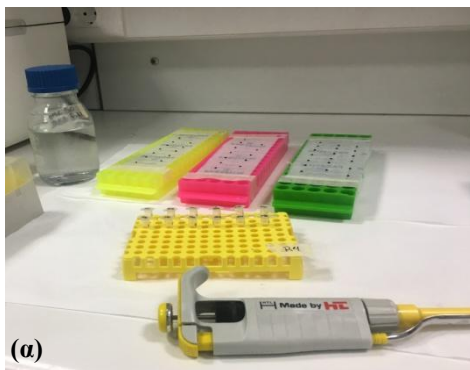
- Αρχική μετουσίωση με προθέρμανση στους 94°C για 5 min και ακολούθησαν τα στάδια της αντίδρασης που επαναλήφθηκαν για 35 κύκλους:
- Αποδιάταξη της έλικας του DNA (**denaturation**) στους 94°C για 30s.
- Υβριδοποίηση και επικόλληση των εκκινητών στο DNA εκμαγείο (**annealing**) στους 62°C για 30s.



Εικόνα 17 Θερμοκυκλοφορητής εργαστηρίου κατά τη διάρκεια υλοποίησης της multiplex PCR.

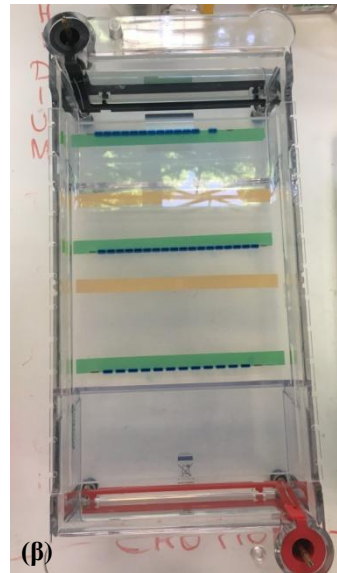
- iv. Ενίσχυση και επιμήκυνση των επιλεγμένων τμημάτων του DNA (**extension**) 72°C για 1min.
- v. Μετά την λήξη των κύκλων ακολούθησε ένα τελικό στάδιο επώασης στους 72°C για 7min.

Η ανάλυση των προϊόντων των αντιδράσεων της PCR πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση πηκτώματος αραρόζης 3%. Κάθε πηγάδι της πηκτής αναλογούσε σ' ένα δείγμα το οποίο αποτελούνταν από 5μl του προϊόντος PCR του αναμεμειγμένο με 2 μl χρωστικής (loading dye buffer). Εκτός από τα δείγματα, χρησιμοποιήθηκε και δυο μάρτυρες μοριακών βαρών 3,5μl DNA Ladder 50bp (BioLabs®) όπου εγχύθηκαν στο πρώτο και τελευταίο πηγάδι. Ύστερα από το τέλος της ηλεκτροφόρησης, ακολούθησε η χρώση της πηκτής σε διάλυμα, 50μl/l EtBr για 20 min. Τέλος, η οπτικοποίηση των προϊόντων της PCR στην πηκτή έγινε σε μηχανήμα εκπομπής υπεριώδους ακτινοβολίας (UV) Molecular Imager® GelDoc™ XR system (Bio-Rad Hercules, California, U.S.A) και μέσω του λογισμικού Image Lab™ (Bio-Rad) ακολούθησε φωτογράφησή της. Τα τμήματα του DNA που είχαν αντιγραφεί, ήταν πλέον ορατά λόγω φθορισμού του βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr).



(α)

Εικόνα 18 (α) Ανάμειξη PCR product με χρωστική και (β) ηλεκτροφόρηση πηκτής αραρόζης.



(β)

3.3 Φαινοτυπικός χαρακτηρισμός απομονώσεων *Salmonella* spp.

3.3.1 Απομονώσεις *Salmonella* spp. που χρησιμοποιήθηκαν

Μετά τον διαχωρισμό των απομονώσεων σε ορότυπους, όπως περιγράφηκε στο κεφάλαιο 3.2, έγινε επιλογή διαφορετικών απομονώσεων. Για τον σκοπό αυτό λήφθηκαν υπόψιν ο ορότυπος, η πηγή προέλευσης (προϊόν κρέατος, επιφάνειες επεξεργασίας τροφίμων, σημεία γραμμών παραγωγής, εξοπλισμός, κ.α.), και η ημερομηνία απομόνωσης για την βαθύτερη

κατανόηση των φαινομένων επικράτησης και κυριαρχίας ορισμένων ορότυπων έναντι άλλων σε διάφορα προϊόντα και περιβάλλοντα επεξεργασίας τροφίμων. Εκείνες που επιλέχθηκαν υποβλήθηκαν σε μια σειρά φαινοτυπικών δοκιμών προκειμένου να καταγραφεί το δυναμικό ανάπτυξης και επιβιώσής τους σε ευνοϊκές και αντίξοες για εκείνους συνθήκες περιβάλλοντος. Συνολικά 35 απομονώσεις *Salmonella enterica* μελετήθηκαν στη δοκιμή ικανότητας ανάπτυξης βιοϋμενίων και 20 απομονώσεις στις υπόλοιπες δοκιμές και παρουσιάζονται στο **Παράρτημα**.

3.3.2 Ενεργοποίηση των κυττάρων και προετοιμασία εμβολίων πριν τις πειραματικές διαδικασίες

Για την ανάκτηση των απομονώσεων *Salmonella* spp. που διατηρούνταν σε stock φιαλίδια υπό κατάψυξη (-20°C), έως την ενεργοποίησή τους στην αρχή κάθε πειράματος, πραγματοποιήθηκε, υπό ασηπτικές συνθήκες, διπλή ανανέωση (**A' και B'**) με μεταφορά 0,1ml της καλλιέργειας σε 10 ml TSB σε δοκιμαστικό σωλήνα (falcon) και επώαση στους 37°C για 24 ώρες (**A' Ανανέωση**) και για 18 ώρες, αντίστοιχα (**B' ανανέωση**). Η ανανέωση των μικροοργανισμών γίνεται προκειμένου οι μικροοργανισμοί να ανακτήσουν τη ζωτικότητα τους και να απαλειφθεί η καταπόνηση που δημιουργείται κατά την παραμονή τους σε συνθήκες κατάψυξης ή ψύξης.

Παράλληλα για τη συντήρηση των καλλιεργειών για μια μικρή χρονική διάρκεια, πραγματοποιήθηκε γραμμική εξάπλωση (streaking) των κυττάρων της B' ανανέωσης σε τρυβλία TSA τα οποία επώαστηκαν στους 37°C για 24 ώρες και εν συνεχεία φυλάσσονταν στους 4°C έως και τρεις εβδομάδες (slant). Με αυτήν την τεχνική είναι δυνατή η λήψη μιας βακτηριακής αποικίας και μεταφοράς της σε 10ml αποστειρωμένου TSB, με σκοπό την ανανέωση της καλλιέργειας (επώαση στους 37°C για 24 ώρες) του μικροοργανισμού-στόχου πριν την πειραματική διαδικασία.

Αφού πραγματοποιηθεί η διπλή ανανέωση της καλλιέργειας (24h & 18h) ακολουθούσε ο καθαρισμός του εμβολίου που έχει σκοπό την απομάκρυνση του θρεπτικού υλικού και όλων των μικροβιακών προϊόντων μεταβολισμού που υφίστανται στο μέσο. Αρχικά, η καλλιέργεια εντός του δοκιμαστικού σωλήνα φυγοκεντρούνταν (3600rpm/10min/4°C) τρεις φορές, με τις δυο πρώτες να περιλαμβάνουν απόρριψη του υπερκειμένου και επαναιώρηση του ιζήματος σε 10ml αλατούχου διαλύματος (¼ strength Ringer's solution). Η τελευταία επαναιώρηση πραγματοποιούνταν σε θρεπτικό υπόστρωμα 10ml TSB έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση των κυττάρων της καλλιέργειας να έφτανε στα 10^8 - 10^9 cfu/ml. Η καθαρότητα των

καλλιιεργειών (εμβολίων), καθώς και ο ακριβής μικροβιακός πληθυσμός προσδιορίστηκαν μέσω επιφανειακής επίστρωσης κατάλληλων δεκαδικών αραιώσεων του αρχικού εμβολίου (10^3 και 10^2) σε τρυβλία TSA και επώστηκαν στους 37°C για 24 ώρες.

3.3.3 Ικανότητα Σχηματισμού Βιοϋμενίων

Σκοπός του συγκεκριμένου πειράματος ήταν η εύρεση της ικανότητας ανάπτυξης βιοϋμενίων των απομονώσεων *Salmonella enterica*. Η ικανότητα ανάπτυξης βιοϋμενίου ποσοτικοποιήθηκε μέσω της χρωμομετρικής μεθόδου με χρήση 96-πηγαδιών αποστειρωμένα τρυβλία μικροτιτλοδότησης (96-well microtiter plates, microplates), η οποία βασίζεται σε μετρήσεις οπτικής πυκνότητας της βιοϋμενικής μάζας που έχει σχηματιστεί στα τοιχώματα των πηγαδιών των microplates. Για το συγκεκριμένο πείραμα τα microtiter plates PVC ενοφθαλμίστηκαν με τους μικροοργανισμούς, ενώ αφού επώστηκαν η επεξεργασία ολοκληρώθηκε σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφουν οι (Doijad *et al.*, 2015) με ορισμένες τροποποιήσεις.

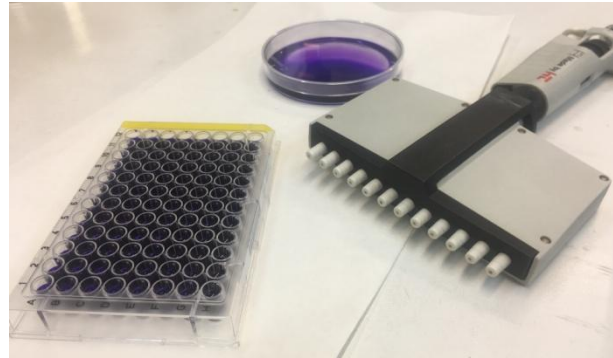
Εμβολιασμός και επώαση microplate

Μετά την ολοκλήρωση των διαδικασιών που παρουσιάζονται στο κεφάλαιο 3.3.2 ακολούθησε ο εμβολιασμός του microplate. Συγκεκριμένα, κάθε πηγαδάκι του microplate πληρώθηκε με ποσότητα 200 μl υγρής μονοκαλλιέργειας με 10^7 CFU/ml κύτταρα *Salmonella enterica*, υπό ασηπτικές συνθήκες. Κάθε στήλη του microplate (8 πηγάδια) εμπεριείχε διαφορετική απομόνωσή με το τελευταίο πηγάδι να αποτελεί αρνητικό μάρτυρα και τα υπόλοιπα 7 να αποτελούν τεχνικές επαναλήψεις της ίδιας απομόνωσης για μεγαλύτερη ακρίβεια του πειράματος. Αρνητικοί μάρτυρες περιλάμβαναν μόνο το θρεπτικό υλικό, χωρίς την παρουσία μικροοργανισμού. Μετά την πλήρωσή τους τα microplates επώστηκαν στους 37° για 24 ώρες.

Καθαρισμός, χρώση κρυσταλλικού ιώδους και μέτρηση οπτικής πυκνότητας (Optical Density)

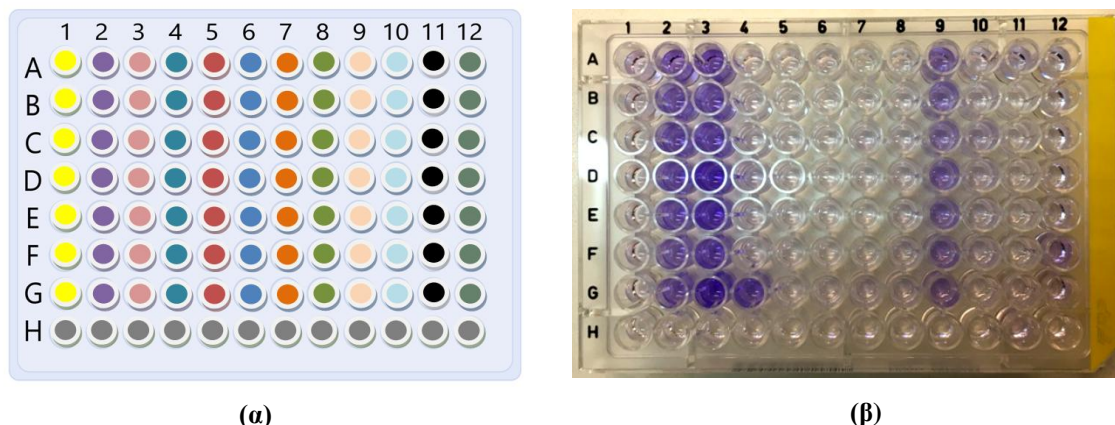
Ύστερα από τις 24 ώρες επώασης το υπερκείμενο υγρό από κάθε πηγαδάκι αφαιρέθηκε και τα κύτταρα που δεν είχαν προσκολληθεί απομακρύνθηκαν με έκπλυση (τρεις φορές) με 200 μl αλατούχου διαλύματος (quarter strength Ringer's solution). Το microplate κατόπιν ξηράνθηκε σε ανεστραμμένη θέση για 30 λεπτά και έπειτα έγινε χρώση των βιοϋμενίων με προσθήκη 200 μl διαλύματος κρυσταλλικού ιώδους 0.1% (Crystal Violet, CV). Στη συνέχεια αφέθηκε για 45 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Η χρωστική αφαιρέθηκε με έκπλυση (τρεις

φορές) με 200μl Ringer ενώ προκειμένου να επαναδιαλυτοποιηθεί το κρυσταλλικό ιώδες που είχε δεσμευτεί στα σχηματισμένα βιοϋμένια, σε κάθε πηγαδάκι προστέθηκαν 210 μl 95% αιθανόλης. Ακολούθησε επώαση στους 4° C για 30 λεπτά. Το περιεχόμενο από το κάθε πηγαδάκι μεταφέρθηκε σε νέο αποστειρωμένο microplate και με ειδικό όργανο μέτρησης οπτικής πυκνότητας καταγράφηκε η οπτική πυκνότητα στα 620nm (OpticalDensity, OD620; Tecan Sunrise™ Absorbance Reader, Tecan Group Ltd, Männedorf, Ελβετία).



Εικόνα 19 Χρώση βιοϋμένων με κρυσταλλικό ιώδες.

Οι χημικές μέθοδοι όπως αναφέρθηκαν στο Κεφάλαιο 1.2.4.1, χρησιμοποιούν βαφές που μπορούν να συνδεθούν ή να προσροφήσουν στα συστατικά των βιοϋμένων. Είναι έμμεσες μέθοδοι και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη μέτρηση συγκεκριμένων συστατικών, όπως αυτά που αποτελούνται από EPS. Η βαφή κρυστάλλου (crystal violet-CV) για τον ποσοτικό προσδιορισμό του βιοϋμένου παραμένει η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη τεχνική ποσοτικού προσδιορισμού σε προσδιορισμούς τρυβλίων μικροτιτλοδότησης. Αυτές οι δοκιμασίες βάφουν τόσο τα ζώντα όσο και τα νεκρά κύτταρα, καθώς και ορισμένα συστατικά που υπάρχουν, ώστε να είναι κατάλληλα για την ποσοτικοποίηση της ολικής μάζας του βιοϋμένου. Τα βήματα πλύσης στοχεύουν στην αφαίρεση των αδέσμευτων κυττάρων και της μη δεσμευμένης βαφής, αλλά ο λάθος χειρισμός μπορεί να οδηγήσει σε αποκόλληση και απομάκρυνση ορισμένων μικροβιακών κυττάρων (Achinas *et al.*, 2019).



Σχήμα 2 Τρυβλίο μικροτιτλοδότησης 96-κελιών (microplate) για την ανάπτυξη βιοϋμενίων: (α) Τα microplates που χρησιμοποιήθηκαν είναι 96-θέσεων και πληρώθηκαν με υγρό θρεπτικό υπόστρωμα TSB (pH 7.2±0.2) και εν συνεχεία εμβολιάστηκαν με τις καλλιέργειες των απομονώσεων. Κάθε χρώμα αποτελεί διαφορετική απομόνωση της *Salmonella enterica* και για τις οποίες εφαρμόστηκαν 7 τεχνικές επαναλήψεις. Η γραμμή H (γκρι χρώμα) παρέμεινε ανεμβολίαστη ως αρνητικός μάρτυρας (negative control). (β) Microplate μετά τη χρώση και τους χειρισμούς.

3.3.4 Προσδιορισμός της επίδρασης του pH στην κινητική συμπεριφορά του μικροοργανισμού

Η παραλλακτικότητα της κινητικής συμπεριφοράς της μικροβιακής ανάπτυξης μεταξύ στελεχών του ίδιου είδους αποτελεί σημαντικό συμβάν στη βιομηχανία τροφίμων (Lianou & Koutsoumanis, 2011). Με στόχο την αξιολόγηση της μεταβλητότητας στην ανάπτυξη μεταξύ των στελεχών *Salmonella enterica*, όπως επηρεάστηκαν από το περιβάλλον, η κινητική συμπεριφορά τους αξιολογήθηκε σε διαφορετικά pH. Συγκεκριμένα, σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα TSB πέντε διαφορετικών pH: 4.8, 5.6, 6.4, 7.2, 8.0). Αυτές οι τιμές pH επιλέχθηκαν σύμφωνα με τη βιβλιογραφία και ύστερα από τη διεξαγωγή προπειραμάτων, με σκοπό το εύρος ανάπτυξης του βακτηρίου να καλύπτεται στο μέγιστο δυνατό βαθμό. Η πειραματική διαδικασία στηρίχθηκε σε αυτή που παρουσίασαν οι Lianou & Koutsoumanis, το 2011 με κάποιες τροποποιήσεις.

Ρύθμιση pH διαλυμάτων

Το θρεπτικό υγρό καλλιέργειας που χρησιμοποιήθηκε σε αυτή τη μελέτη (TSB) έχει pH 7.2 ±0.2. Οι παραπάνω τιμές ρυθμίστηκαν, χρησιμοποιώντας έναν ψηφιακό μετρητή pH, με προσθήκη HCl (3N) για τα όξινα και NaOH (1N) για το βασικό pH. Η διαδικασία ρύθμισης των pH των διαλυμάτων πραγματοποιήθηκε ασηπτικά μετά την αποστείρωση για την αποφυγή οποιασδήποτε μεταβολής του pH κατά την αποστείρωση.

Εμβολιασμός και πειραματική διαδικασία

Μετά την ολοκλήρωση των διαδικασιών που παρουσιάζονται στο κεφάλαιο 3.3.2 ακολούθησε δεκαδική αραιώση του εμβολίου με στόχο κάθε μια από τις απομονώσεις που εξετάστηκε να έχει αρχικό πληθυσμό 10^6 cfu/ml TSB. Στη συνέχεια, 20μl από την καλλιέργεια (10^6 cfu/ml) μεταφέρθηκαν σε 180μl TSB ρυθμισμένου pH, τα οποία είχαν διανεμηθεί σε 100-well microplates και ακολούθησαν δεκαδικές αραιώσεις της καλλιέργειας με τη μεταφορά 20μl από το ένα πηγάδι στο επόμενο. Τα 20μl της τελευταίας αραιώσης απορρίφθηκαν ώστε να περιέχουν όλα τα κελιά την ίδια ποσότητα TSB και καλλιέργειας (180μl). Έτσι, το εύρος των βακτηριακών συγκεντρώσεων που επιτευχθηκε για κάθε απομόνωση στο microplate ήταν περίπου από 10^5 έως 10 cfu/πηγάδι (Lianou & Koutsoumanis, 2011). Επίσης, τοποθετήθηκαν αρνητικοί μάρτυρες TSB με το εκάστοτε ρυθμισμένο pH που παρέμειναν ανεμβολίαστοι (δεν προστέθηκε καλλιέργεια) για τον έλεγχο πιθανής επιμόλυνσης των ρυθμισμένων διαλυμάτων TSB.

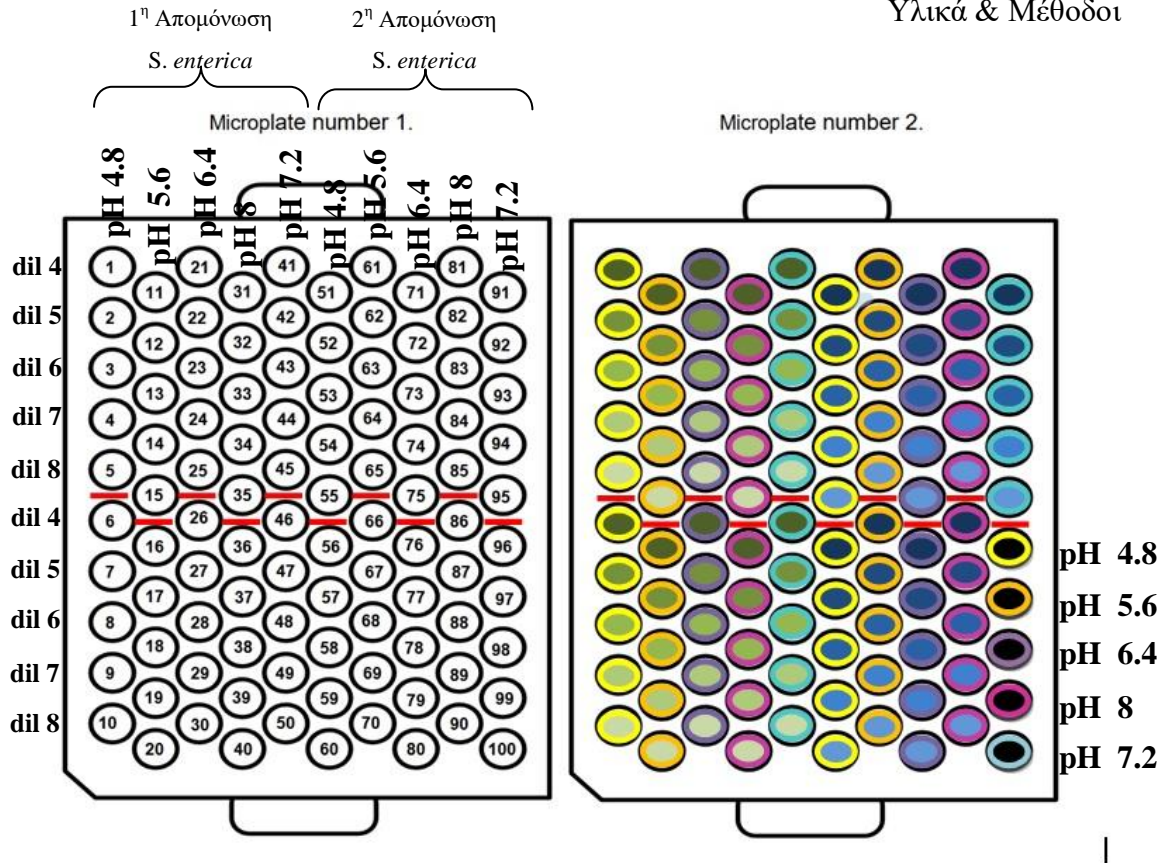
Μέτρηση οπτικής πυκνότητας (Optical Density)

Το microplate τοποθετήθηκε ύστερα σε αυτοματοποιημένο σύστημα καταγραφής οπτικής πυκνότητας που στηρίζεται στην αρχή της κατακόρυφης φωτομετρίας, το Bioscreen C MBR με θερμοκρασία επώασης 37°C και ανάδευση ανά τέταρτο. Η επιλογή της θερμοκρασίας επώασης κυμαίνεται από 1 έως 60°C σε βήματα των $0,^{\circ}\text{C}$, ενώ με την τοποθέτηση του οργάνου σε ψυχόμενο χώρο μπορούν να επιτευχθούν και χαμηλότερες θερμοκρασίες. Δύο microplates με διάταξη κηρήθρας (Honeycomb) των 100 πηγαδιών μπορούν να μετρηθούν ταυτόχρονα. Το



Εικόνα 20 Η συσκευή Bioscreen C MBR (Bioscreen, 2009).

microplate σχεδιάστηκε έτσι ώστε να αποκτά ομοιόμορφα την επιθυμητή θερμοκρασία, καθώς και να εξαλείφει την εξάτμιση και τη συμπύκνωση, ώστε να μην μεταβάλλεται ο όγκος των διαλυμάτων. Η μέτρηση της θολερότητας μέσω του πολλαπλασιασμού των μικροοργανισμών δίνει τη δυνατότητα προσδιορισμού της κινητικής καμπύλης ανάπτυξης των ενοφθαλμισμένων μικροοργανισμών (Bioscreen, 2009).



Σχήμα 3 Τρυβλία μικροτιτλοδότησης 100-κελιών. Κάθε τρυβλίο αναλογούσε σε 2 απομονώσεις *Salmonella enterica* (Τα κελιά που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε απομόνωση διακρίνονται με τις κάθετες κόκκινες ■ γραμμές του αριστερού microplate). Τα πηγάδια πληρώθηκαν με TSB 5 διαφορετικών pH (Τα περιγράμματα των κελιών στο δεξί microplate ορίζουν και το pH που προστέθηκε (■ 4.8, ■ 5.6, ■ 6.4, 7.2 ■, 8 ■). Στη συνέχεια εμβολιάστηκαν με την καλλιέργεια (10^6 CFU/ml) και με δεκαδικές αραιώσεις από το ένα πηγάδι στο επόμενο της στήλης με στόχο το εύρος των βακτηριακών συγκεντρώσεων για κάθε απομόνωση να ήταν περίπου 10^5 - 10 CFU/πηγάδι (Το εύρος των βακτηριακών συγκεντρώσεων της κάθε απομόνωσης παρουσιάζεται με διακυμάνσεις διαφορετικού χρώματος για κάθε απομόνωση στο δεξί microplate. Οι υψηλές συγκεντρώσεις παρουσιάζονται με την πιο σκούρα διακύμανση του χρώματος). Διεξήχθησαν 2 τεχνικές επαναλήψεις για τις συγκεντρώσεις της κάθε απομόνωσης (διαχωρίζονται με οριζόντιες κόκκινες ■ γραμμές). Οι αρνητικοί μάρτυρες κάθε pH που παρέμειναν ανεμβολίαστοι παρουσιάζονται με μαύρο γέμισμα.

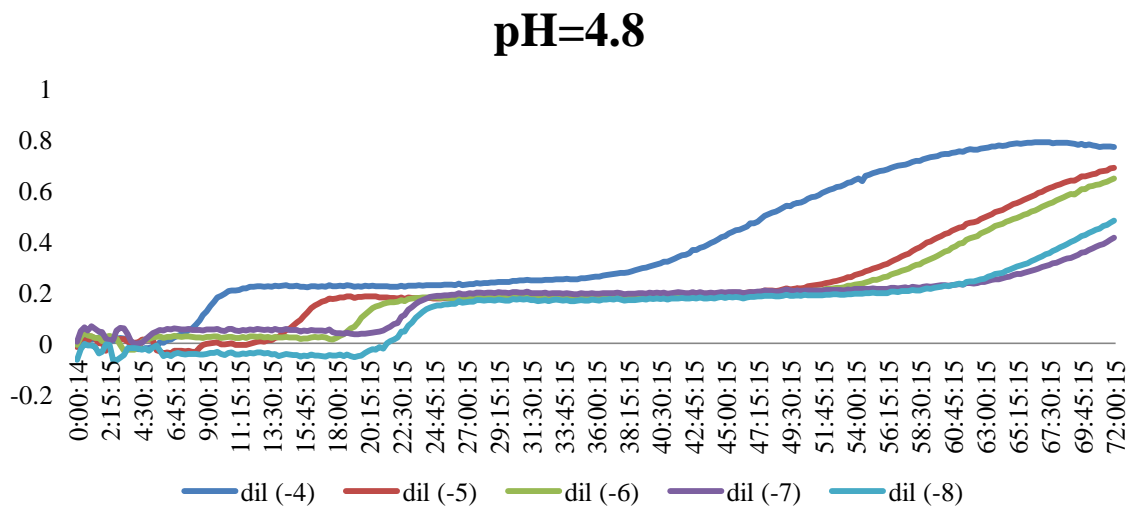
Οι μετρήσεις της οπτικής πυκνότητας (OD) πραγματοποιούνταν στα 620nm για χρονικό διάστημα τέτοιο ώστε να παρατηρηθεί μια αλλαγή στη θολερότητα, κατά το δυνατόν, και για τις πέντε δεκαδικές αραιώσεις της καλλιέργειας. Η λήψη της μέτρησης OD πραγματοποιούνταν ανά 15min με ανάδευση του microplate για 10 δευτερόλεπτα πριν από κάθε καταγραφή. Διεξήχθησαν 2 ανεξάρτητες βιολογικές και δυο τεχνικές επαναλήψεις για την κάθε πληθυσμιακή συγκέντρωση της κάθε απομόνωσης.

Ποσοτικοποίηση της επίδρασης του pH στις κινητικές παραμέτρους της ανάπτυξης του μικροοργανισμού *Salmonella* spp.

Ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης (μ_{\max}) για κάθε απομόνωση εκτιμήθηκε από τους χρόνους ανίχνευσης (detection times, DTs) της απορρόφησης των πέντε διαδοχικών δεκαδικών αραιώσεων της καλλιέργειας, όπως περιγράφηκε από τους Dalgaard και Koutsoumanis (2001), χρησιμοποιώντας την προσέγγιση της δεκαδικής αραιώσεως, η οποία έχει αποδειχθεί ότι δίνει ακριβείς εκτιμήσεις για τις τιμές του μ_{\max} (Dalgaard & Koutsoumanis, 2001). Οι DTs των πέντε διαδοχικών δεκαδικών αραιώσεων εκφράστηκαν ως συνάρτηση του φυσικού λογαρίθμου των αντίστοιχων αρχικών συγκεντρώσεων (\log cfu/κελί), και οι μ_{\max} τιμές προσδιορίστηκαν μέσω της γραμμικής παλινδρόμησης σύμφωνα με την ακόλουθη εξίσωση (Lianou & Koutsoumanis, 2011):

$$\log(N_i) = k - \mu_{\max} \cdot DT_i$$

με το χρόνο ανίχνευσης να ορίζεται ως ο χρόνος που απαιτείται για να παρατηρηθεί συγκεκριμένη αύξηση της οπτικής πυκνότητας.



Γράφημα 2 Καμπύλες ανάπτυξης διαφορετικών συγκεντρώσεων καλλιέργειας *Salmonella* spp. σε pH=4.8, μετά την αφαίρεση των αρνητικών μαρτύρων.

Η επίδραση του pH στο μ_{\max} περιγράφηκε από το δευτερογενές μοντέλο του που περιγράφηκε στην Παράγραφο 1.2.2 ως ο συνδυασμός επίδρασης 3 περιβαλλοντικών συνθηκών. Ωστόσο στην παρούσα μελέτη μόνο ο παράγοντας pH μελετήθηκε οπότε χρησιμοποιήθηκαν οι εξισώσεις:

$$\mu_{\max} = \mu_{\text{opt}} \cdot \rho(\text{pH})$$

$$\rho(\text{pH}) = \frac{(pH - pH_{\min})^2 (pH - pH_{\max})}{(pH_{\text{opt}} - pH_{\min}) \left[(pH_{\text{opt}} - pH_{\min})(pH - pH_{\text{opt}}) - (pH_{\text{opt}} - pH_{\max})(pH_{\text{opt}} + pH_{\min} - 2pH) \right]}$$

όπου μ_{opt} είναι ο ρυθμός ανάπτυξης υπό άριστες συνθήκες, $\rho(\text{pH})$ είναι ο παράγοντας Rosso για το pH, pH_{\min} , pH_{\max} , pH_{opt} είναι το ελάχιστο, μέγιστο και άριστο pH ανάπτυξης, αντίστοιχα.

3.3.5 Επίδραση απολυμαντικών στην ανάπτυξη των απομονώσεων *Salmonella enterica*

Σκοπός του συγκεκριμένου πειράματος ήταν η εύρεση της ελάχιστης συγκέντρωσης απολυμαντικού στην οποία ο μικροοργανισμός δεν αναπτύσσεται. Για τον σκοπό αυτό οι απομονώσεις *Salmonella enterica* εκτέθηκαν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις απολυμαντικών ουσιών όξινου και αλκαλικού pH, ευρέως διαδεδομένων στη βιομηχανία τροφίμων, δηλ. υπεροξικού οξέος² (peracetic acid, PAA) και χλωριούχου βενζαλκόνιου³ (benzalkonium chloride, BC), σύμφωνα με (Fazlara & Ekhtelat, 2012) με κάποιες τροποποιήσεις. Οι συγκεντρώσεις αυτές επιλέχθηκαν βάσει των αποτελεσμάτων προπειράματος (screening) όπου ακολουθούσαν ένα μεγαλύτερο βήμα μεταξύ των συγκεντρώσεων. Από ένα αρχικό πυκνό διάλυμα και μέσω διαδοχικών αραιώσεων προέκυψαν διαλύματα μικρότερης πυκνότητας. Συγκεκριμένα, για το PAA: 144, 130, 115, 100, 86, 72, 58, 43, 29, 14 ppm και για το BC: 58, 52, 46, 40, 35, 29, 23, 17, 11, 6 ppm.

Εμβολιασμός και επώαση microplate

Μετά την ολοκλήρωση των διαδικασιών που παρουσιάζονται στο κεφάλαιο 3.3.2 ακολούθησε ο εμβολιασμός. Αποστειρωμένα 96-πηγαδιών τρυβλία μικροτιτλοδότησης (96-well microtiter plates, microplates) πληρώθηκαν με τα παραπάνω διαλύματα. Με τη χρήση πολυπιπέττας προστέθηκαν 240 μl σε κάθε πηγάδι microplate ενώ σε κάθε διάλυμα αντιστοιχούσε μια στήλη του microplate, δηλαδή 8 πηγάδια. Στις δυο τελευταίες στήλες του microplate (16 πηγάδια) τοποθετήθηκαν 240 μl TSB εκ των οποίων η μια στήλη ενοφθαλμίστηκε με τις καλλιέργειες και χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί μάρτυρες ενώ τα υπόλοιπα 8 πηγάδια (τελευταία στήλη) αποτελούσαν τους αρνητικούς μάρτυρες ώστε να επιβεβαιωθεί ότι το υλικό δεν είχε επιμολυνθεί. Για τον ενοφθαλμισμό των διαφορετικών συγκεντρώσεων στα microplates προστέθηκαν 10 μl από την καλλιέργεια 10^6 cfu/ml και έτσι

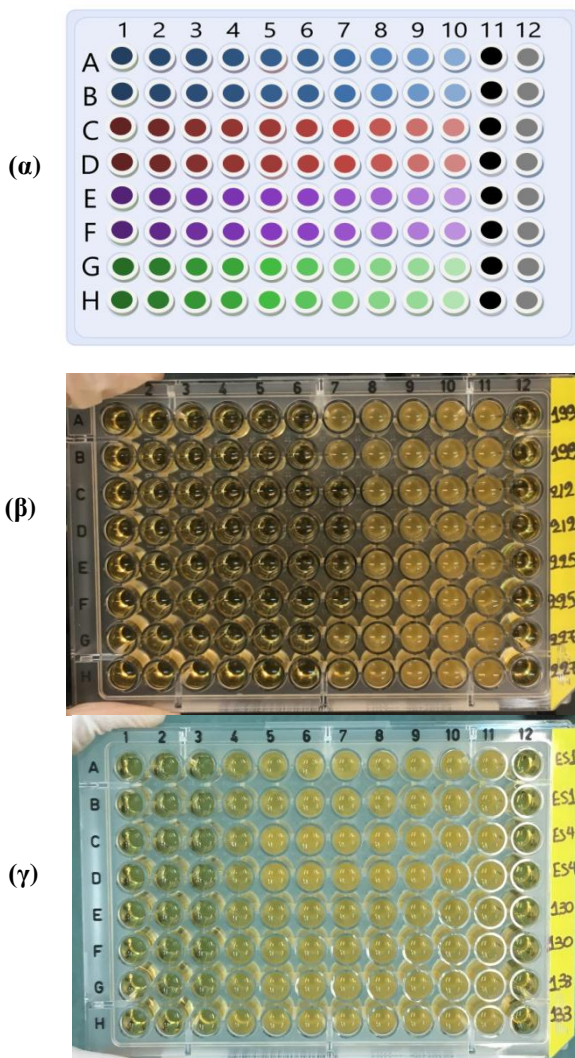
² Παρασκευάστηκε σύμφωνα με την εταιρεία υπό μορφή διαλύματος Applichem 15% pure PAA.

³ Παρασκευάστηκε σύμφωνα με την εταιρεία υπό μορφή πυκνού ζελέ.

προέκυψαν περίπου $4 \cdot 10^4$ cfu/ml. Μετά την πλήρωση τους τα microplates επώστηκαν στους 37°C για 24 ώρες.

Μέτρηση οπτικής πυκνότητας (Optical Density)

Ύστερα από τις 24 ώρες επώσης καταμετρήθηκε η οπτική πυκνότητα στα 620 nm με ειδικό όργανο μέτρησης οπτικής πυκνότητας (Optical Density, OD620; Tecan Sunrise™ Absorbance Reader, Tecan Group Ltd, Männedorf, Ελβετία). Η ελάχιστη συγκέντρωση στην οποία δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη (αύξηση οπτικής πυκνότητας) αποτελεί το MIC του συγκεκριμένου στελέχους στο εκάστοτε απολυμαντικό και εκφράζεται σε ppm (mg/l).



Σχήμα 4 Τρυβλίο μικροτιλοδότησης 96-κελιών για εύρεση της ελάχιστης συγκέντρωσης απολυμαντικού στην οποία ο μικροοργανισμός *Salmonella enterica* δεν αναπτύσσεται:

(α) Τα microplates που χρησιμοποιήθηκαν είναι 96-θέσεων (κελιών) και πληρώθηκαν με διάφορες συγκεντρώσεις απολυμαντικού αραιωμένο σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα TSB (pH 7.2 ± 0.2) και εν συνεχεία εμβολιάστηκαν με τις καλλιέργειες των απομονώσεων. Οι στήλες 11 και 12 πληρώθηκαν με TSB χωρίς απολυμαντικό. Η 11 αποτελούσε το θετικό μάρτυρα (positive control) καθώς εμβολιάστηκε με τον μικροοργανισμό ενώ η 12 αποτελούσε τον αρνητικό (negative control) καθώς παρέμεινε ανεμβολίαστη.

(β) με απολυμαντικό BC μετά την επώση.

(γ) με απολυμαντικό PAA μετά την επώση.

3.3.6 Στατιστική ανάλυση

Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων επιτεύχθηκε μέσω του στατιστικού πακέτου Statgraphics 18[®]. Συγκεκριμένα, για το πείραμα που αφορούσε την επίδραση του pH στην

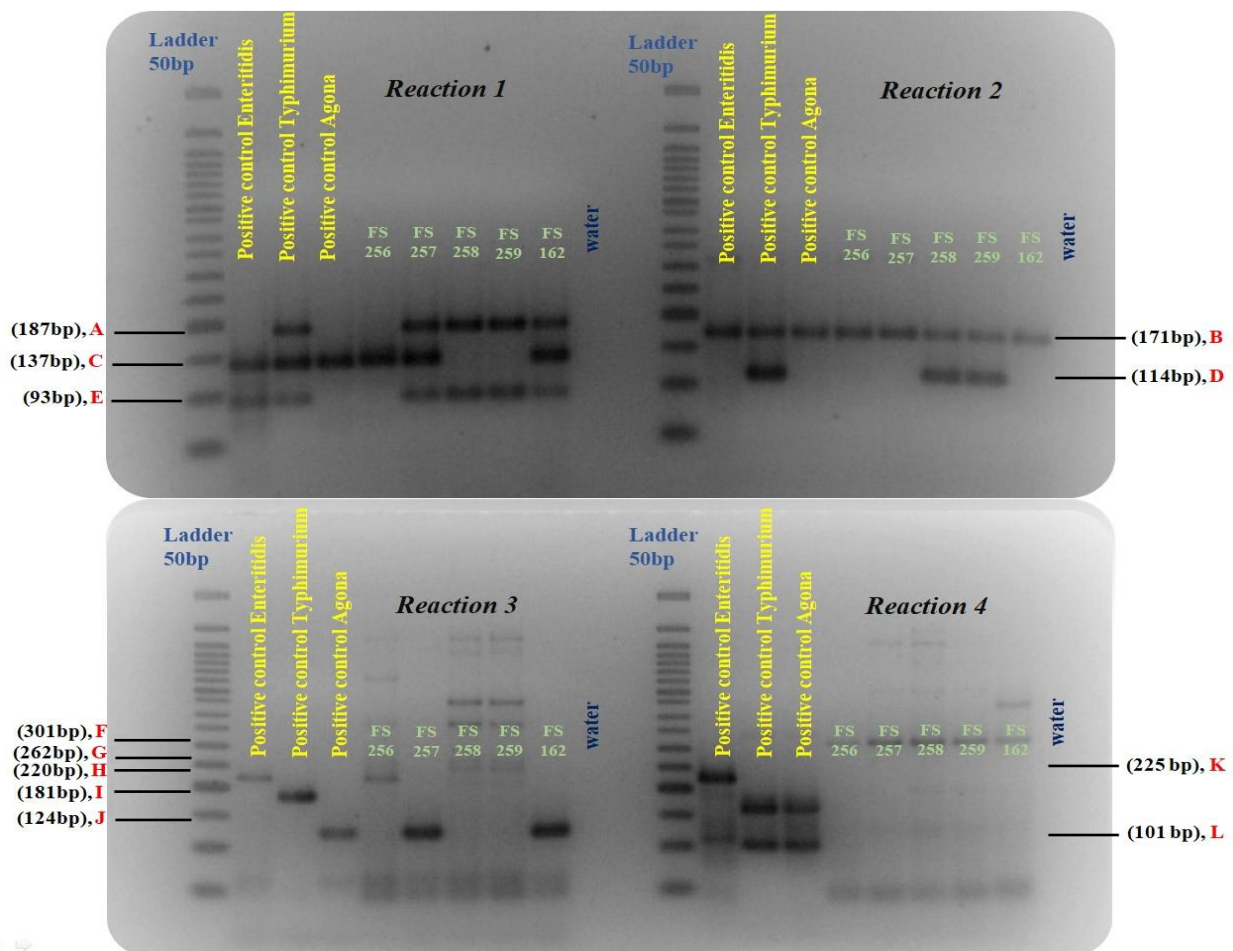
κινητική της ανάπτυξης του μικροοργανισμού, το μοντέλο του Rosso ενσωματώθηκε στο πρόγραμμα με την εφαρμογή μη γραμμικής παλινδρόμησης. Η διερεύνηση των στατιστικά σημαντικών διαφορών μεταξύ των δεδομένων ολοκληρώθηκε με χρήση της One-Way ANOVA ανάλυσης και ακολουθήθηκε από το κριτήριο Tukey's HSD (Honestly Significant Difference). Διαφορές για τις οποίες η τιμή p-value βρέθηκε μικρότερη του 0.05 (5%), κρίθηκαν σημαντικές. Μέσω του στατιστικού πακέτου δημιουργήθηκαν επίσης θηκογράμματα (Multiple-Box-and-Whisker-Plots) που απεικονίζουν τις κατανομές μεταξύ των απομονώσεων για τις παραμέτρους που εξετάστηκαν. Αυτά τα γραφήματα συνοψίζουν τα δείγματα δεδομένων μέσω 5 στατιστικών στοιχείων: ελάχιστο, κατώτερο τεταρτημόριο, διάμεσος, ανώτερο τεταρτημόριο, μέγιστο. Μπορούν επίσης να υποδηλώνουν την ύπαρξη υπερβολικών τιμών.

4. Αποτελέσματα και Συζήτηση

4.1 Οροτυποποίηση του μικροοργανισμού *Salmonella* spp.

Η οροτυποποίηση των 142 απομονώσεων *Salmonella enterica* που βρέθηκαν σε μια Ελληνική βιομηχανία προϊόντων κρέατος την τελευταία πενταετία (**Κεφάλαιο 3.1**), πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις διαδικασίες που περιγράφηκαν στο **Κεφάλαιο 3.2**. Ενδεικτική απεικόνιση αποτελεσμάτων της μεθόδου των Beaubrun *et al.*, παρουσιάζεται στην **Εικόνα 21** μετά την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της multiplex-PCR (Baubrun *et al.*, 2012).

Στον **Πίνακα 13** παρουσιάζονται τα γονίδια-στόχος και η κωδικοποίηση τους, ενώ στον **Πίνακα 14** ολοκληρώνεται η οροτυποποίηση των 8 στελεχών της **Εικόνας 21**. Κατά τον ίδιο τρόπο υλοποιήθηκε η διαδικασία για όλες τις απομονώσεις και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο **Παράρτημα**.



Εικόνα 21 Ηλεκτροφόρηση πηκτώματος αгарόζης 3% των προϊόντων της multiplex-PCR 8 απομονώσεων *Salmonella enterica*, εκ των οποίων οι τρεις αποτελούσαν θετικούς μάρτυρες. Τα τμήματα του γονιδιώματος που ανιχνεύονται σε κάθε αντίδραση δημιουργούν ένα προφίλ ζωνών. Ο συνδυασμός των τεσσάρων προφίλ ζωνών από τις αντιδράσεις οδηγεί τον διαχωρισμό σε επίπεδο ορότυπου.

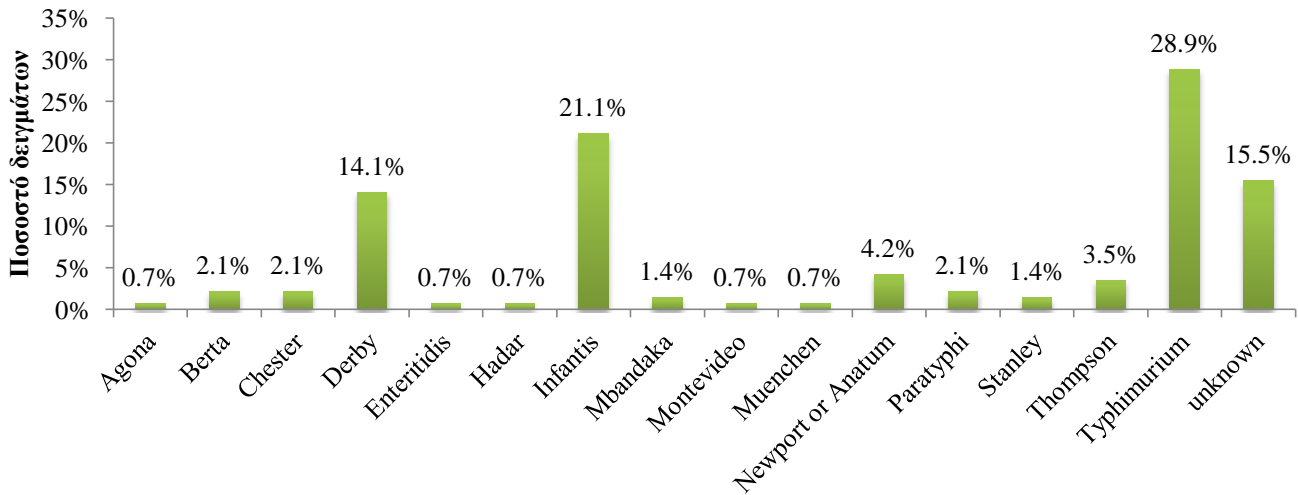
Πίνακας 13 Τα γονίδια που ανιχνεύονται από τις 4 αντιδράσεις και η «κωδική» ονομασία τους.

Μέγεθος προϊόντος (bp)	Γονίδιο-Στόχος	Κωδικός αποτελέσματος
187	STM0716	A
137	STM0839	C
93	STM4538	E
171	STM1350	B
114	STM4525	D
301	STY0311	F
262	STY0346	G
220	STY2299	H
181	STM3845	I
124	STY2349	J
225	PT4	K
101	STM2150	L

Πίνακας 14 Παράδειγμα οροτυποποίησης απομονώσεων έπειτα από συνδυασμό των ζωνών.

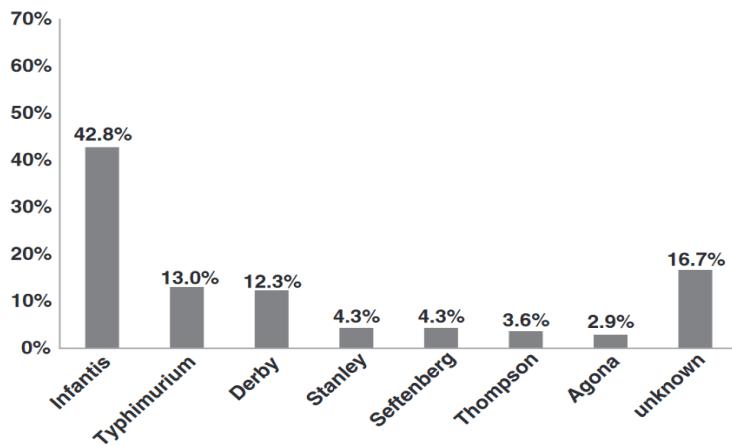
Κωδικοποίηση απομόνωσης	Συνδυασμός ζωνών	Οροτυποποίηση
FS_162	ABCDEI	Derby
FS_256	BCH	«άγνωστου ορότυπου»
FS_257	ABCEJ	Derby
FS_258	ABDE	Paratyphi
FS_259	ABDE	Paratyphi
FS_positive 1, PS2	BCEHK	Enteritidis
FS_positive 2, PS13	ABCDEI	Typhimurium
FS_positive 3, 17.1654	BCJ	Agona

Στο **Γράφημα 2** παρουσιάζεται η κατηγοριοποίηση του συνόλου των 142 απομονώσεων που εξετάστηκαν, με το μεγαλύτερο ποσοστό κατάταξης να το κατέχουν οι ορότυποι *S. Typhimurium* (28.9%) και *S. Infantis* (21.1%) που αποτελούν 41 και 30 απομονώσεις αντίστοιχα, εκ του συνόλου. Ακολουθεί ο ορότυπος *S. Derby* (14.1%), ενώ εμφανίζεται με μικρό ποσοστό ένα μεγάλος αριθμός άλλων ορότυπων από τους 30 πιο κοινούς που αναφέρθηκαν νωρίτερα (Beaubrun *et al.*, 2012; S. Kim *et al.*, 2006). Ένα σημαντικό ποσοστό απομονώσεων (15.5%) δεν κατατάχθηκε σε κανέναν από αυτούς.



Γράφημα 3 Ποσοστιαία κατηγοριοποίηση των ορότυπων των 142 απομονώσεων *Salmonella* spp. (Beaubrun *et al.*, 2012).

Πράγματι, σύμφωνα και με τη διεθνή βιβλιογραφία ο ορότυπος *S. Typhimurium* αποτελεί έναν από τους πιο κοινά εμφανιζόμενους ορότυπους παγκοσμίως. Όπως και ο *S. Enteritidis*



Γράφημα 4 Ορότυποι *Salmonella* spp. που ταυτοποιήθηκαν σε παρόμοια μελέτη (Manios *et al.*, 2015).

που δηλώνει την επικράτηση των ίδιων ορότυπων στη βιομηχανία. Ωστόσο, ο *S. Stefenberg* που καταλάμβανε ένα ποσοστό 4.3%, στα δείγματα των επόμενων ετών δεν εμφανίστηκε ενώ νέοι ορότυποι παρουσιάστηκαν στη βιομηχανία.

Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δοθεί στην παρακολούθηση της επικράτησης ενός παθογόνου παράγοντα από διαφορετικές μελέτες, καθώς διάφοροι παράγοντες μπορεί να είναι υπεύθυνοι για τις παρατηρούμενες παραλλαγές, όπως η γεωγραφική προέλευση, το τρόφιμο, η περίοδος δειγματοληψίας, οι συνθήκες υγιεινής και οι αναλυτικές μέθοδοι (Yang *et al.*, 2010).

Όσον αφορά την εποχή απομόνωσης, τα αποτελέσματα ήταν σύμφωνα με την προηγούμενη μελέτη που αφορούσε προηγούμενα χρόνια παραγωγής στη συγκεκριμένη βιομηχανία κρέατος (Manios *et al.*, 2015). Κατά τη μελέτη εκείνη τους πιο ζεστούς μήνες του έτους, απομονώθηκε μεγαλύτερος αριθμός μικροοργανισμών, πράγμα που είναι λογικό λόγω των υψηλών θερμοκρασιών που επικρατούν στη χώρα μας, ειδικά αν η ψυκτική αλυσίδα δεν ακολουθείται σωστά. Στην παρούσα μελέτη, με μια πρώτη ματιά στα θετικά επιβεβαιωμένα δείγματα ως *Salmonella* spp. ανά εποχή φαίνεται να έχουν απομονωθεί σε μεγαλύτερο βαθμό κατά τη χειμερινή περίοδο. Αυτό όμως οφείλεται στο γεγονός ότι κατά εκείνη την περίοδο λήφθηκαν τα περισσότερα δείγματα (28.1%). Από τα 142 δείγματα, για τα 137 ήταν γνωστή η περίοδος απομόνωσης τους. Ανάγοντας αυτά τα δεδομένα σε πληθυσμό 100 δειγμάτων, οι απομονώσεις είναι περισσότερες κατά το καλοκαίρι (29.7%), ενώ ακολουθούν τα δείγματα του χειμώνα, της άνοιξης και του φθινοπώρου με φθίνουσα σειρά αριθμού απομονώσεων *Salmonella* spp. (Πίνακας 15). Η εμφάνιση της χειμερινής περιόδου (25.6%) ως δεύτερη στην κατάταξη, που θα περιμέναμε να βρίσκεται τελευταία μπορεί να οφείλεται σε λανθασμένους χειρισμούς κατά την παραγωγή που δεν σχετίζονται μονάχα με τις συνθήκες θερμοκρασίας.

Πίνακας 15 Η εμφάνιση της *Salmonella* spp. στα δείγματα ανάλογα με την εποχή που λήφθηκαν.

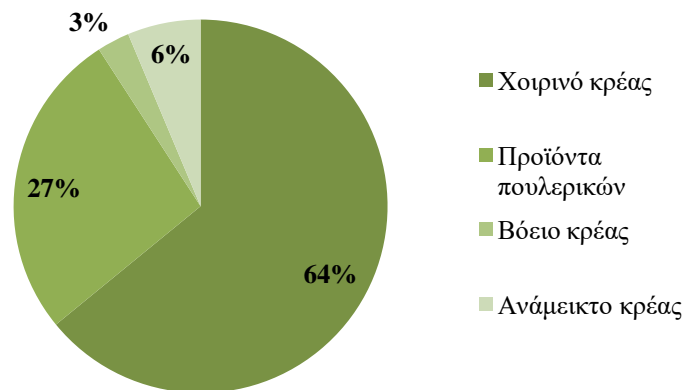
Εποχή	Δείγματα ανά εποχή	%του συνόλου	Θετικά δείγματα ανά εποχή	%Θετικά δείγματα ανά εποχή	%του συνόλου θετικών δειγμάτων ανά εποχή
Χειμώνας	605	28.11	40	6.61	25.61
Άνοιξη	543	25.23	34	6.26	24.25
Καλοκαίρι	418	19.42	32	7.66	29.65
Φθινόπωρο	586	27.23	31	5.29	20.49
Σύνολο	2152	100	137	25.82	100.00

Οι απομονώσεις προέκυψαν από διάφορα είδη κρέατος που παρήχθησαν όπως και από περιβαλλοντικά δείγματα που λήφθηκαν κατά το στάδιο της παραγωγής τους στη βιομηχανία εντός των πέντε τελευταίων ετών. Φαίνεται σύμφωνα με έρευνες πως συγκεκριμένοι ορότυποι κυριαρχούν σε διαφορετικά είδη κρέατος.

Οι δραστηριότητες παρακολούθησης και τα προγράμματα ελέγχου για τον μικροοργανισμό *Salmonella* spp. σε νωπά κρέατα όπου μελετήθηκαν από την EFSA κατά το έτος 2017 έδειξαν την παρουσία του μικροοργανισμού να υπερισχύει στα κρέατα πουλερικών σε σχέση με αυτά των χοιρινών (EFSA & ECDC, 2018).

Συγκεκριμένα στην παρούσα μελέτη, τέσσερα ήταν τα είδη κρέατος που αναλύθηκαν (χοιρινό, πουλερικά, βόειο, ανάμεικτο), με τη μεγαλύτερη παρουσία της *Salmonella* spp. στο χοιρινό κρέας καθώς το 64% των απομονώσεων της προήλθαν από εκεί, με τα προϊόντα των πουλερικών να ακολουθούν σε ένα αρκετά μεγάλο ποσοστό ύψους 27% (Γράφημα 5). Μικρή ήταν η παρουσία της στο βόειο και το ανάμεικτο κρέας.

Ιδιαίτερα το χοιρινό κρέας αποτελεί σημαντικό τρόφιμο της διατροφής των Ελλήνων. Σύμφωνα με μια έρευνα που υλοποιήθηκε κατά το έτος 2007 το μεγαλύτερο μέρος (75%) και το ήμισυ (50%) του πληθυσμού δήλωσαν να καταναλώνουν εβδομαδιαία (χοιρινό) και μηνιαία (προϊόντα χοιρινού κρέατος), αντίστοιχα. Για τα πουλερικά ολόκληρος ο πληθυσμός (100%) καταναλώνει μηνιαίως κρέας πουλερικών και μερικές φορές ετησίως προϊόντα κρέατος πουλερικών (Mataragas *et al.*, 2008). Η μεγάλη κατανάλωση αυτών των τροφίμων σε συνδυασμό με λάθος χειρισμούς των βιομηχανιών και των καταναλωτών διογκώνει της πιθανότητες μετάδοσης του παθογόνου και του ρίσκου προς την ασφάλεια των καταναλωτών.



Γράφημα 5 Πηγές προέλευσης απομονώσεων *Salmonella* spp.

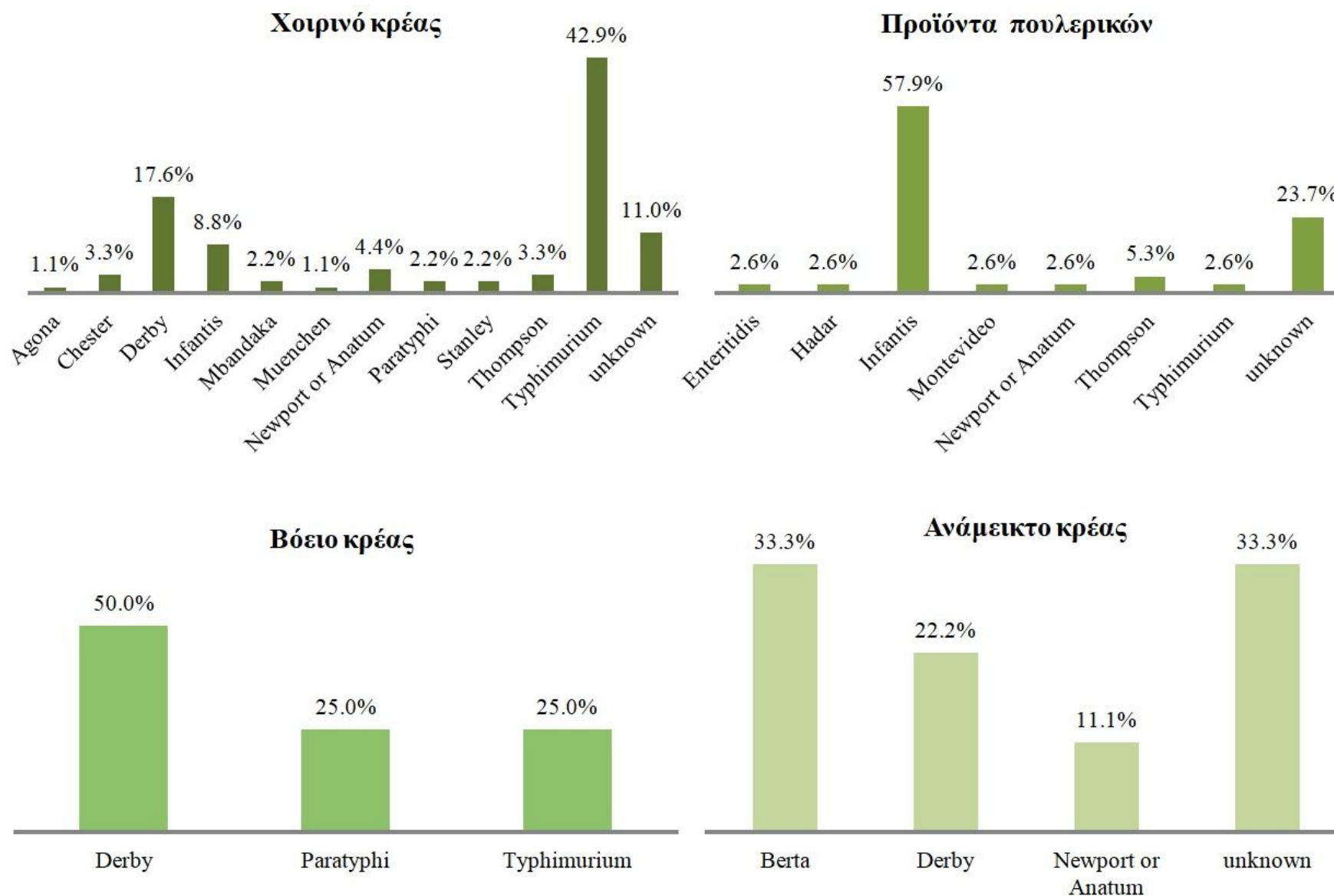
Πιο συγκεκριμένα, στο χοιρινό κρέας, 39 (42.9%) από τις 91 απομονώσεις άνηκαν στον ορότυπο *S. Typhimurium* όπου ήταν και ο επικρατέστερος, ενώ 16 (17.6%) απομονώσεις οροτυποποιήθηκαν ως *S. Derby*. Όσον αφορά τα κρέατα πουλερικών πάνω από τις μισές απομονώσεις οροτυποποιήθηκαν ως *S. Infantis* (57.9%). Αξιοσημείωτο δε, για τα δυο αυτά είδη αποτελεί η μεγάλη εμφάνιση διαφόρων ορότυπων στη συγκεκριμένη βιομηχανία, ενώ πολλές απομονώσεις παραμένουν «αγνώστου ορότυπου» (δεν συγκαταλέγονταν στους 20 ορότυπους που ανιχνεύει η συγκεκριμένη μέθοδος). Στο βόειο και ανάμεικτο κρέας αν και η εμφάνιση του βακτηρίου ήταν μικρή ο ορότυπος *S. Derby* εμφανίστηκε και στα δυο είδη με

50% και 22.2% αντίστοιχα, ενώ στο ανάμεικτο κρέας σημαντική ήταν η εμφάνιση του *S. Berta* (πιθανότητα να πρόκειται για την ίδιο στελέχος καθώς απομονώθηκαν κατά την ίδια ημέρα και από ίδιο προϊόν).

Πίνακας 16 Κατανομή των ορότυπων *Salmonella* spp. σε κρέατα λιανικής.

Ορότυπος	Χοιρινό κρέας	Προϊόντα πουλερικών	Βόειο κρέας	Ανάμεικτο κρέας
<i>S. Agona</i>	1	0	0	0
<i>S. Berta</i>	0	0	0	3
<i>S. Chester</i>	3	0	0	0
<i>S. Derby</i>	16	0	2	2
<i>S. Enteritidis</i>	0	1	0	0
<i>S. Hadar</i>	0	1	0	0
<i>S. Infantis</i>	8	22	0	0
<i>S. Mbandaka</i>	2	0	0	0
<i>S. Montevideo</i>	0	1	0	0
<i>S. Muenchen</i>	1	0	0	0
<i>S. Newport or S. Anatum</i>	4	1	0	1
<i>S. Paratyphi</i>	2	0	1	0
<i>S. Stanley</i>	2	0	0	0
<i>S. Thompson</i>	3	2	0	0
<i>S. Typhimurium</i>	39	1	1	0
«άγνωστου ορότυπου»	10	9	0	3
Σύνολο	91	38	4	9

Συνολικά 35 απομονώσεις *Salmonella enterica* μελετήθηκαν στη δοκιμή ικανότητας ανάπτυξης βιοϋμενίων και 20 απομονώσεις από τις 35 στις υπόλοιπες δοκιμές και παρουσιάζονται στο **Παράρτημα**. Από τις 20 απομονώσεις, 5 είχαν καταταχθεί σε 5 διαφορετικούς ορότυπους (*Agona*, *Paratyphi*, *Stanley*, *Newport or Anatum*, *unknown*) πράγμα που τα καθιστά αυτόματα διαφορετικά στελέχη. Επίσης, 4 *Typhimurium*, 2 *Chester*, 4 *Infantis*, 2 *Thompson*, 3 *Derby* επιλέχθηκαν με τα κριτήρια που αναφέρθηκαν στο **Κεφάλαιο 3.3.1** έτσι ώστε και εκείνα να αποτελούν διαφορετικά στελέχη.



Γράφημα 5 Ποσοστιαία κατανομή ορότυπων ανάλογα με το προϊόν προέλευσης.

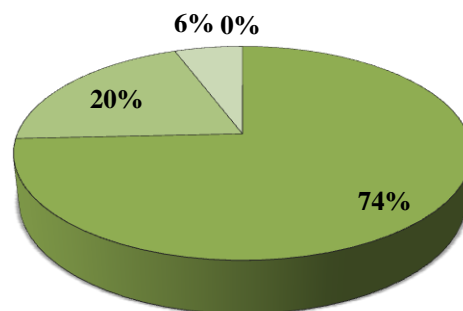
4.2 Προσδιορισμός ικανότητας σχηματισμού βιοϋμενίων

Στη συγκεκριμένη δοκιμή 35 απομονώσεις από τις 142 που οροτυποποιήθηκαν και αφορούσε την ικανότητα τους να σχηματίζουν βιοϋμένια σε τρυβλία μικροτιλοδότησης PVC σε 24h στους 37°C. Ακολούθησε η διαδικασία που παρουσιάστηκε στην **Παράγραφο 3.3.3** και τελικά ποσοτικοποιήθηκε η ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίων με την μέτρηση της οπτικής πυκνότητας στα 620nm κάθε πηγαδιού στο microplate. Αναλυτικότερα, για την μέτρηση της τελικής οπτικής πυκνότητας (Optical Density, OD) κάθε απομόνωσης του microplate, υπολογίστηκε η μέση τιμή των μετρήσεων από τις (7+7) τεχνικές των 2 βιολογικών επαναλήψεων. Τα αναλυτικά αποτελέσματα των μέσων όρων των μετρήσεων OD₆₂₀ για κάθε απομόνωση παρατίθενται στο **Παράρτημα**.

Οι απομονώσεις αξιολογήθηκαν και χαρακτηρίστηκαν ως προς την ικανότητά τους να σχηματίζουν βιοϋμένια με βάση τα κριτήρια που περιέγραψε η Gómez και η ομάδα της, το 2016. Πιο συγκεκριμένα, η τιμή κατώφλι της OD (OD_c) που ορίστηκε για την κατηγοριοποίηση των στελεχών ήταν η μέση τιμή των μετρήσεων της OD του αρνητικού μάρτυρα. Έτσι, τα στελέχη χαρακτηρίστηκαν ως εξής (Gómez *et al.*, 2016):

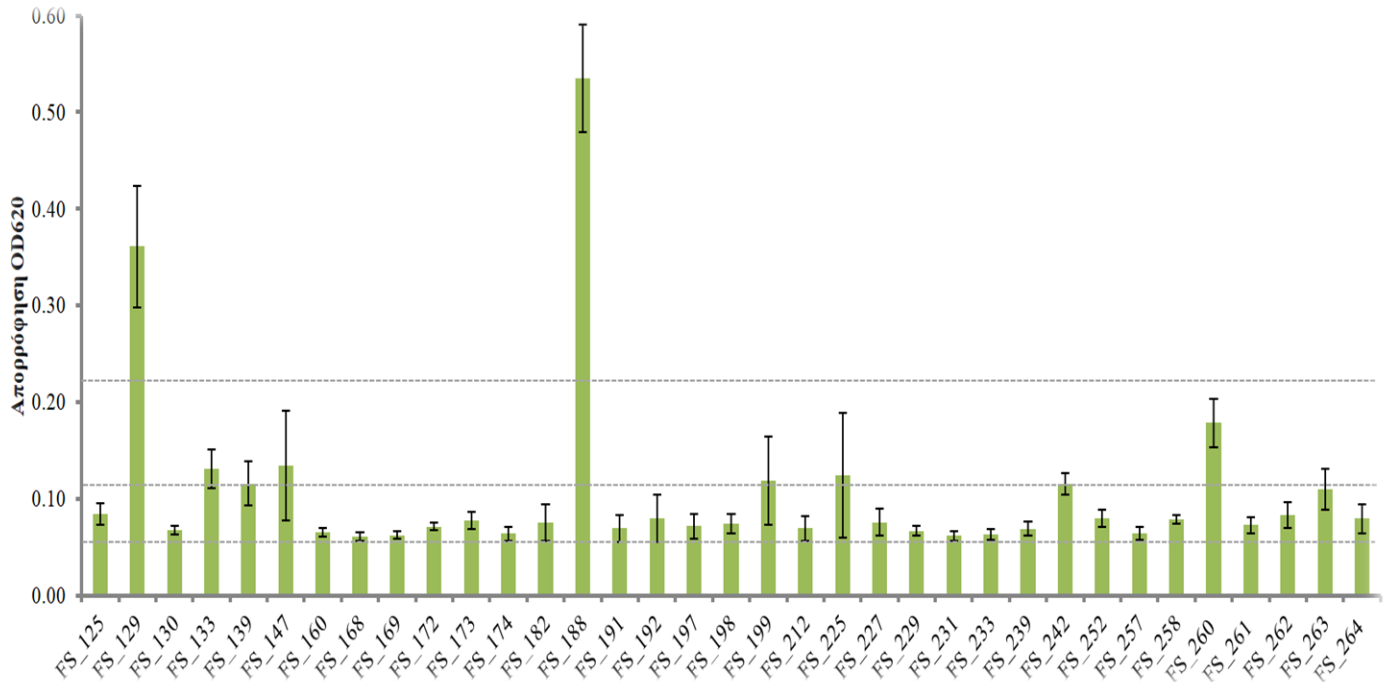
- ✓ **Μη-ικανά** να σχηματίσουν βιοϋμένια όταν η OD₆₂₀ < 0.0560 (OD_c)
- ✓ **Αδύναμα** να σχηματίσουν βιοϋμένια όταν 0.056 < OD₆₂₀ < 0.11197 (2xOD_c)
- ✓ **Ενδιάμεσης ικανότητας** όταν 0.11197 < OD₆₂₀ < 0.223939 (4xOD_c)
- ✓ **Ισχυρά** να σχηματίσουν βιοϋμένια όταν OD₆₂₀ > 0.223939

Σύμφωνα με αυτά τα κριτήρια καμία απομόνωση δεν χαρακτηρίστηκε ως μη ικανή, 26 (74.3%) χαρακτηρίστηκαν ως αδύναμες, 7 (20.0%) έχουν ενδιάμεση ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίων, ενώ 2 (5.7%) είναι ισχυρά ικανές να σχηματίζουν βιοϋμένια (**Γράφημα 5**).



■ Μη ικανά ■ Αδύναμα ■ Ενδιάμεσης ικανότητας ■ Ισχυρά
Γράφημα 6 Κατηγοριοποίηση των 35 απομονώσεων *Salmonella* spp. ως προς την ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίων.

Στο **Γράφημα 6** παρατηρούμε ότι όλες οι απομονώσεις μπορούν να δημιουργήσουν βιοϋμένια ακόμα και σε μικρό βαθμό (σχετικά με τα κριτήρια που έχουν οριστεί), καθώς επίσης ότι οι απομονώσεις **FS_129**, **FS_188** παρουσιάζουν υψηλή ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίων.



Γράφημα 7 Γραφική απεικόνιση της ικανότητας σχηματισμού βιοϋμενίων των απομονώσεων *Salmonella* spp. εκφρασμένη σε τιμές οπτικής πυκνότητας (OD₆₂₀). Οι κάθετες μπάρες απεικονίζουν το μέσο όρο 7 τεχνικών και 2 βιολογικών επαναλήψεων για το κάθε στέλεχος, ενώ οι γραμμές σφάλματος την τυπική απόκλιση των μετρήσεων από το μέσο όρο. Οι οριζόντιες διακεκομμένες απεικονίζουν τα όρια διάκρισης των απομονώσεων σύμφωνα με τα κριτήρια (Gómez *et al.*, 2016).

4.2.1 Συσχέτιση της ικανότητας σχηματισμού βιοϋμενίων με τον ορότυπο

Η ικανότητα ορισμένων ορότυπων να σχηματίζουν βιοϋμένια σε μεγαλύτερο βαθμό από άλλους τα καθιστά ιδιαίτερος ανεπιθύμητα για την βιομηχανία τροφίμων, καθώς το ρίσκο μετά την επιμόλυνση των τροφίμων με αυτούς τους ορότυπους αυξάνεται. Στην παρούσα μελέτη, τα δυο ισχυρά στελέχη ανήκουν στον *S. Infantis*. Αυτός ο ορότυπος παρουσιάζει πολύ μεγάλες διακυμάνσεις ως προς την ικανότητα ανάπτυξης βιοϋμενίων ανάμεσα στις επτά απομονώσεις που κατατάχθηκαν σε αυτόν. Σημαντικό εύρημα επίσης αποτελεί η σταθερότητα των απομονώσεων του ορότυπου *S. Derby* και *S. Thompson* ως προς την ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίων, καθώς οι 7 και οι 3 απομονώσεις αντίστοιχα δεν είχαν μεγάλη απόκλιση μεταξύ τους ως προς τα βιοϋμένια που παρήγαγαν. Οι 2 απομονώσεις του

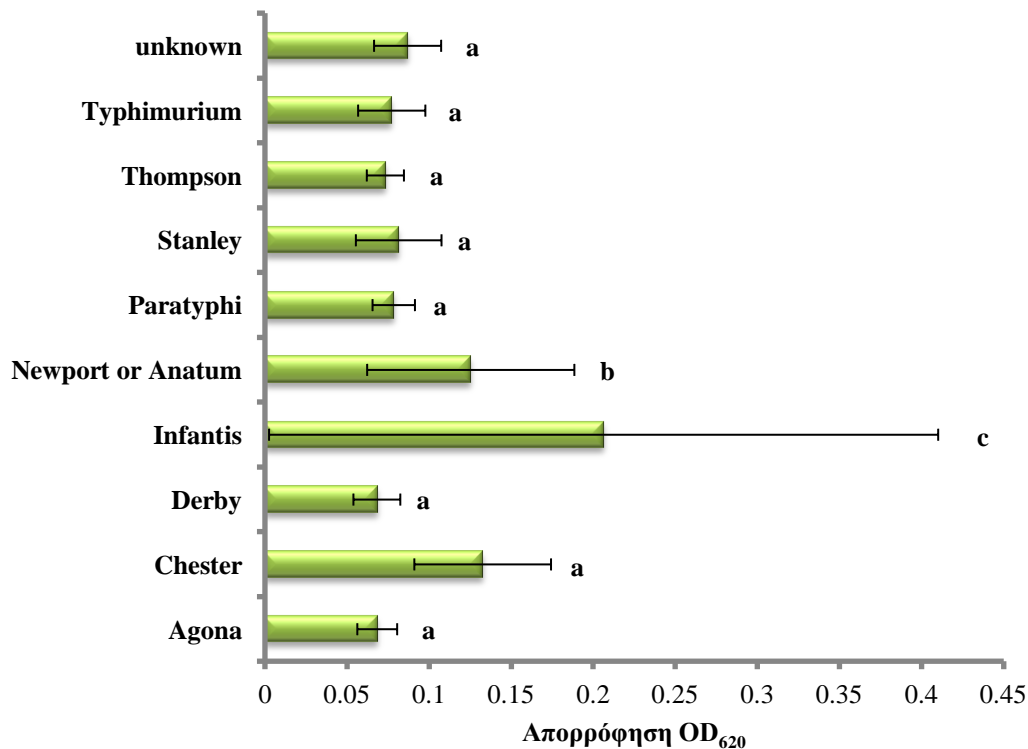
οροτύπου *S. Chester* εμφάνισαν παρόμοιο φαινοτυπικό προφίλ και μάλιστα ενδιάμεσης ικανότητας, ενώ οι 2 απομονώσεις *S. Paratyphi* επέδειξαν ένα παρόμοιο φαινοτυπικό προφίλ μεταξύ τους αλλά ως αδύναμα. Όσο για τους ορότυπους *Agona*, *Newport* or *Anatum*, *Stanley*, μια απομόνωση ελέγχθηκε για το καθένα με το *Newport* or *Anatum* να επιδεικνύει ενδιάμεση ικανότητα και τα άλλα δυο αδυναμια. Οι απομονώσεις του οροτύπου *S. Typhimurium* εμφάνιζαν ιδιαίτερη παραλλακτικότητα όπως και αυτές του «αγνώστου οροτύπου», πράγμα λογικό για τους τελευταίους λόγω του ότι αυτά μπορεί να αποτελούν διαφορετικούς ορότυπους (Πίνακας 15, Γράφημα 7). Οι ορότυποι δεν φαίνεται να διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά πλην των *Newport* ή *Anatum* και *Infantis* ($P < 0.05$) (Γράφημα 8).

Πίνακας 17 Παραγωγή βιοϋμενίων των απομονώσεων *Salmonella enterica* σύμφωνα με τον ορότυπο.

Ορότυπος	Παραγωγή Βιοϋμενίων				Σύνολο
	Μη ικανά	Αδύναμα	Ενδιάμεσης ικανότητας	Ισχυρά	
<i>S. Agona</i>	-	1(100)	-	-	1
<i>S. Chester</i>	-	-	2(100)	-	2
<i>S. Derby</i>	-	7(100)	-	-	7
<i>S. Infantis</i>	-	2 (28.5)	3(42.85)	2(28.5)	7
<i>S. Newport</i> or <i>S. Anatum</i>	-	-	1(100)	-	1
<i>S. Paratyphi</i>	-	2(100)	-	-	2
<i>S. Stanley</i>	-	1(100)	-	-	1
<i>S. Thompson</i>	-	3(100)	-	-	3
<i>S. Typhimurium</i>	-	6(85.71)	1(14.29)	-	7
unknown	-	4(100)	-	-	4

Τα περισσότερα από τα παραπάνω αποτελέσματα έρχονται σε συμφωνία με μια παρόμοια έρευνα που υλοποιήθηκε από τον Agarwal και την ομάδα του το 2011 (Agarwal *et al.*, 2011). Συγκεκριμένα, το *S. Typhimurium* εμφάνιζε αδύναμα, ενδιάμεσης ικανότητας και ισχυρά στελέχη ως προς την ικανότητα ανάπτυξης βιοϋμενίων. Επίσης, ο ορότυπος *S. Derby* εμφάνιζε μόνο αδύναμα στελέχη. Ωστόσο, υπήρχαν και πολλές διαφορές, κάτι το οποίο μπορεί να οφείλεται στους διαφορετικούς χρόνους επώασης, στους χειρισμούς του ερευνητή καθώς οι συγκεκριμένες τεχνικές είναι πολύ ευαίσθητες ή και στο ότι οι απομονώσεις προήλθαν από διαφορετικές πηγές με διαφορετική γεωγραφική προέλευση (Ινδία). Είναι

σημαντικό να αναφερθεί ότι τέτοιου είδους μελέτες απαιτούν ένα μεγάλο αριθμό δειγμάτων προκειμένου να είναι πιο εμπειριστατωμένες.

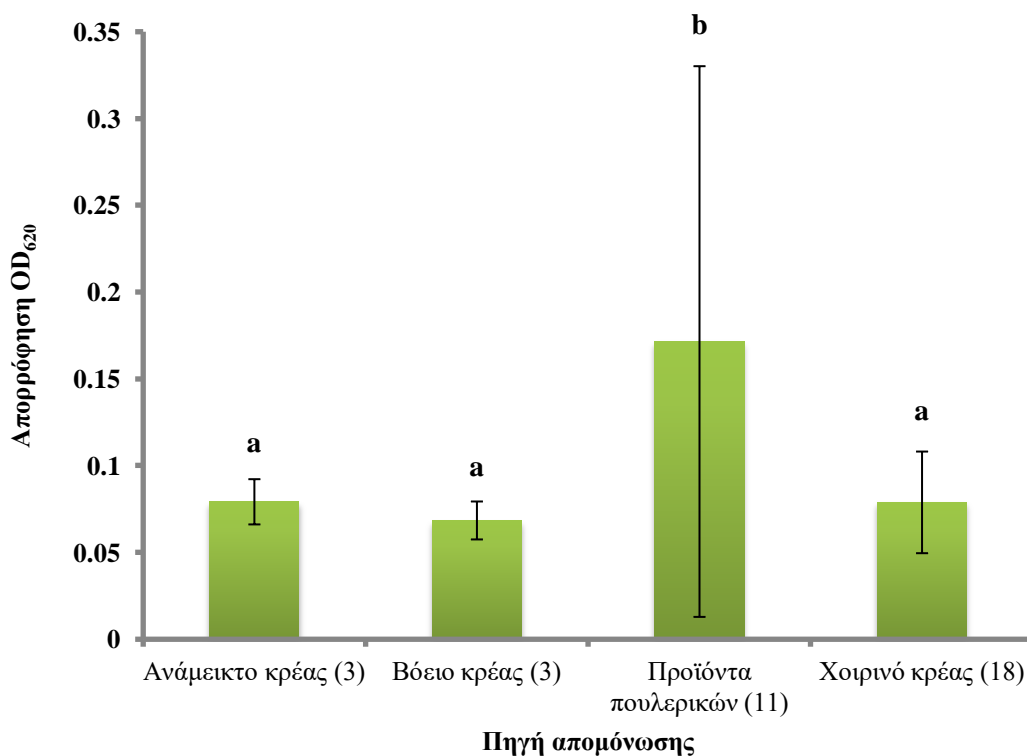


Γράφημα 8 Η ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίων ανά ορότυπο. Οι οριζόντιες μπάρες εκφράζουν το μέσο όρο των παρατηρήσεων της οπτικής πυκνότητας (OD_{620}) του εκάστοτε ορότυπου με τις γραμμές σφάλματος να δείχνουν την τυπική απόκλιση από το μέσο όρο. Οι μέσοι όροι με διαφορετικό γράμμα διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά σύμφωνα σε επίπεδο σημαντικότητας ($P < 0.05$).

Υπάρχουν στοιχεία που δείχνουν ότι περίπου το 80% των λοιμώξεων από *Salmonella enterica* Enteritidis σχετίζονται με το σχηματισμό βιοϋμενίων όπως ανασκόπησαν πρόσφατα (Borges *et al.*, 2013). Τα βιοϋμένια που παράγουν οι μικροοργανισμοί του συγκεκριμένου ορότυπου, εκτός από την αντίσταση στην απολύμανση είναι πιο ανθεκτικά στις ανοσολογικές αντιδράσεις καθώς και στις αντιμικροβιακές θεραπείες (Leite *et al.*, 2017; Tezel *et al.*, 2016). Αυτό υποδεικνύει την ισχυρή ικανότητα παραμονής και αντοχής του μικροοργανισμού μετά από χειρισμούς και τη διασπορά του. Οι Dong *et al.*, 2011, απέδειξαν ότι πιθανότατα το γονίδιο *spiA* εμπλέκεται τόσο στον σχηματισμό βιοϋμενίων όσο και στη λοιμογόνο δράση του *S. Enteritidis* (Dong *et al.*, 2011).

4.2.2 Συσχέτιση της ικανότητας σχηματισμού βιοϋμενίων με την πηγή απομόνωσης.

Το χοιρινό κρέας αποτελούσε την κύρια πηγή απομονώσεων (18 σε αριθμό) *Salmonella* spp. με τα αποτελέσματα να δείχνουν ότι παρουσίασαν κοντινή φαινοτυπική συμπεριφορά ως προς τα βιοϋμένια που ανέπτυξαν. Κάτι τέτοιο δεν εμφανίζεται στις 11 απομονώσεις από τα προϊόντα κοτόπουλου που είχαν ιδιαίτερα μεγάλη παραλλακτικότητα ως προς αυτή τη δοκιμή. Οι απομονώσεις από ανάμεικτο και βόειο κρέας δεν εμφάνιζαν ιδιαίτερη παραλλακτικότητα ωστόσο πρέπει να σημειωθεί ότι τα δείγματα ήταν πολύ μικρότερα σε πλήθος σε σχέση με τις δυο κύριες πηγές απομονώσεων. Από το **Γράφημα 8** δεν φαίνεται να υπάρχει κάποια στατιστικά σημαντική ($P < 0.05$) διαφορά μεταξύ των πηγών από τις οποίες προήλθαν οι απομονώσεις που εξετάστηκαν, πλην των προϊόντων πουλερικών.



Γράφημα 9 Ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίων σε σχέση με την πηγή απομόνωσης. Οι κάθετες μπάρες εκφράζουν το μέσο όρο των παρατηρήσεων της οπτικής πυκνότητας (OD_{620}) των πηγών από τις οποίες απομονώθηκε το παθογόνο. Στις παρενθέσεις αναγράφεται το σύνολο των απομονώσεων των πηγών. Επίσης απεικονίζονται και οι τυπικές αποκλίσεις. Οι μέσοι όροι με διαφορετικό γράμμα διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα σε επίπεδο σημαντικότητας ($P < 0.05$).

4.3 Προσδιορισμός MIC των απομονώσεων με χρήση απολυμαντικών

Όπως αναφέρθηκε νωρίτερα στο **Κεφάλαιο 1.2.3.1** η χρήση απολυμαντικών αποτελεί μια μέθοδο εξάλειψης των μικροοργανισμών. Στη παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν δυο ευρέως διαδεδομένα στη βιομηχανία τροφίμων απολυμαντικά για την εύρεση της MIC τους έναντι 20 απομονώσεων διαφόρων ορότυπων *Salmonella* spp., το PAA και το BC. Ακολουθήθηκε η διαδικασία που παρουσιάστηκε στην **Παράγραφο 3.3.5** και τελικά ποσοτικοποιήθηκε η ικανότητα ανάπτυξης των μικροοργανισμών σε διάφορες συγκεντρώσεις των απολυμαντικών με την μέτρηση της οπτικής πυκνότητας στα 620nm κάθε πηγαδιού στο microplate. Αναλυτικότερα, για την μέτρηση της τελικής οπτικής πυκνότητας (Optical Density, OD) κάθε απομόνωσης του microplate, υπολογίστηκε η μέση τιμή των μετρήσεων από τις (2+2) τεχνικές των 2 βιολογικών επαναλήψεων. Τα αναλυτικά αποτελέσματα των μέσων όρων των μετρήσεων OD₆₂₀ για κάθε απομόνωση παρατίθενται στο **Παράρτημα**.

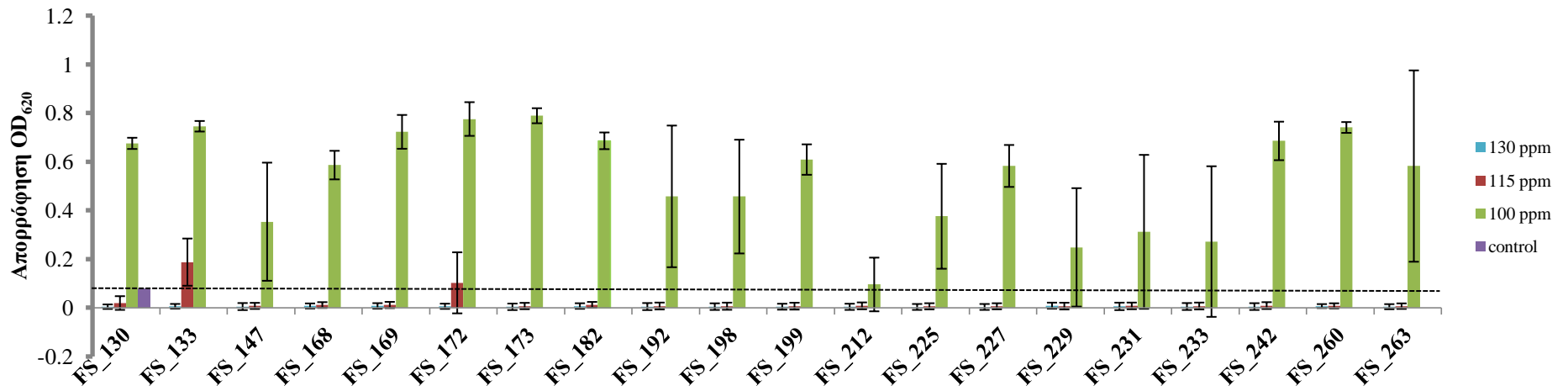
Συγκεκριμένα:

PAA

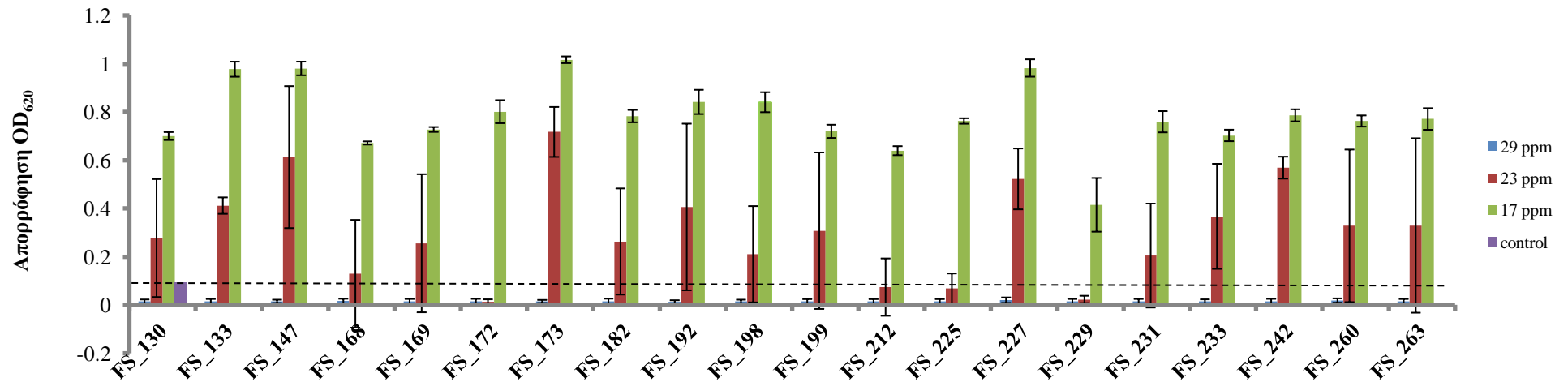
Μετά την μέτρηση της OD₆₂₀ προέκυψε ότι καμία απομόνωση δεν αναπτύχθηκε σε συγκέντρωση 130ppm ενώ στην αμέσως μικρότερη συγκέντρωση (115ppm) 18 δεν αναπτύχθηκαν (**Γράφημα 13**), τα οποία αναπτύχθηκαν στα 100ppm. Έτσι, προκύπτει ότι η MIC για 2 απομονώσεις (**FS_172, FS_133**) ήταν 130ppm ενώ για 18 απομονώσεις ήταν 115ppm (**Γράφημα 10**). Αυτό σημαίνει ότι δεν υπήρχε μεγάλη παραλλακτικότητα στην αντοχή των στελεχών ως προς το PAA.

BC

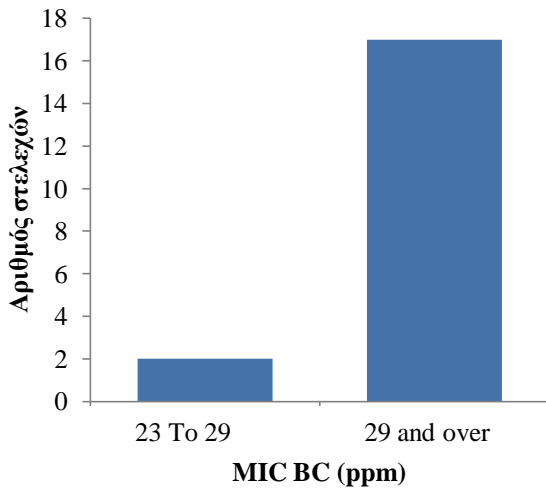
Μετά την μέτρηση της OD₆₂₀ προέκυψε ότι καμία απομόνωση δεν αναπτύχθηκε σε συγκέντρωση 29ppm ενώ στην αμέσως μικρότερη συγκέντρωση (23ppm) 2 μόνο δεν αναπτύχθηκαν (**Γράφημα 12**). Έτσι προκύπτει ότι η MIC για τις 18 απομονώσεις ήταν 29ppm ενώ για 2 απομονώσεις (**FS_172, FS_229**) ήταν 23ppm (**Γράφημα 11**). Αυτό σημαίνει ότι δεν υπήρχε μεγάλη παραλλακτικότητα στην αντοχή των στελεχών ως προς το BC.



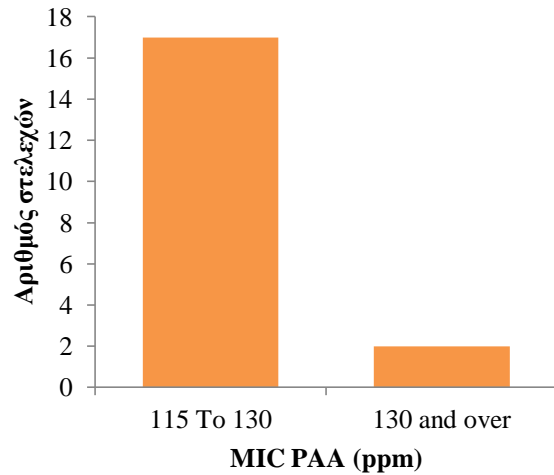
Γράφημα 10 Γραφική απεικόνιση της ανάπτυξης των απομονώσεων *Salmonella* spp., παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων PAA, εκφρασμένη σε τιμές οπτικής πυκνότητας (OD_{620}). Οι κάθετες μπάρες απεικονίζουν το μέσο όρο 4 τεχνικών και 2 βιολογικών επαναλήψεων για το κάθε στέλεχος, ενώ οι γραμμές σφάλματος την τυπική απόκλιση των μετρήσεων από το μέσο όρο. Η οριζόντια διακεκομμένη γραμμή αποτελεί το μέσο όρο των αρνητικών των 3 συγκεντρώσεων.



Γράφημα 11 Γραφική απεικόνιση της ανάπτυξης των απομονώσεων *Salmonella* spp., παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων BC, εκφρασμένη σε τιμές οπτικής πυκνότητας (OD_{620}). Οι κάθετες μπάρες απεικονίζουν το μέσο όρο 4 τεχνικών και 2 βιολογικών επαναλήψεων για το κάθε στέλεχος, ενώ οι γραμμές σφάλματος την τυπική απόκλιση των μετρήσεων από το μέσο όρο. Η οριζόντια διακεκομμένη γραμμή αποτελεί το μέσο όρο των αρνητικών των 3 συγκεντρώσεων.



Γράφημα 13 Αριθμός στελεχών στα βήματα συγκεντρώσεων στα οποία εντοπίστηκε MIC για το BC.



Γράφημα 12 Αριθμός στελεχών στα βήματα συγκεντρώσεων στα οποία εντοπίστηκε MIC για το PAA.

Το **FS_172**, το οποίο ανήκει στον ορότυπο *Typhimurium* αξίζει να σημειωθεί ότι έχει μια ιδιαίτερη συμπεριφορά σε σχέση με τις άλλες απομονώσεις καθώς εμφανίζει μεγάλη ανθεκτικότητα στο BC ενώ αντίθετα μικρή στο PAA, σε σχέση με τις άλλες απομονώσεις.

Είναι προφανές ότι πολύ μικρότερη συγκέντρωση BC (29ppm) είναι αρκετή για την παρεμπόδιση του μικροοργανισμού σε σχέση με την συγκέντρωση PAA (130ppm). Αυτό έρχεται σε συμφωνία με μια άλλη έρευνα, από τους Humayoun et al., 2018, όπου αποδείχθηκε ότι σε 88 απομονώσεις του μικροοργανισμού *Salmonella* spp., για το PAA η MIC₅₀ ήταν 880 ppm και η MIC₉₀ 1760 ppm ενώ για το BC η MIC₅₀ ήταν 40 ppm όπως και η MIC₉₀. Η MIC₅₀ (διάμεσος MIC) και η MIC₉₀ αντιπροσώπευαν την MIC στην οποία το 50% και το 90% όλων των απομονώσεων ήταν αντίστοιχα, ευαίσθητα (Humayoun et al., 2018).

Είναι σημαντικό να αναφέρουμε ότι παρά τη μικρή παραλλακτικότητα των απομονώσεων ως προς τα συγκεκριμένα απολυμαντικά, ορισμένα στις ίδιες συγκεντρώσεις εμφανίζουν πολύ μεγαλύτερη ανάπτυξη σε σχέση με άλλα, καθώς η OD τους λαμβάνει μεγαλύτερες τιμές. Ωστόσο, πρέπει να σημειωθεί ότι σε πολλές περιπτώσεις διακρίνεται η διαφορά των μετρήσεων που λήφθηκαν από τις 2 βιολογικές επαναλήψεις μέσω των γραμμών σφάλματος που απεικονίζουν την τυπική απόκλιση.

Απομόνωση	Οροτυποποίηση	MIC (mg/l)	
		BC	PAA
FS_130	Derby	29	115
FS_133	Chester	29	130
FS_147	Chester	29	115
FS_168	Typhimurium	29	115
FS_169	Infantis	29	115
FS_172	Typhimurium	23	130
FS_173	Thompson	29	115
FS_182	Derby	29	115
FS_192	Stanley	29	115
FS_198	Typhimurium	29	115
FS_199	Infantis	29	115
FS_212	Agona	29	115
FS_225	Newport or Anatum	29	115
FS_227	Paratyphi	29	115
FS_229	Typhimurium	23	115
FS_231	Derby	29	115
FS_233	Thompson	29	115
FS_242	Infantis	29	115
FS_260	Infantis	29	115
FS_263	unknown	29	115

Πίνακας 18 Προσδιορισμός της αντιμικροβιακής ικανότητας των απολυμαντικών μέσω του προσδιορισμού της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης με τη χρήση τρυβλίων μικροτιτλοδότησης.

Όσον αφορά το BC, σε μια παρόμοια μελέτη ως MIC για το μικροοργανισμό *S. Typhimurium* βρέθηκε να είναι η συγκέντρωση 39.1 ppm BC (Kang *et al.*, 2019). Η συγκεκριμένη MIC αποτελεί πολύ κοντινή τιμή σε σχέση με την παρούσα μελέτη όπως και τη μελέτη των Humayoun *et al.*, 2018. Σύμφωνα με την έρευνα του Long *et al.*, 2016, όπου ελέγχθηκε η ευαισθησία 195 απομονώσεων *Salmonella* σε 4 απολυμαντικά, φάνηκε ότι ο ορότυπος *Salmonella* Enteritidis ήταν περισσότερο ανθεκτικός (128 mg l⁻¹) στο BC σε σχέση με τις άλλες απομονώσεις και τα άλλα απολυμαντικά. Οι υπόλοιποι ορότυποι (*Salmonella* Derby, *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Braenderup, *Salmonella* Jerusalem, και άλλοι ορότυποι) είχαν MIC σε συγκέντρωση 64 mg l⁻¹ BC (Long *et al.*, 2016). Τέλος, σύμφωνα με τους Fazlara & Ekhtelat, 2012, το MIC για το μικροοργανισμό *S. Typhimurium* ήταν 80 mg/l (Fazlara & Ekhtelat, 2012). Οι διαφορές που παρουσιάζονται στις δυο τελευταίες μελέτες μπορεί να οφείλονται σε διαφορές του θρεπτικού υποστρώματος και της πειραματικής διαδικασίας.

Διάφορες μελέτες που διεξήχθησαν υπό πειραματικές συνθήκες σχετικά με τις βακτηριοκτόνες επιδράσεις του υπεροξικού οξέος τόνισαν την αποτελεσματικότητά του έναντι των βακτηρίων σε συγκεντρώσεις που είναι γενικά χαμηλότερες από 100 ppm με

χρόνο επαφής 5 λεπτά. Ωστόσο, απαιτούνται πολύ υψηλότερες συγκεντρώσεις για να επιτευχθεί αδρανοποίηση των σπόρων, από 500 έως 30000 ppm για τους χρόνους επαφής που κυμαίνονται από 15 δευτερόλεπτα έως 15 λεπτά σε περιβαλλοντικές θερμοκρασίες (Baldry, 1983; Humayoun *et al.*, 2018). Στη μελέτη που ολοκλήρωσαν οι Humayoun *et al.*, 2018, το 75% των απομονώσεων *Salmonella* spp. ήταν ευαίσθητα σε 880 $\mu\text{g ml}^{-1}$ και το υπόλοιπο 25% ήταν ευαίσθητα στο 1.760 $\mu\text{g ml}^{-1}$, το οποίο είναι υψηλότερο από το συνιστώμενο από το CDC (<5 λεπτά σε <100 $\mu\text{g ml}^{-1}$) (Humayoun *et al.*, 2018). Αυτό μπορεί να οφείλεται στην παρουσία υψηλής οργανικής ύλης στο ζωμό ΜΗ που χρησιμοποιήθηκε κατά το πείραμα, καθώς έχει αναφερθεί ότι η αντιβακτηριακή δραστηριότητα του ΡΑΑ μπορεί να μειωθεί παρουσία οργανικής ύλης (Inatsu *et al.*, 2005).

Λίγα είναι γνωστά για την ευαισθησία στο μικροοργανισμό σε αυτές τις ενώσεις και μερικές μελέτες έχουν δείξει μια σχετική σχέση μεταξύ της ανθεκτικότητας τους στα απολυμαντικά και της αντοχής στα αντιβιοτικά (Humayoun *et al.*, 2018).

Εν κατακλείδι, τα διαλύματα υπεροξικού οξέος που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία τροφίμων εφαρμόζονται για την εξυγίανση και τον καθαρισμό των επιφανειών σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονται από περίπου 88 ppm έως 130 ppm (FPTM, 2019). Τα QACs, στα οποία ανήκει και το χλωριούχο βενζαλκόνιο εφαρμόζονται σε συγκεντρώσεις 200-400 ppm (Chauret, 2014). Άρα, οι απομονώσεις είναι ευαίσθητες στις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιούνται συνήθως στη βιομηχανία τροφίμων αλλά πιθανότατα να είχαμε μεγαλύτερες διαφορές μεταξύ τους αν ελέγγαμε την ανθεκτικότητα των βιοϋμενίων τους στα αντίστοιχα απολυμαντικά που αποτελούν πιο ανθεκτικές μορφές τους.

4.4 Προσδιορισμός των οριακών τιμών pH για την ανάπτυξη των απομονώσεων *Salmonella* spp.

Η μεταβολή του pH αποτελεί όπως αναφέρθηκε στο **Κεφάλαιο 1.2.3.1** συχνή τεχνική στην επεξεργασία τροφίμων, ενώ οι μικροοργανισμοί έχοντας την ικανότητα αίσθησης και αντίδρασης επιβιώνουν με μεταβολή της κινητικής συμπεριφοράς της μικροβιακής ανάπτυξης τους. Η παραλλακτικότητα μεταξύ των στελεχών είναι ένα γεγονός με σημαντικές επιπτώσεις στην έρευνα για την ασφάλεια των τροφίμων.

Με στόχο την εκτίμηση των οριακών τιμών pH, αξιολογήθηκε η ανάπτυξη των 20 απομονώσεων *Salmonella* spp., διαφόρων ορότυπων, σε TSB σε ένα εύρος τιμών pH 4.8-8.0 με σταθερές θερμοκρασιακές συνθήκες (37°C). Οι μέγιστοι ειδικοί ρυθμοί ανάπτυξης (μ_{max})

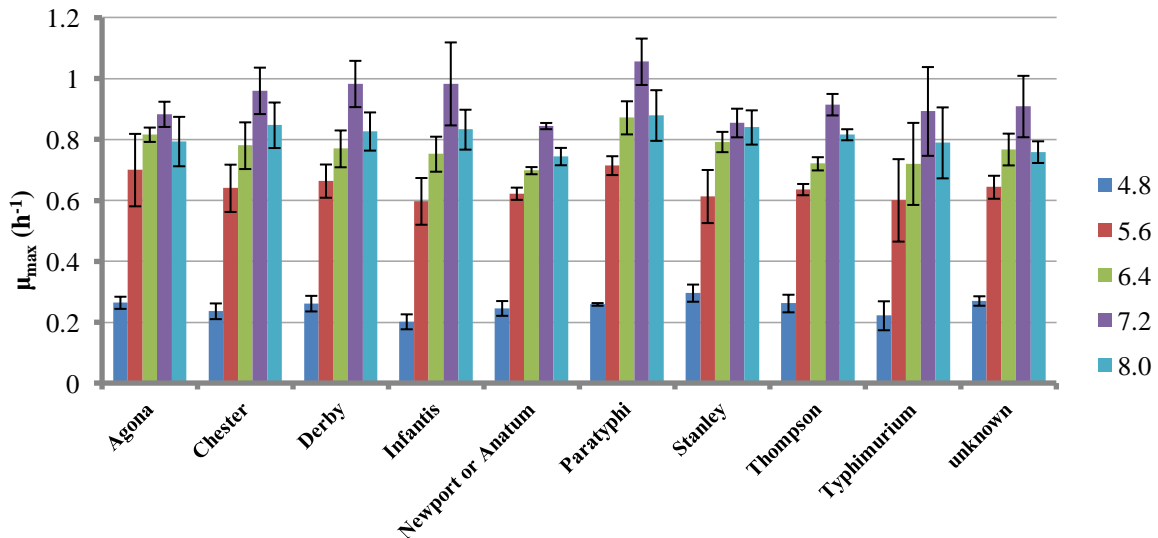
για κάθε απομόνωση και συνθήκες ανάπτυξης προσδιορίστηκαν με τη βοήθεια των χρόνων ανίχνευσης απορρόφησης σειριακά (DTs) δεκαδικών αραιωμένων καλλιιεργειών χρησιμοποιώντας το αυτοματοποιημένο σύστημα Bioscreen C. Δημιουργήθηκαν συνολικά 4000 καμπύλες οπτικής πυκνότητας για τις απομονώσεις και τις εξεταζόμενες συνθήκες ανάπτυξης.

Στη συνέχεια, οι οριακές τιμές pH για κάθε απομόνωση εκτιμήθηκαν με τη χρήση του μοντέλου του Rosso που αποτελεί ένα μοντέλο θεμελιωδών παραμέτρων (Cardinal Parameter Model) (**Παράγραφος 1.2.2**). Πιο συγκεκριμένα, οι εκτιμήσεις για τις ελάχιστες, μέγιστες και άριστες τιμές pH ανάπτυξης καθώς και η τυπική απόκλιση, ο συντελεστής προσδιορισμού (R^2), η Root Mean Square Error (RMSE) και τα 95% όρια εμπιστοσύνης, παρουσιάζονται αναλυτικά στο **Παράρτημα**. Οι τιμές του μ_{max} (h^{-1}) κυμάνθηκαν από 0.14 έως 0.33 για το pH 4.8, από 0.38 έως 0.80 για το pH 5.6, από 0.49 έως 0.93 για το pH 6.4, από 0.63 έως 1.25 για το pH 7.2, από 0.54 έως 1.00 για το pH 8.0. Η βέλτιστη ανάπτυξη του *S. enterica* εξασφαλίζεται σε τιμές pH που πλησιάζουν την ουδετερότητα, ενώ οι τιμές πάνω από 9.0 και κάτω από 4.0 είναι βακτηριοκτόνες, ενώ ελάχιστο pH ανάπτυξης μόλις 4.05 έχει καταγραφεί για ορισμένους ορότυπους του μικροοργανισμού υπό βέλτιστες εργαστηριακές συνθήκες και με HCl και κιτρικό οξύ να χρησιμοποιούνται ως όξινες ουσίες J. Jay (2000). Αυτό καθιστά λογικούς τους παραπάνω ειδικούς ρυθμούς αύξησης του μικροοργανισμού.

Σε συμφωνία με τα ευρήματα προηγούμενων ερευνών σχετικά με τη συμπεριφορά αύξησης των παθογόνων βακτηρίων που προέρχονται από τρόφιμα (Juneja *et al.*, 2003; Lianou & Koutsoumanis, 2011), οι τιμές μ_{max} που εκτιμήθηκαν σε αυτή τη μελέτη δεν είχαν σχέση με τον ορότυπο των στελεχών *S. enterica* σε καμία από τις συνθήκες ανάπτυξης που αξιολογήθηκαν. Αυτό απεικονίζεται στο **Γράφημα 14** το οποίο παρουσιάζει τις μέσες τιμές μ_{max} για κάθε ορότυπο στις πέντε συνθήκες ανάπτυξης. Εντούτοις, πρέπει να αναγνωρίσουμε ότι οι εννέα ορότυποι στους οποίους ανήκουν τα δοκιμασθέντα στελέχη δεν ήταν εξίσου αντιπροσωπευτικοί, με τους ορότυπους να αντιπροσωπεύονται από σχετικά λίγα προϊόντα απομόνωσης και οι ορότυποι Stanley, Paratyphi, Newport or Anatum, Agona μόνο από ένα απομονωμένο προϊόν.

Σε έρευνες που διεξήχθησαν σε απομονώσεις του μικροοργανισμού για τον προσδιορισμό της κινητικής της ανάπτυξης τους, αναφέρθηκε ασήμαντη επίδραση του ορότυπου. Συγκεκριμένα, Οι Juneja *et al.*, 2003, διερεύνησαν την κινητική ανάπτυξης 10 στελεχών του παθογόνου, απομονωμένες από κιμά κοτόπουλου, σε ζωμό καλλιέργειας στους 19°C και 37°C και παρατηρούσαν μόνο μικρές διαφορές στις παραμέτρους ανάπτυξης μεταξύ των ορότυπων (Juneja *et al.*, 2003). Σε μια άλλη μελέτη, οι Lianou & Koutsoumanis, 2011,

εξέτασαν 60 απομονώσεις σε διαφορετικών pH στους 37°C, όπου επίσης οι τιμές μ_{max} που εκτιμήθηκαν δεν είχαν σχέση με τον ορότυπο των στελεχών *S. enterica* σε καμία από τις συνθήκες ανάπτυξης που αξιολογήθηκαν (Lianou & Koutsoumanis, 2011).

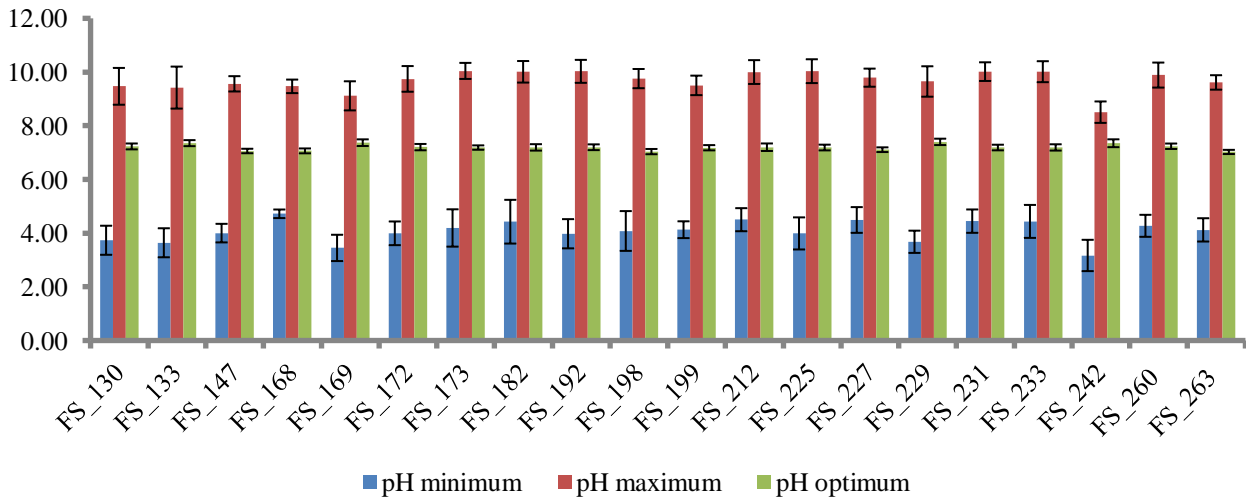


Γράφημα 14 Μέγιστες ειδικές τιμές ανάπτυξης (μ_{max}) των απομονώσεων του μικροοργανισμού *Salmonella* spp. που ανήκουν σε διάφορους ορότυπους σε TSB 5 διαφορετικών pH (■4.8, ■5.6, ■6.4, ■7.2, ■8)

Όσον αφορά την αξιολόγηση του μοντέλου, ο συντελεστής προσδιορισμού (R^2) και ο δείκτης της τετραγωνικής ρίζας του μέσου τετραγώνου του σφάλματος (Root Mean Square Error, RMSE) που υπολογίστηκαν μεγαλύτερος από το 0.90 ο πρώτος και μεταξύ 0.046 έως 0.102 ο δεύτερος, θέτουν το μοντέλο κατάλληλο για την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων.

Ο συντελεστής R^2 , όταν λαμβάνει τιμές κοντά στο 1 δείχνει ότι το μοντέλο περιγράφει βέλτιστα την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων, ενώ ο δείκτης RMSE σε τιμές κοντά στο 0 παρουσιάζει την καλύτερη προσαρμογή των πειραματικών δεδομένων στο μοντέλο. Έτσι, οι εκτιμώμενες τιμές της παρούσας μελέτης δείχνουν ότι η επίδραση του pH στην ανάπτυξη κάθε μιας από τις απομονώσεις *Salmonella* spp. περιγράφονται πολύ καλά από το μοντέλο του Rosso.

Στο **Γράφημα 15** παρουσιάζονται οι τιμές των pH_{min} , pH_{opt} και pH_{max} για κάθε απομόνωση *Salmonella* spp. καθώς και οι τυπικές αποκλίσεις τους που υποδηλώνουν τη μεταβολή ή τη διασπορά του συνόλου των εκτιμώμενων τιμών για κάθε απομόνωση.



Γράφημα 15 Οριακές τιμές για κάθε απομόνωση *Salmonella* spp. μετά την εκτίμηση των παρατηρήσεων μ_{max} από το μοντέλο του Rosso.

Οι βέλτιστες τιμές (pH_{opt}) των απομονώσεων δεν παρουσιάζουν ιδιαίτερη παραλλακτικότητα καθώς κυμαίνονται μεταξύ 7.0-7.4. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία οι τιμές αυτές βρίσκονται μέσα στο βέλτιστο εύρος pH (6.5-7.5) του μικροοργανισμού (Graziani *et al.*, 2017). Ωστόσο, όσον αφορά τις μέγιστες και τις ελάχιστες τιμές οι διακυμάνσεις είναι αρκετά μεγαλύτερες και αυτό είναι πιθανό να προδίδει την παραλλακτικότητα μεταξύ των οροτύπων. Συγκεκριμένα, οι μέγιστες οριακές τιμές (pH_{max}) κυμαίνονται από 8.5 έως 10 με ορισμένες απομονώσεις να εμφανίζουν $pH > 10$ (**FS_173, FS_182, FS_192, FS_212, FS_225, FS_231, FS_233**). Αντίστοιχα για τις ελάχιστες οριακές τιμές (pH_{min}) παρουσιάζεται ένα σημαντικό εύρος θεωρητικών τιμών μεταξύ 3.1 και 4.7 με ορισμένες απομονώσεις να εμφανίζουν $pH < 4$ (**FS_130, FS_133, FS_169, FS_172, FS_192, FS_225, FS_229, FS_242**). Ωστόσο, δυο απομονώσεις **FS_192, FS_225** φαίνεται να αναπτύσσονται και στις δυο ακραίες περιπτώσεις πράγμα που είναι πιθανό να τις καθιστά ιδιαίτερα ανθεκτικές σε αντιμικροβιακούς παράγοντες ακραίων συνθηκών pH (π.χ απολυμαντικά, αιθέρια έλαια, όξινο περιβάλλον γαστρεντερικού σωλήνα ξενιστών). Όπως αναφέρθηκε νωρίτερα σύμφωνα με τη βιβλιογραφία οι τιμές πάνω από 9.0 και κάτω από 4.0 είναι ανασταλτικές για το μικροοργανισμό *Salmonella* spp., ενώ ελάχιστο pH ανάπτυξης μόλις 4.05 έχει καταγραφεί για ορισμένους ορότυπους του μικροοργανισμού υπό βέλτιστες εργαστηριακές συνθήκες (J. Jay, 2000).

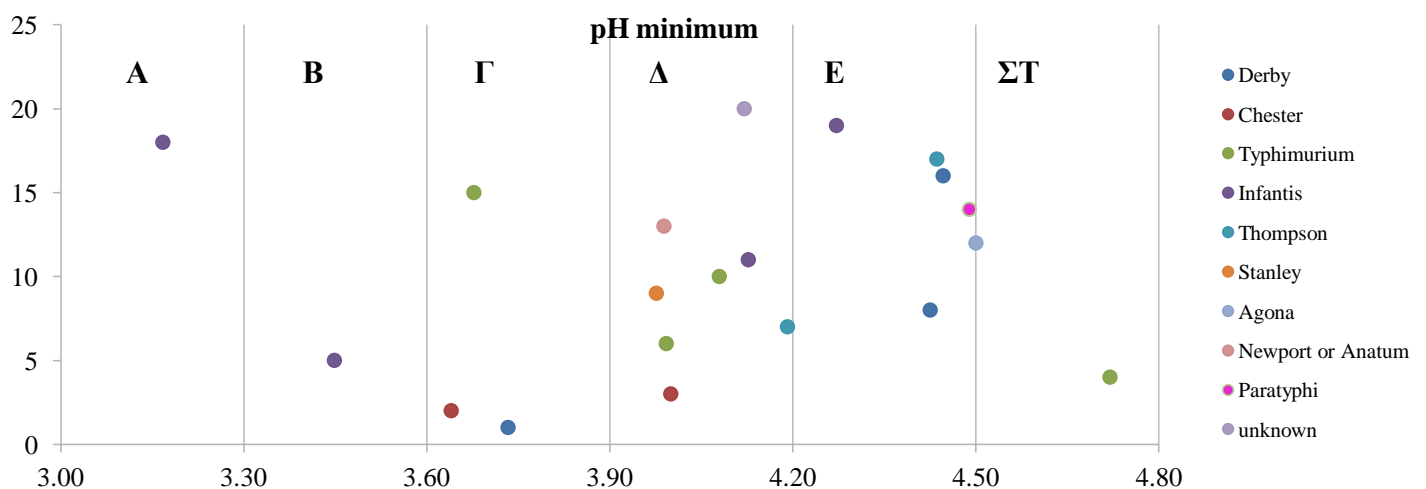
Η διαφορά των εκτιμώμενων τιμών με τις πραγματικές τιμές οφείλεται στο ότι οι πρώτες αποτελούν προβλέψεις που προκύπτουν μετά από την εφαρμογή του μοντέλου του Rosso. Γι' αυτό το λόγο πρόκειται για θεωρητικές και όχι πραγματικές τιμές. Στη συγκεκριμένη μελέτη

εξετάζεται μόνο ο παράγοντας pH, ενώ υπό πραγματικές συνθήκες ο μικροοργανισμός επηρεάζεται από ένα πλήθος περιβαλλοντικών συνθηκών που έχουν ανεξάρτητες και πολλαπλές επιδράσεις στο ρυθμό ανάπτυξης, ενώ δρουν συνδυαστικά. Προσθέτοντας κάποιο επιπλέον παράγοντα είναι πιθανό οι τιμές αυτές να μεταβάλλονται προς κατώτερες τιμές από ότι τις εκτιμώμενες της παρούσας μελέτης λόγω προσθετικής επίδρασης του.

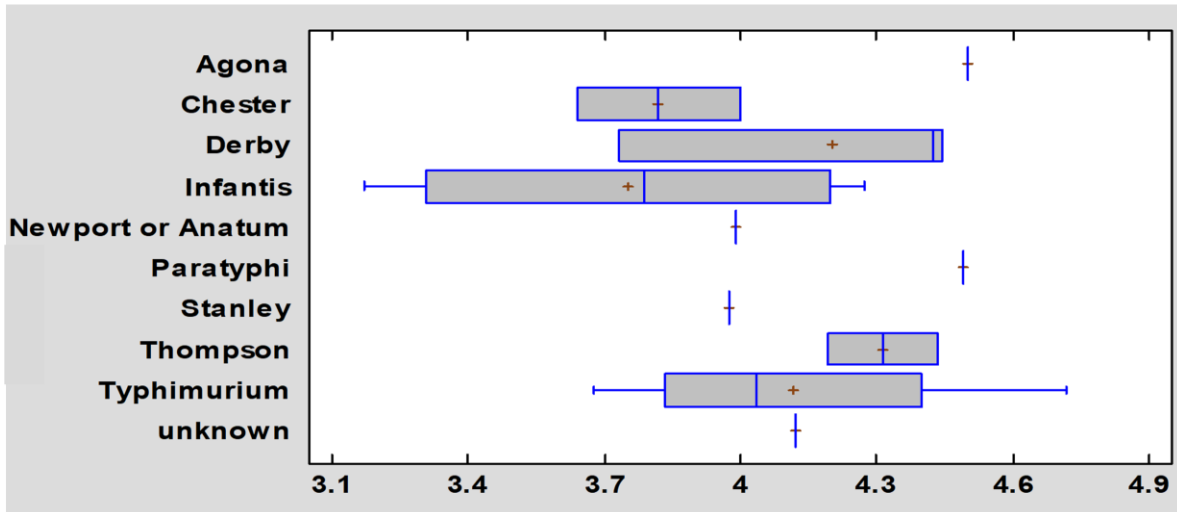
4.4.1 Συσχέτιση οριακών τιμών pH με τους ορότυπους

Η γνώση των ακραίων τιμών που εκτιμήθηκαν ως προς τους ορότυπους αποτελεί μια σημαντική πληροφορία ειδικά αν πρόκειται για την αντιμετώπιση του μικροοργανισμού ύστερα από την γονιδιωματική ανάλυση του, πιθανότατα με χρήση κατάλληλων απολυμαντικών με pH ικανών να υπερिσχύσουν έναντι του μικροοργανισμού. Επίσης, αποτελούν σημαντική πληροφορία σε μια πιθανή επιμόλυνση τροφίμων που διαθέτουν pH κοντά σε εκείνες τις τιμές, όπου και οι έννοιες αυτές αποκτούν βιολογική σημασία. Στα **Γραφήματα 16** και **18** παρίστανται η διασπορά των ορότυπων στο εύρος των ελάχιστων και μέγιστων οριακών pH αντίστοιχα. Τα διαφορετικά χρώματα διακρίνουν τους ορότυπους μεταξύ τους.

Επίσης, δημιουργήθηκαν θηκογράμματα (Multiple-Box-and-Whisker-Plots) για μια πιο ολοκληρωμένη απεικόνιση της κατανομής των θεωρητικών οριακών pH σε σχέση με τους ορότυπους και παρουσιάζονται στα **Γραφήματα 17** και **19**, για τις ελάχιστες και μέγιστες οριακές τιμές, αντίστοιχα.

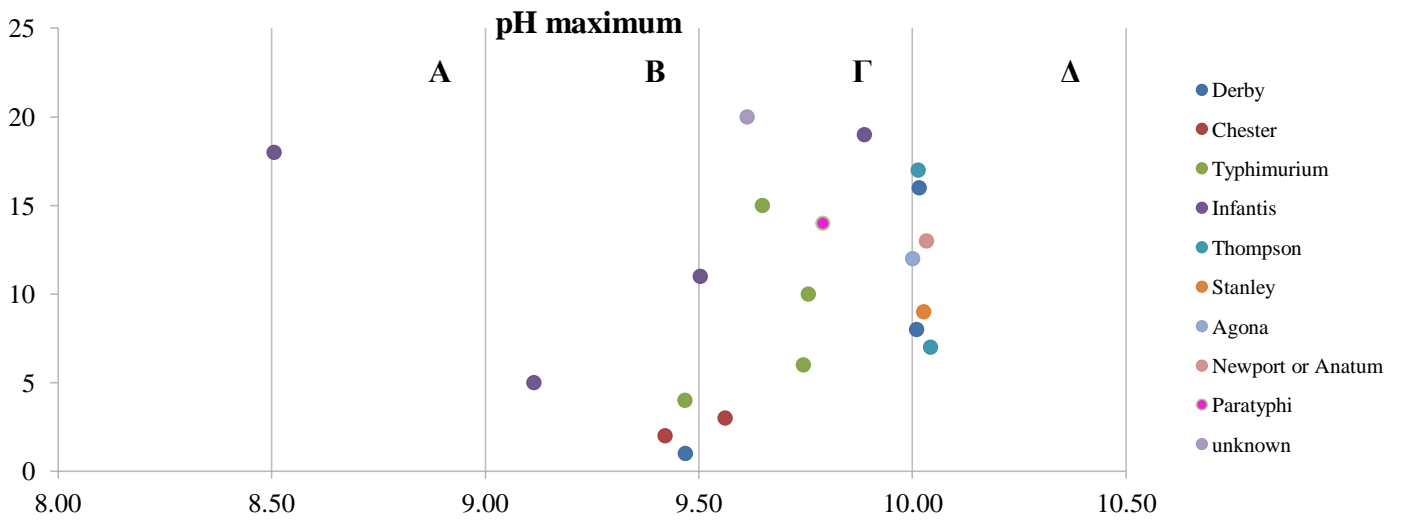


Γράφημα 16 Γραφική απεικόνιση της διασποράς των ορότυπων των απομονώσεων σε σχέση με το ελάχιστο θεωρητικό οριακό pH τους.



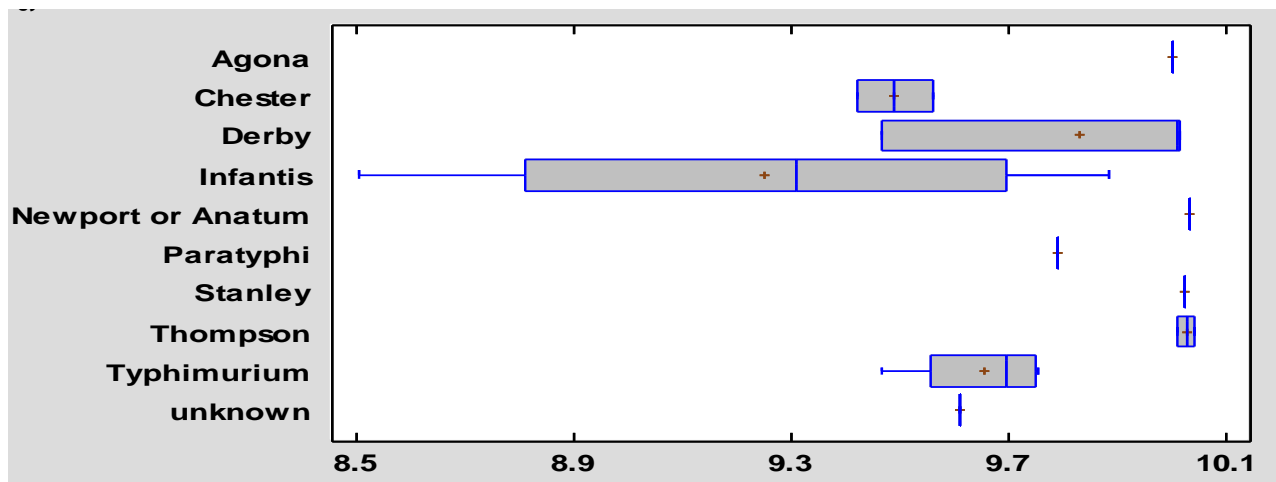
Γράφημα 17 Θηκόγραμμα κατανομής των ελάχιστων θεωρητικών τιμών pH ανάλογα με τον ορότυπο.

Όσον αφορά τις ελάχιστες οριακές θεωρητικές τιμές για καλύτερη διατύπωση των αποτελεσμάτων σύμφωνα με το **Γράφημα 16**, θα μπορούσαν να δημιουργηθούν 2 κατηγορίες με διαφορετικά εύρη ελάχιστων pH (**A**:pH<3.3, **B**:3.3-3.6, **Γ**:3.6-3.9, **Δ**:3.9-4.2, **E**:4.2-4.5, **ΣΤ**:4.5-4.8). Στη Δ κατηγορία όπως είναι και αναμενόμενο από τη βιβλιογραφία, κατανέμονται οι περισσότερες απομονώσεις *Salmonella*. Ωστόσο, είναι εμφανής η παραλλακτικότητα μεταξύ των απομονώσεων και του ίδιου ορότυπου πλην του Thompson όπου και οι δυο απομονώσεις που ανήκουν σε αυτόν παρουσιάζουν πολύ κοντινές ελάχιστες τιμές. Οφείλουμε όμως να αναφέρουμε ότι το πλήθος των απομονώσεων είναι πολύ μικρό. Επίσης, πλην των 5 απομονώσεων που αποτελούν σίγουρα διαφορετικά στελέχη, είναι πιθανό οι απομονώσεις που βρίσκονται στον ίδιο ορότυπο να αποτελούν επίσης ξεχωριστά στελέχη. Επίσης, 2 απομονώσεις Infantis φαίνεται να είναι ιδιαίτερα ανθεκτικές σε χαμηλά pH. Παράλληλα, σύμφωνα και με το **Γράφημα 17** παρά το ότι ο συγκεκριμένος ορότυπος παρουσιάζει ένα ευρύ φάσμα τιμών, η κατανομή τους είναι συμμετρική. Ωστόσο, αξίζει να σημειωθεί η μεγάλη μεταβλητότητα μεταξύ των ελάχιστων θεωρητικών τιμών pH, του ορότυπου Typhimurium, και είναι ιδιαίτερα εμφανής στο 25% των μεγαλύτερων τιμών του εύρους.



Γράφημα 18 Γραφική απεικόνιση της διασποράς των ορότυπων των απομονώσεων σε σχέση με το μέγιστο θεωρητικό οριακό pH τους.

Όσον αφορά τις μέγιστες οριακές θεωρητικές τιμές για καλύτερη διατύπωση των αποτελεσμάτων σύμφωνα με το **Γράφημα 18**, θα μπορούσαν να δημιουργηθούν 4 κατηγορίες με διαφορετικά εύρη μέγιστων pH (**A**:8.5-9, **B**:9-9.5, **Γ**:9.5-10, **Δ**:10-10.5). Και σε αυτή την περίπτωση η παραλλακτικότητα μεταξύ των απομονώσεων του ίδιου ορότυπου είναι εμφανής, ενώ αξίζει να σημειωθεί ότι στην κατηγορία Γ εμφανίζουν μέγιστο θεωρητικό pH 3 από τις 4 απομονώσεις Typhimurium και στην κατηγορία Δ οι 2 απομονώσεις Thompson. Επίσης, αξίζει να σημειωθεί σύμφωνα με το **Γράφημα 19** η ιδιαίτερα μεγάλη παραλλακτικότητα των απομονώσεων Infantis ως προς το μέγιστο οριακό θεωρητικό pH καθώς εκτιμάται ότι μπορούν να αναπτυχθούν σε μεγαλύτερο εύρος μέγιστων τιμών pH (8.5-9.8).



Γράφημα 19 Θηκόγραμμα κατανομής των μέγιστων θεωρητικών τιμών pH ανάλογα με τον ορότυπο.

Είναι σημαντικό να αναφέρουμε ότι στην παρούσα μελέτη το πλήθος των δειγμάτων είναι αρκετά περιοριστικό για να δημιουργηθεί μια ολοκληρωμένη εικόνα επικράτησης κάποιου ορότυπου τόσο στις ελάχιστες όσο και στις μέγιστες θεωρητικές τιμές pH.

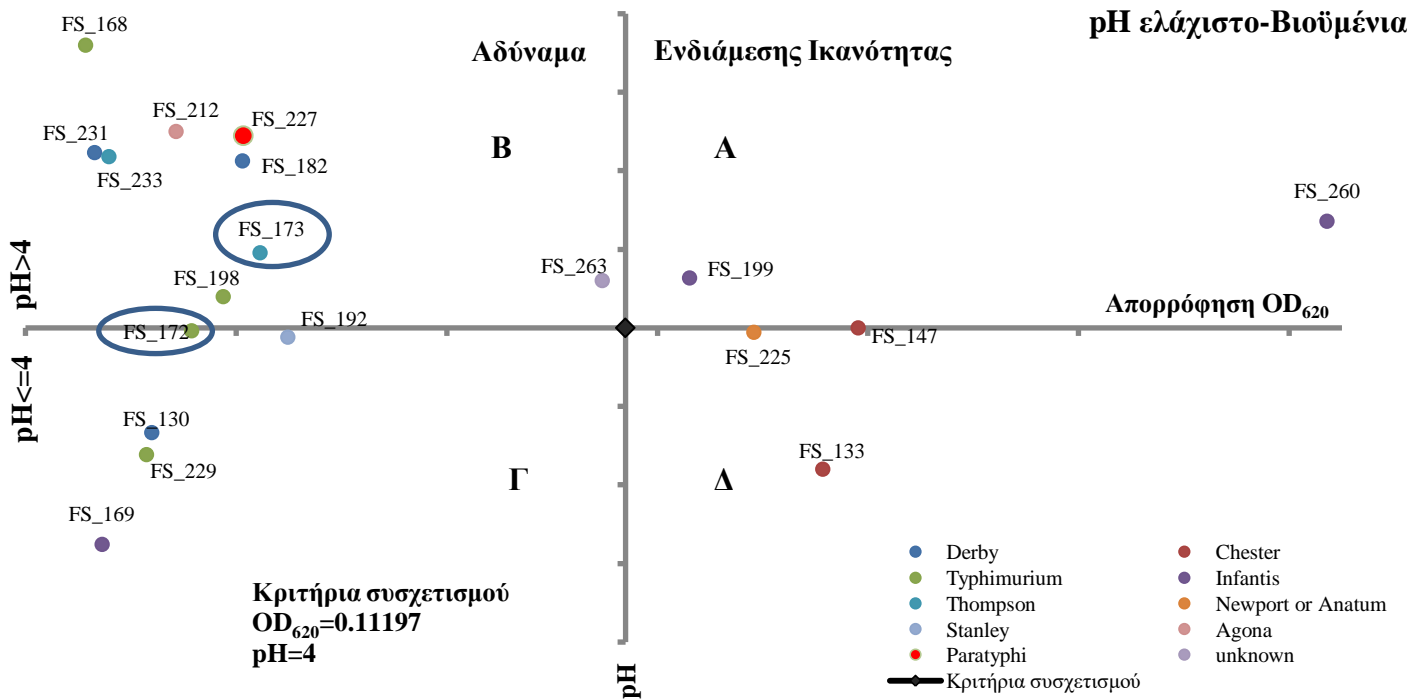
4.4.2 Συσχέτιση των οριακών τιμών pH με την ανάπτυξη βιοϋμενίων και την ανθεκτικότητά τους στα απολυμαντικά

Στη μελέτη αυτή εξετάστηκαν 3 φαινοτυπικές δοκιμές ως προς το μικροοργανισμό *Salmonella* spp. Ο συνδυασμός τους είναι πιθανό να δημιουργήσει ένα φαινοτυπικό μοτίβο για κάθε απομόνωση χρήσιμο για τη βελτίωση του τρόπου αντιμετώπισης του. Για το λόγο αυτό, θα μελετηθεί η πιθανή σχέση μεταξύ της ικανότητας παραγωγής βιοϋμενίων, των MIC στα απολυμαντικά που εξετάστηκαν των 20 απομονώσεων *Salmonella* spp. και της δυνατότητας ανάπτυξής τους σε χαμηλές και υψηλές τιμές pH.

Για την επίτευξη αυτού του στόχου δημιουργήθηκαν τα **Γραφήματα 20** και **21** με μόνη διαφορά την σύγκριση των ελάχιστων οριακών θεωρητικών τιμών pH με τις άλλες δοκιμές στο πρώτο, και τις μέγιστες οριακές τιμές στο δεύτερο.

Στην παρούσα μελέτη ελέγχτηκε η MIC των στελεχών του μικροοργανισμού *Salmonella* spp. σε ένα όξινο (PAA) και ένα βασικό (BC) απολυμαντικό. Το pH του BC κυμαίνεται από 5 έως 8. Έχει αντιμικροβιακή αποτελεσματικότητα σε ένα μεγάλο εύρος pH (pH 4-10) ενώ το υψηλό pH προκαλεί την αρνητική φόρτιση του μικροβιακού κυτταρικού τοιχώματος, ευνοώντας έτσι τη σύνδεση των κατιονικών ειδών (Rowe *et al.*, 2006). Το PAA έχει όξινο pH=2.8 και είναι αποτελεσματικό και σταθερό σε τιμές pH από 1 έως 9, με ελαφρώς αυξημένο ρυθμό υδρόλυσης πάνω από pH 8.3 (Gawande *et al.*, 2013). Αυτά τα δεδομένα λήφθηκαν υπόψιν για τη επιλογή του pH=4 σαν κατώφλι του ελάχιστου pH και του pH=10 σαν κατώφλι του μέγιστου pH.

Παρατηρώντας το Γράφημα 20, είναι εμφανής η παραλλακτικότητα μεταξύ των απομονώσεων ως προς το συνδυασμό των διαφόρων δοκιμών στα οποία τέθηκαν αυτές. Από τις κατηγορίες που προκύπτουν **Πίνακας 19** οι περισσότερες απομονώσεις ανήκουν στην κατηγορία Β, και διαθέτουν μικρή ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίων.



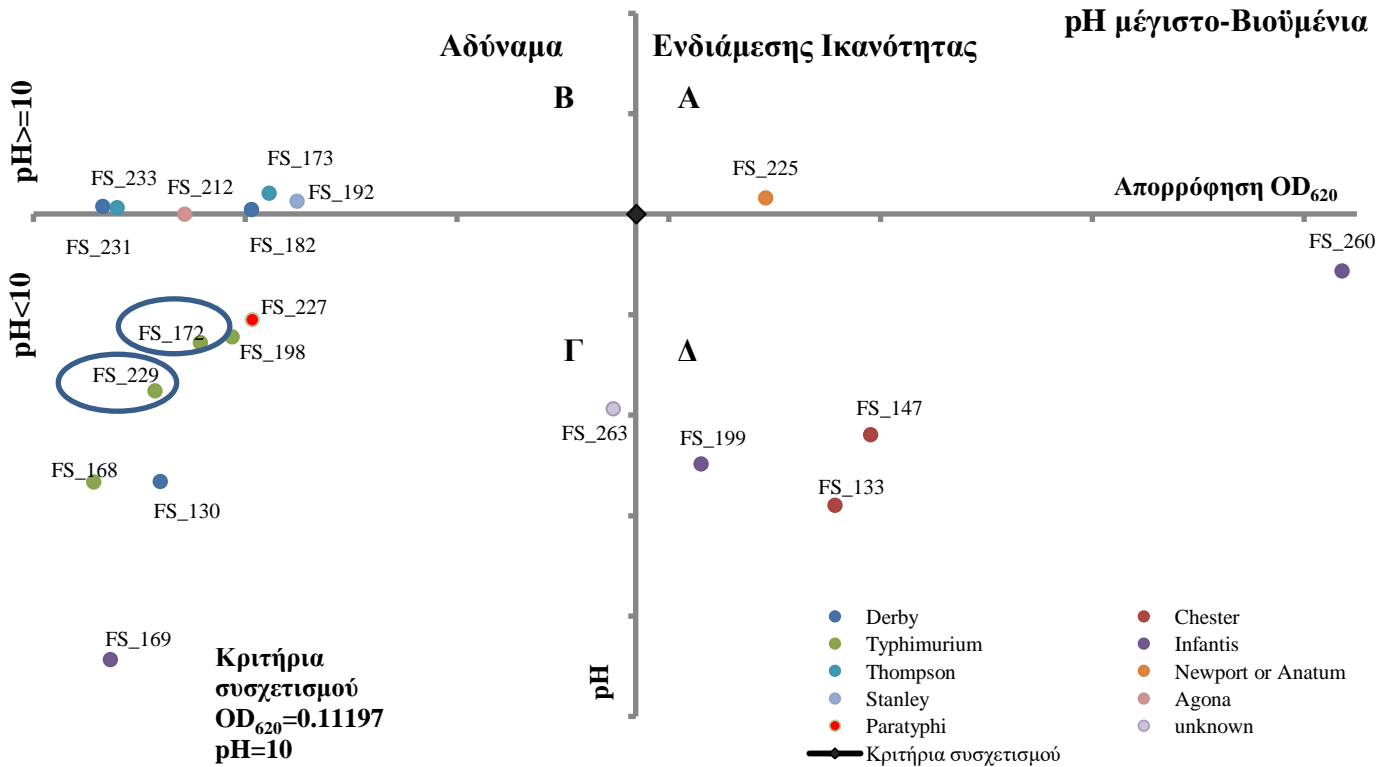
Γράφημα 20 Συσχέτιση μεταξύ των θεωρητικών ελάχιστων τιμών pH, της ικανότητας σχηματισμού βιοϋμενίων και των MIC. Οι απομονώσεις του ίδιου ορότυπου παρουσιάζονται με ίδιο χρώμα. Σε κύκλο παρουσιάζονται τα δυο στελέχη που είχαν την μικρότερη αντοχή στο όξινο απολυμαντικό. Κάθε τεταρτημόριο του διαγράμματος ορίζει μια κατηγορία.

Πίνακας 19 Συνδυασμός αποτελεσμάτων πειραματικών διαδικασιών σε σχέση με το ελάχιστο θεωρητικό pH. Με έντονο μαύρο χρώμα παρουσιάζονται τα δυο στελέχη που είχαν την μικρότερη αντοχή στο όξινο απολυμαντικό.

Κατηγορία	Κριτήρια	Απομονώσεις
A	Ενδιάμεσης ικανότητας, $pH > 4$	199, 260
B	Αδύναμα, $pH > 4$	168, 173 , 182, 198, 212, 227, 231, 233, 263
Γ	Αδύναμα, $pH \leq 4$	130, 169, 172 , 192, 229
Δ	Ενδιάμεσης ικανότητας, $pH \leq 4$	133, 147, 225

Κάτι αντίστοιχο μπορεί να είναι πολύ βοηθητικό και για τις μέγιστες θεωρητικές οριακές τιμές pH, και απολυμαντικά βασικού pH, όπως τις ενώσεις τεταρτοταγούς αμμωνίου (Quats). Έτσι, δημιουργήθηκαν το **Γράφημα 21** και ο **Πίνακας 20**.

Και σε αυτή την περίπτωση είναι εμφανής η παραλλακτικότητα μεταξύ των απομονώσεων ως προς το συνδυασμό των διαφόρων δοκιμών στα οποία τέθηκαν αυτές, ενώ οι περισσότερες απομονώσεις δεν αναπτύσσονται σε pH μεγαλύτερου της τιμής 10 και έχουν μικρή ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίων.



Γράφημα 21 Συσχέτιση μεταξύ των θεωρητικών μέγιστων τιμών pH, της ικανότητας σχηματισμού βιοϋμενίων και των MIC. Οι απομονώσεις του ίδιου ορότυπου παρουσιάζονται με ίδιο χρώμα. Σε κύκλο παρουσιάζονται τα δυο στελέχη που είχαν την μεγαλύτερη αντοχή στο BC. Κάθε τεταρτημόριο του διαγράμματος ορίζει μια κατηγορία.

Πίνακας 20 Συνδυασμός αποτελεσμάτων πειραματικών διαδικασιών σε σχέση με το μέγιστο θεωρητικό pH. Με έντονο μαύρο χρώμα παρουσιάζονται τα δυο στελέχη που είχαν τη μεγαλύτερη αντοχή στο BC.

Κατηγορία	Κριτήρια	Απομονώσεις
A	Ενδιάμεσης ικανότητας, $pH \geq 10$	225
B	Αδύναμα, $pH > 10$	173, 182, 192, 212, 231, 233
Γ	Αδύναμα, $pH \leq 10$	130, 168, 169, 172 , 198, 227, 229 , 263
Δ	Ενδιάμεσης ικανότητας, $pH < 10$	133, 147, 199, 260

Συνοψίζοντας, αξίζει να τονισθεί η ιδιαίτερα μεγάλη παραλλακτικότητα των απομονώσεων σε επίπεδο στελέχους, η οποία αποτελεί σημαντική πρόκληση για τη βιομηχανία τροφίμων καθώς η εμφάνιση πολλών διαφορετικών στελεχών με διαφορετική φαινοτυπική αντίδραση στα διάφορα περιβάλλοντα της βιομηχανίας απαιτεί και τις κατάλληλες πρακτικές εξάλειψής του πιο ανθεκτικού στελέχους και κατά συνέπεια όλων των υπολοίπων.

Συμπεράσματα

Τα βακτήρια *Salmonella* spp. αντιπροσωπεύουν την πιο συνηθισμένη αιτία τροφικής δηλητηρίασης σε πολλές χώρες για τουλάχιστον πάνω από 100 χρόνια. Παρά τις καθιερωμένες οδηγίες και μέτρα για την πρόληψη της, η συχνότητα και η σοβαρότητα της στον άνθρωπο έχει αυξηθεί σημαντικά (Lee *et al.*, 2015). Κρούσματα με πηγή κάποιο τρώσιμο έδειξαν ότι μόλις 1 έως 10 κύτταρα μπορούν να προκαλέσουν σαλμονέλωση στις πιο ευπαθείς σε μόλυνση YOPIs ομάδες (Young, Old, Pregnant, Immunocompromised) (Bhunia, 2008).

Το στέλεχος, οι συνθήκες ανάπτυξης και η έκθεση σε υποθανάτιες καταπονήσεις διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην επιβίωση των παθογόνων και την ανάπτυξη βιοϋμενίων και αποτελούν το επίκεντρο πολλών μελετών (Kadam *et al.*, 2013). Τα στελέχη μπορεί επίσης να διαφέρουν ως προς την ανθεκτικότητα τους στα απολυμαντικά με αποτέλεσμα να καθιστούν ανεπαρκείς τους χειρισμούς ασφαλείας στη βιομηχανία τροφίμων και συνεπώς τη διασπορά ενός εκτεταμένου κινδύνου προς τους καταναλωτές. Οι παραπάνω παράγοντες αποτελούν ζητήματα που ερευνώνται με στόχο την εξάλειψη του μικροοργανισμού μέσω της πρόληψης και της αντιμετώπισής του με τον πιο αποτελεσματικό τρόπο. Η παρούσα μελέτη είχε ως στόχο την έρευνα της συμπεριφοράς απομονώσεων *Salmonella enterica* που προήλθαν από μια ελληνική βιομηχανία προϊόντων κρέατος την τελευταία πενταετία, σε διάφορα περιβάλλοντα με την εφαρμογή φαινοτυπικών δοκιμών, ενώ είχε προηγηθεί ο μοριακός χαρακτηρισμός των απομονώσεων που αναλύθηκαν. Στο πλαίσιο αυτό εξάχθηκαν τα εξής συμπεράσματα:

- * Οι ορότυποι που επικράτησαν τα 5 τελευταία χρόνια στη βιομηχανία τροφίμων ήταν οι *S. Typhimurium*, *S. Infantis*, *S. Derby*, ίδια με εκείνα που αφορούσαν μια μελέτη για την ίδια βιομηχανία αλλά κατά τα χρόνια 2011-2013 (Manios *et al.*, 2015).
- * Τα βακτήρια *Salmonella* spp. προέκυψαν κυρίως από την ανάλυση δειγμάτων κατά τους θερινούς μήνες των 5 χρόνων, πράγμα λογικό λόγω της εύκολης διατάραξης της ψυκτικής αλυσίδας εκείνους τους μήνες
- * Κύρια πηγή απομονώσεων ήταν το χοιρινό κρέας που αποτελεί και το σημαντικότερο είδος κρέατος της διατροφής των Ελλήνων (Mataragas *et al.*, 2008).
- * Καμία απομόνωση δεν χαρακτηρίστηκε ως μη ικανή ως προς την ικανότητα ανάπτυξης βιοϋμενίων, κάτι που προσδίδει σε όλα τα στελέχη μεγαλύτερη

- αντίσταση στην απολύμανση, ανθεκτικότητα στις ανοσολογικές αντιδράσεις καθώς και στις αντιμικροβιακές θεραπείες.
- * Η παραλλακτικότητα των απομονώσεων ως προς την MIC στα απολυμαντικά ήταν πάρα πολύ μικρή, με το BC να είναι αποτελεσματικότερο από το PAA.
 - * Η εκτίμηση θεωρητικών τιμών τόσο για το ελάχιστο όσο και για το μέγιστο οριακό pH μπορεί να αποτελέσουν σημαντική πληροφορία για την αντιμετώπιση του μικροοργανισμού με τα κατάλληλα απολυμαντικά. Επίσης έχουν βιολογική αξία όταν αναφερόμαστε σε τρόφιμα που διαθέτουν τιμές pH κοντινές με τις ακραίες οριακές τιμές του μικροοργανισμού.
 - * Οι απομονώσεις που είχαν μεγαλύτερη αντοχή στο BC ήρθαν σε συμφωνία με το εκτιμώμενο θεωρητικό ελάχιστο οριακό pH που προέκυψε, ενώ συνέβη και το αντίστροφο με το PAA, πράγμα που δείχνει να υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των θεωρητικών τιμών που εκτιμήθηκαν και την αντοχή στα απολυμαντικά.
 - * Η μεγάλη παραλλακτικότητα μεταξύ των στελεχών αποτελεί μια μεγάλη πρόκληση καθώς τα μέτρα εξυγίανσης πρέπει να είναι τόσο αυστηρά ώστε να εξαλειφθεί και ο πιο ανθεκτικός μικροοργανισμός στους συνδυασμούς περιβαλλοντικών συνθηκών.
 - * Στο risk assessment έχει μεγαλύτερη σημασία η διαστελεχιακή προσέγγιση, καθώς απομονώσεις ίδιου οροτύπου παραλλάσσουν μεταξύ τους περισσότερο από ότι απομονώσεις ίδιου στελέχους.

Η παρούσα μελέτη θα μπορούσε να αποτελεί τη βάση για μελλοντική έρευνα με την δημιουργία νέων προσθηκών στη γονιδιακή και φαινοτυπική εικόνα του μικροοργανισμού *Salmonella* spp. για την πρόληψη αλλά και αντιμετώπιση του με κατάλληλες στρατηγικές εξάλειψής του στη βιομηχανία τροφίμων. Πιθανές προσθήκες ή αλλαγές είναι οι εξής:

- * Ανάλυση μεγαλύτερου αριθμού απομονώσεων που θα συμπεριλαμβάνουν αντιπροσωπευτικό δείγμα για κάθε ορότυπο.
- * Χρήση της ERIC-PCR για την ταξινόμηση των απομονώσεων σε επίπεδο στελέχους.
- * Έλεγχος της ικανότητας ανάπτυξης των βιοϋμενίων και σε άλλες επιφάνειες, και ιδιαίτερα εκείνες που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία τροφίμων (π.χ. ανοξείδωτο ατσάλι κλπ).
- * Αξιολόγηση εκτός από την ανθεκτικότητα της πλαγκτονικής μορφής των στελεχών σε απολυμαντικά, και των βιοϋμενικών δομών τους που αποτελούν πιο

ανθεκτικές μορφές και παραμένουν ευκολότερα στις επιφάνειες επεξεργασίας τροφίμων.

- * Αξιολόγηση της ανθεκτικότητας των στελεχών σε αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται στην ιατρική για εύρεση ανθεκτικών στελεχών επικίνδυνων για τη δημόσια υγεία.
- * *In vitro* αξιολόγηση της ικανότητας πρόσδεσης και διείσδυσης σε ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου (Caco-2 cells) για την αξιολόγηση της μολυσματικής ικανότητας των στελεχών.
- * Διερεύνηση οριακών συνθηκών ανάπτυξης σε διάφορες τιμές ενεργότητας ύδατος και θερμοκρασίας των στελεχών και συνδυασμό τους.

Παράρτημα

Πίνακας 21 Λίστα 142 απομονώσεων *Salmonella* spp. που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη και ο μέσος όρος OD₆₂₀ εκείνων που εξετάστηκαν στη δοκιμή ανάπτυξης βιοϋμενίων.

Κατηγορία απομόνωσης	Πηγή απομόνωσης	Ημερομηνία απομόνωσης	Κωδικοποίηση απομόνωσης	Οροτυποποίηση	Δοκιμή Ικανότητας Ανάπτυξης Βιοϋμενίων	Μέσος όρος OD ₆₂₀ Βιοϋμενίων	Δοκιμές Απολυμαντικών & pH
Χοιρινό κρέας	Χοιρινός κιμάς	14/1/2014	FS_123	Typhimurium			
Χοιρινό κρέας	Χοιρινός κιμάς	14/1/2014	FS_124	Typhimurium			
Χοιρινό κρέας	Χοιρινός κιμάς	14/1/2014	FS_125	Typhimurium	√	0.08	
Χοιρινό κρέας	Χοιρινός κιμάς	14/1/2014	FS_126	Typhimurium			
Χοιρινό κρέας	Χοιρινός κιμάς	14/1/2014	FS_127	Typhimurium			
Χοιρινό κρέας	Χοιρινός κιμάς	21/1/2014	FS_128	Typhimurium			
Προϊόντα πουλερικών		12/2/2014	FS_129	Infantis	√	0.36	
Χοιρινό κρέας		10/3/2014	FS_130	Derby	√	0.07	√
Χοιρινό κρέας	Φιλέτο κοτόπουλο	10/3/2014	FS_131	Derby			
Χοιρινό κρέας	Χοιρινός κιμάς	30/4/2014	FS_132	Chester			
Χοιρινό κρέας	Πανσέτα χοιρινή	30/4/2014	FS_133	Chester	√	0.13	√
Χοιρινό κρέας	Σουβλάκι χοιρινό	26/6/2014	FS_134	Typhimurium			
Προϊόντα πουλερικών	Μπούτι κοτόπουλο	8/7/2014	FS_135	Infantis			
Προϊόντα πουλερικών	Φιλέτο κοτόπουλο	8/7/2014	FS_136	unknown			
Βόειο κρέας	Μοσχαρίσιος κιμάς	28/7/2014	FS_137	Derby			
Προϊόντα πουλερικών	Ρολό κοτόπουλο	9/9/2014	FS_138	Infantis			
Προϊόντα πουλερικών	Ρολό κοτόπουλο	29/10/2014	FS_139	Typhimurium	√	0.12	
Χοιρινό κρέας	Χοιρινός κιμάς	4/11/2014	FS_140	unknown			
Χοιρινό κρέας	Ρολό χοιρινό	11/11/2014	FS_141	unknown			
Χοιρινό κρέας	Ρολό χοιρινό	11/11/2014	FS_142	unknown			
Προϊόντα πουλερικών	Κοτόπουλο ολόκληρο	11/11/2014	FS_143	Montevideo			
Χοιρινό κρέας	Μπριζόλα χοιρίδιο	11/12/2014	FS_144	unknown			
Χοιρινό κρέας	Μπριζόλα χοιρίδιο	11/12/2014	FS_145	Typhimurium			

Χοιρινό κρέας	Σπάλα χοιρινή	11/12/2014	FS_146	Typhimurium			
Χοιρινό κρέας	Μπούτι χοιρινό	11/12/2014	FS_147	Chester	√	0.13	√
Χοιρινό κρέας	Χοιρινός κιμάς	7/1/2015	FS_148	Derby			
Χοιρινό κρέας	Ρολό χοιρινό	13/1/2015	FS_149	Infantis			
Προϊόντα πουλερικών	Σουβλάκι κοτόπουλο	13/1/2015	FS_150	Infantis			
Προϊόντα πουλερικών	Γύρος κοτόπουλο	13/1/2015	FS_151	unknown			
Προϊόντα πουλερικών	Φιλέτο στήθος γαλοπούλας	28/1/2015	FS_152	unknown			
Ανάμεικτο κρέας	Ανάμεικτος κιμάς	3/2/2015	FS_153	Berta			
Ανάμεικτο κρέας	Ανάμεικτος κιμάς	3/2/2015	FS_154	Berta			
Ανάμεικτο κρέας	Ανάμεικτος κιμάς	3/2/2015	FS_155	Berta			
Προϊόντα πουλερικών	Κιμάς κοτόπουλο	10/2/2015	FS_156	Infantis			
Προϊόντα πουλερικών	Φτερούγες κοτόπουλο	10/2/2015	FS_157	Infantis			
Χοιρινό κρέας	Λουκάνικο χωριάτικο χοιρινό νωπό	18/2/2015	FS_158	Derby			
Χοιρινό κρέας	Χοιρινός κιμάς	25/2/2015	FS_159	Infantis			
Χοιρινό κρέας	Χοιρινός κιμάς	10/3/2015	FS_160	Derby	√	0.06	
Χοιρινό κρέας	Χοιρινός κιμάς	10/3/2015	FS_161	Derby			
Χοιρινό κρέας	Χοιρινός κιμάς	10/3/2015	FS_162	Derby			
Χοιρινό κρέας	Χοιρινός κιμάς	10/3/2015	FS_163	Derby			
Χοιρινό κρέας	Χοιρινός κιμάς	21/4/2015	FS_164	Typhimurium			
Χοιρινό κρέας	Χοιρινός κιμάς	21/4/2015	FS_165	Typhimurium			
Χοιρινό κρέας	Χοιρινός κιμάς	21/4/2015	FS_166	Typhimurium			
Χοιρινό κρέας	Χοιρινός κιμάς	21/4/2015	FS_167	Typhimurium			
Χοιρινό κρέας	Χοιρινός κιμάς	21/4/2015	FS_168	Typhimurium	√	0.06	√
Χοιρινό κρέας	Σουβλάκι χοιρινό	28/4/2015	FS_169	Infantis	√	0.06	√
Χοιρινό κρέας	Σπάλα χοιρινή	30/4/2015	FS_170	Mbandaka			
Χοιρινό κρέας	Σπάλα χοιρινή	30/4/2015	FS_171	Derby			
Χοιρινό κρέας	Σπάλα χοιρινή	30/4/2015	FS_172	Typhimurium	√	0.07	√
Προϊόντα πουλερικών	Μπούτι κοτόπουλο	5/5/2015	FS_173	Thompson	√	0.08	√
Χοιρινό κρέας	Σπάλα χοιρινή	11/5/2015	FS_174	Derby	√	0.06	
Χοιρινό κρέας	Σπάλα χοιρινή	11/5/2015	FS_175	Derby			
Χοιρινό κρέας	Χοιρινός κιμάς	12/5/2015	FS_176	Typhimurium			
Χοιρινό κρέας	Χοιρινός κιμάς	19/5/2015	FS_177	Typhimurium			

Χοιρινό κρέας	Χοιρινός κιμάς	19/5/2015	FS_178	Typhimurium			
Χοιρινό κρέας	Χοιρινός κιμάς	19/5/2015	FS_179	Typhimurium			
Χοιρινό κρέας	Χοιρινός κιμάς	19/5/2015	FS_180	Typhimurium			
Χοιρινό κρέας	Χοιρινός κιμάς	19/5/2015	FS_181	Typhimurium			
Χοιρινό κρέας	Καθαριδια χοιρινά	26/5/2015	FS_182	Derby	√	0.08	√
Χοιρινό κρέας	Σπάλα χοιρινή	2/6/2015	FS_183	unknown			
Χοιρινό κρέας	Σπάλα χοιρινή	2/6/2015	FS_184	Typhimurium			
Χοιρινό κρέας	Μπούτι χοιρινό	2/6/2015	FS_185	unknown			
Χοιρινό κρέας	Μπούτι χοιρινό	2/6/2015	FS_186	Mbandaka			
Προϊόντα πουλερικών	Μπούτι κοτόπουλο	2/6/2015	FS_187	Infantis			
Προϊόντα πουλερικών	Μηρός κοτόπουλο	2/6/2015	FS_188	Infantis	√	0.53	
Προϊόντα πουλερικών	Στήθος κοτόπουλο	2/6/2015	FS_189	Infantis			
Προϊόντα πουλερικών	Κοτόπουλο ολόκληρο	2/6/2015	FS_190	Infantis			
Χοιρινό κρέας	Κεφτεδάκια χοιρινά	3/6/2015	FS_191	Derby	√	0.07	
Χοιρινό κρέας	Trimmings χοιρινά	8/6/2015	FS_192	Stanley	√	0.08	√
Χοιρινό κρέας	Trimmings χοιρινά	8/6/2015	FS_193	Stanley			
Χοιρινό κρέας	Trimmings χοιρινά	8/6/2015	FS_194	Typhimurium			
Προϊόντα πουλερικών	Στήθος κοτόπουλο	9/6/2015	FS_195	Enteritidis			
Προϊόντα πουλερικών	Κοτόπουλο ολόκληρο	9/6/2015	FS_196	Infantis			
Προϊόντα πουλερικών	Κοτόπουλο ολόκληρο	17/6/2015	FS_197	Infantis	√	0.07	
Χοιρινό κρέας	Χοιρινός κιμάς	23/6/2015	FS_198	Typhimurium	√	0.07	√
Προϊόντα πουλερικών	Γύρος κοτόπουλο	23/6/2015	FS_199	Infantis	√	0.12	√
Προϊόντα πουλερικών	Ρολό κοτόπουλο	23/6/2015	FS_200	Infantis			
Χοιρινό κρέας	Ρολό χοιρινό	7/7/2015	FS_201	unknown			
Χοιρινό κρέας	Χοιρινός κιμάς	29/9/2015	FS_202	Typhimurium			
Χοιρινό κρέας	Χοιρινός κιμάς	29/9/2015	FS_203	Infantis			
Χοιρινό κρέας	Χοιρινός κιμάς	20/10/2015	FS_204	Typhimurium			
Χοιρινό κρέας	Χοιρινός κιμάς	10/11/2015	FS_205	Typhimurium			
Χοιρινό κρέας	Χοιρινός κιμάς	10/11/2015	FS_206	Typhimurium			
Χοιρινό κρέας	Χοιρινός κιμάς	10/11/2015	FS_207	Typhimurium			
Προϊόντα πουλερικών	Ρολό κοτόπουλο	24/11/2015	FS_208	Hadar			
Χοιρινό κρέας	Α' ύλη χοιρινό κρέας	24/11/2015	FS_209	Typhimurium			

Χοιρινό κρέας	Α' ύλη χοιρινό κρέας	24/11/2015	FS_210	Typhimurium			
Προϊόντα πουλερικών	Κιμάς κοτόπουλο	1/12/2015	FS_211	unknown			
Χοιρινό κρέας	Γύρος χοιρινός	8/12/2015	FS_212	Agona	√	0.07	√
Προϊόντα πουλερικών	Ρολό κοτόπουλο μαρ/νο	8/12/2015	FS_213	Infantis			
Ανάμεικτο κρέας	Ανάμεικτος κιμάς	21/12/2015	FS_214	Newport or Anatum			
Χοιρινό κρέας	Χοιρινός κιμάς	21/12/2015	FS_215	Newport or Anatum			
Χοιρινό κρέας	Χοιρινός κιμάς	21/12/2015	FS_216	Newport or Anatum			
Χοιρινό κρέας	Χοιρινός κιμάς	21/12/2015	FS_217	Newport or Anatum			
Χοιρινό κρέας	Χοιρινός κιμάς	21/12/2015	FS_218	Newport or Anatum			
Χοιρινό κρέας	Χοιρινός κιμάς	19/1/2016	FS_219	Derby			
Χοιρινό κρέας	Σουβλάκι χοιρινό	19/1/2016	FS_220	Infantis			
Χοιρινό κρέας	Χοιρινός κιμάς	9/2/2016	FS_221	Infantis			
Χοιρινό κρέας	Χοιρινός κιμάς	9/2/2016	FS_222	Infantis			
Χοιρινό κρέας	Χοιρινός κιμάς	16/2/2016	FS_223	Typhimurium			
Χοιρινό κρέας	Χοιρινός κιμάς	16/2/2016	FS_224	Typhimurium			
Προϊόντα πουλερικών	Φιλέτο στήθος γαλοπούλας	16/2/2016	FS_225	Newport or Anatum	√	0.12	√
Προϊόντα πουλερικών	Μπούτι κοτόπουλο	1/3/2016	FS_226	unknown			
Βόειο κρέας	Τας κερπάπ βόειο	12/4/2016	FS_227	Paratyphi	√	0.08	√
Ανάμεικτο κρέας	Ανάμεικτος κιμάς	10/5/2016	FS_228	Derby			
Βόειο κρέας	Μοσχαρίσιος κιμάς	10/5/2016	FS_229	Typhimurium	√	0.07	√
Χοιρινό κρέας	Λουκάνικο χωριάτικο χοιρινό νωπό	10/5/2016	FS_230	Typhimurium			
Χοιρινό κρέας	Χοιρινός κιμάς	24/5/2016	FS_231	Derby	√	0.06	√
Χοιρινό κρέας	Χοιρινός κιμάς	24/5/2016	FS_232	unknown			
Χοιρινό κρέας	Χοιρινός κιμάς	14/6/2016	FS_233	Thompson	√	0.06	√
Χοιρινό κρέας	Χοιρινός κιμάς	14/6/2016	FS_234	Derby			
Χοιρινό κρέας	Γύρος χοιρινός	21/6/2016	FS_235	Thompson			
Χοιρινό κρέας	Ρολό χοιρινό	21/6/2016	FS_236	Thompson			
Χοιρινό κρέας	Κεφτεδάκια χοιρινά	19/7/2016	FS_237	unknown			
Χοιρινό κρέας	Λουκάνικο χωριάτικο χοιρινό καπνιστό ψημένο	19/7/2016	FS_238	unknown			
Χοιρινό κρέας	Σουβλάκι χοιρινό	6/9/2016	FS_239	Typhimurium	√	0.07	
Χοιρινό κρέας	Γύρος χοιρινός	20/9/2016	FS_240	Muenchen			

Προϊόντα πουλερικών	Γύρος κοτόπουλο	20/9/2016	FS_241	Infantis			
Προϊόντα πουλερικών	Ρολό κοτόπουλο	27/9/2016	FS_242	Infantis	√	0.12	√
Χοιρινό κρέας	Σουβλάκι χοιρινό	19/10/2016	FS_243	Infantis			
Προϊόντα πουλερικών	Ρολό κοτόπουλο	19/10/2016	FS_244	Infantis			
Προϊόντα πουλερικών	Κοτόπουλο ολόκληρο	19/10/2016	FS_245	Infantis			
Ανάμεικτο κρέας	Ανάμεικτος κιμάς	25/10/2016	FS_246	Derby			
Χοιρινό κρέας	Γύρος χοιρινός	1/11/2016	FS_247	Typhimurium			
Προϊόντα πουλερικών	Σουβλάκι κοτόπουλο	2/11/2016	FS_248	unknown			
Προϊόντα πουλερικών	Γύρος κοτόπουλο	2/11/2016	FS_249	unknown			
Προϊόντα πουλερικών	Ρολό κοτόπουλο	2/11/2016	FS_250	Infantis			
Χοιρινό κρέας	Χοιρινός κιμάς	15/11/2016	FS_251	Typhimurium			
Προϊόντα πουλερικών	Ρολό κοτόπουλο	22/11/2016	FS_252	Thompson	√	0.08	
Προϊόντα πουλερικών	Κοτόπουλο ολόκληρο	22/11/2016	FS_253	Infantis			
Χοιρινό κρέας	Χοιρινός κιμάς	17/1/2017	FS_254	Typhimurium			
Χοιρινό κρέας	Χοιρινός κιμάς	17/1/2017	FS_255	Typhimurium			
Προϊόντα πουλερικών	Γύρος κοτόπουλο	4/7/2017	FS_256	unknown			
Βόειο κρέας	Βόειος κιμάς	12/9/2017	FS_257	Derby	√	0.06	
Χοιρινό κρέας	Γύρος χοιρινός	19/6/2018	FS_258	Paratyphi	√	0.08	
Χοιρινό κρέας	Σπάλα χοιρινή	19/6/2018	FS_259	Paratyphi			
Προϊόντα πουλερικών	Μπιφτέκι γαλοπούλας		FS_260	Infantis	√	0.18	√
Ανάμεικτο κρέας	Ανοξείδωτο χοάνης από το γεμιστικό		FS_261	unknown	√	0.07	
Ανάμεικτο κρέας	Γεμισμένο λουκάνικο Φρανκφούρτης		FS_262	unknown	√	0.08	
Προϊόντα πουλερικών	Μηχανικά διαχωρισμένο κρέας πουλερικών		FS_263	unknown	√	0.11	√
Ανάμεικτο κρέας	Γεμισμένο Λουκάνικο Φρανκφούρτης		FS_264	unknown	√	0.08	

Πίνακας 22 Δοκιμή εύρεσης MIC στο απολυμαντικό PAA και καταγραφές των OD₆₂₀ μετά την αφαίρεση των αρνητικών μαρτύρων.

Απομόνωση	Πηγή απομόνωσης	Ορότυπος	MIC PAA (ppm)	OD ₆₂₀ 130 ppm	OD ₆₂₀ 115 ppm	OD ₆₂₀ 100 ppm	St dev 130 ppm	St dev 115 ppm	St dev 100 ppm
FS_130	Χοιρινό κρέας	Derby	115	0.0045	0.0195	0.67525	0.009256	0.028148	0.023013
FS_133	Χοιρινό κρέας	Chester	130	0.00625	0.1875	0.7455	0.00957	0.096887	0.021733
FS_147	Χοιρινό κρέας	Chester	115	0.005	0.00775	0.3535	0.014445	0.012527	0.242548
FS_168	Χοιρινό κρέας	Typhimurium	115	0.0075	0.01125	0.586	0.010408	0.011899	0.058691
FS_169	Χοιρινό κρέας	Infantis	115	0.00775	0.0115	0.7225	0.011266	0.012871	0.069438
FS_172	Χοιρινό κρέας	Typhimurium	130	0.00625	0.1025	0.77525	0.010751	0.125354	0.069216
FS_173	Προϊόντα πουλερικών	Thompson	115	0.004	0.00725	0.78875	0.013342	0.013022	0.03088
FS_182	Χοιρινό κρέας	Derby	115	0.00725	0.012	0.68575	0.011383	0.012138	0.034297
FS_192	Χοιρινό κρέας	Stanley	115	0.005	0.00725	0.4575	0.014445	0.014175	0.290895
FS_198	Χοιρινό κρέας	Typhimurium	115	0.00475	0.0065	0.45675	0.013598	0.01464	0.233576
FS_199	Προϊόντα πουλερικών	Infantis	115	0.0045	0.00675	0.60875	0.012152	0.014151	0.062511
FS_212	Χοιρινό κρέας	Agona	115	0.004	0.008	0.09575	0.012702	0.014095	0.110249
FS_225	Προϊόντα πουλερικών	Newport or Anatum	115	0.0035	0.006	0.37575	0.012152	0.012728	0.215437
FS_227	Βόειο κρέας	Paratyphi	115	0.0035	0.00625	0.5825	0.012152	0.012447	0.086134
FS_229	Βόειο κρέας	Typhimurium	115	0.00875	0.007	0.248	0.01242	0.013904	0.243201
FS_231	Χοιρινό κρέας	Derby	115	0.00575	0.00775	0.312	0.015305	0.013672	0.316053
FS_233	Χοιρινό κρέας	Thompson	115	0.00525	0.00725	0.272	0.014198	0.014198	0.309274
FS_242	Προϊόντα πουλερικών	Infantis	115	0.005	0.009	0.68525	0.013952	0.014048	0.079046
FS_260	Προϊόντα πουλερικών	Infantis	115	0.007	0.008	0.7405	0.008124	0.01052	0.022249
FS_263	Προϊόντα πουλερικών	unknown	115	0.0045	0.00675	0.582	0.010472	0.011383	0.392847

Πίνακας 23 Δοκιμή εύρεσης MIC στο απολυμαντικό BC και καταγραφές των OD₆₂₀ μετά την αφαίρεση των αρνητικών μαρτύρων.

Απομόνωση	Πηγή απομόνωσης	Ορότυπος	MIC BC (ppm)	OD ₆₂₀ 29 ppm	OD ₆₂₀ 23 ppm	OD ₆₂₀ 17 ppm	St dev 29 ppm	St dev 23 ppm	St dev 17 ppm
FS_130	Χοιρινό κρέας	Derby	30	0.01475	0.27725	0.7	0.008057	0.244248	0.016391
FS_133	Χοιρινό κρέας	Chester	30	0.0155	0.41175	0.977	0.009256	0.034082	0.031123
FS_147	Χοιρινό κρέας	Chester	30	0.015	0.61275	0.98	0.006928	0.294152	0.028249
FS_168	Χοιρινό κρέας	Typhimurium	30	0.016	0.12925	0.67125	0.009832	0.223348	0.006652
FS_169	Χοιρινό κρέας	Infantis	30	0.01475	0.25575	0.72725	0.010178	0.286072	0.010145
FS_172	Χοιρινό κρέας	Typhimurium	24	0.01475	0.01325	0.801	0.010689	0.01021	0.04784
FS_173	Προϊόντα πουλερικών	Thompson	30	0.0145	0.717	1.016	0.006403	0.103438	0.013976
FS_182	Χοιρινό κρέας	Derby	30	0.01525	0.263	0.7825	0.010874	0.219941	0.025788
FS_192	Χοιρινό κρέας	Stanley	30	0.01275	0.406	0.841333	0.006946	0.345246	0.050243
FS_198	Χοιρινό κρέας	Typhimurium	30	0.0145	0.21025	0.84025	0.007506	0.19949	0.041387
FS_199	Προϊόντα πουλερικών	Infantis	30	0.0155	0.30775	0.7195	0.008699	0.32421	0.027258
FS_212	Χοιρινό κρέας	Agona	30	0.01525	0.074	0.6395	0.009032	0.118861	0.018628
FS_225	Προϊόντα πουλερικών	Newport or Anatum	30	0.01475	0.0685	0.76225	0.00957	0.062019	0.011354
FS_227	Βόειο κρέας	Paratyphi	30	0.02	0.52225	0.982	0.011358	0.126141	0.035917
FS_229	Βόειο κρέας	Typhimurium	24	0.015	0.023	0.415	0.009832	0.0151	0.111247
FS_231	Χοιρινό κρέας	Derby	30	0.01475	0.20475	0.75925	0.010112	0.215404	0.044048
FS_233	Χοιρινό κρέας	Thompson	30	0.0145	0.36725	0.7025	0.008851	0.217649	0.023812
FS_242	Προϊόντα πουλερικών	Infantis	30	0.01475	0.569	0.78575	0.010689	0.045453	0.024918
FS_260	Προϊόντα πουλερικών	Infantis	30	0.01833	0.328	0.76225	0.008963	0.316035	0.023171
				3					
FS_263	Προϊόντα πουλερικών	unknown	30	0.0155	0.3295	0.77075	0.009256	0.36148	0.044739

Πίνακας 24 Εκτιμήσεις μέγιστων, ελάχιστων και βέλτιστων οριακών θεωρητικών τιμών για κάθε απομόνωση σύμφωνα με το μοντέλο του Rosso.

Απομόνωση	Ορότυπος	pH min	Standard error	95% έμπιστοσύνης		pH max	Standard error	95% έμπιστοσύνης		pH opt	Standard error	95% έμπιστοσύνης		R-Squared	RMSE	μmax opt	Standard error
				Χαμηλό-τερο	Υψηλό-τερο			Χαμηλό-τερο	Υψηλό-τερο			Χαμηλό-τερο	Υψηλό-τερο				
FS_130	Derby	3.73	0.54	2.58	4.89	9.47	0.69	8.01	10.93	7.23	0.11	6.99	7.46	0.912	0.091	0.993	0.046
FS_133	Chester	3.64	0.54	2.49	4.79	9.42	0.78	7.75	11.09	7.35	0.11	7.11	7.59	0.921	0.086	0.962	0.046
FS_147	Chester	4.00	0.35	3.27	4.73	9.56	0.29	8.96	10.17	7.06	0.08	6.88	7.23	0.954	0.063	0.895	0.024
FS_168	Typhimurium	4.72	0.16	4.38	5.06	9.47	0.25	8.93	10.01	7.06	0.09	6.87	7.26	0.950	0.069	0.956	0.027
FS_169	Infantis	3.45	0.49	2.40	4.50	9.11	0.54	7.95	10.27	7.37	0.12	7.10	7.64	0.913	0.098	1.044	0.060
FS_172	Typhimurium	3.99	0.44	3.05	4.94	9.74	0.48	8.72	10.77	7.20	0.12	6.95	7.46	0.910	0.075	0.824	0.026
FS_173	Thompson	4.19	0.70	2.70	5.68	10.04	0.30	9.40	10.68	7.19	0.08	7.01	7.36	0.968	0.046	0.882	0.021
FS_182	Derby	4.43	0.81	2.69	6.16	10.01	0.40	9.15	10.86	7.19	0.12	6.94	7.45	0.932	0.067	0.844	0.025
FS_192	Stanley	3.98	0.54	2.81	5.14	10.03	0.43	9.11	10.94	7.20	0.11	6.97	7.43	0.945	0.058	0.872	0.025
FS_198	Typhimurium	4.08	0.74	2.51	5.65	9.76	0.36	9.00	10.51	7.04	0.10	6.83	7.24	0.923	0.075	0.922	0.020
FS_199	Infantis	4.13	0.31	3.46	4.79	9.50	0.36	8.73	10.27	7.18	0.10	6.97	7.39	0.924	0.078	0.878	0.022
FS_212	Agona	4.50	0.43	3.57	5.43	10.00	0.44	9.04	10.96	7.20	0.14	6.90	7.50	0.911	0.081	0.908	0.037
FS_225	Newport or Anatum	3.99	0.60	2.72	5.26	10.03	0.44	9.09	10.97	7.19	0.11	6.96	7.42	0.940	0.055	0.782	0.017
FS_227	Paratyphi	4.49	0.48	3.47	5.51	9.79	0.34	9.07	10.51	7.11	0.09	6.92	7.29	0.949	0.069	1.000	0.029
FS_229	Typhimurium	3.68	0.41	2.80	4.56	9.65	0.57	8.45	10.85	7.40	0.12	7.15	7.65	0.933	0.054	0.677	0.028
FS_231	Derby	4.45	0.44	3.52	5.37	10.02	0.35	9.28	10.75	7.19	0.10	6.97	7.41	0.934	0.061	0.883	0.031
FS_233	Thompson	4.44	0.61	3.12	5.75	10.01	0.39	9.18	10.85	7.19	0.12	6.94	7.44	0.932	0.064	0.826	0.045
FS_242	Infantis	3.17	0.58	1.92	4.41	8.51	0.40	7.65	9.36	7.35	0.15	7.04	7.66	0.896	0.102	1.032	0.071
FS_260	Infantis	4.27	0.41	3.40	5.15	9.89	0.47	8.89	10.88	7.24	0.10	7.02	7.45	0.956	0.060	0.871	0.026
FS_263	unknown	4.12	0.43	3.20	5.04	9.61	0.27	9.04	10.18	7.02	0.08	6.86	7.19	0.936	0.060	0.866	0.026
min		3.17				8.51				7.00				0.896	0.046	0.677	
max		4.72				10.04				7.40				0.968	0.102	1.044	

Βιβλιογραφία

- Abdallah, M., Benoiel, C., Drider, D., Dhulster, P., & Chihib, n. e. (2014). Biofilm formation and persistence on abiotic surfaces in the context of food and medical environments. *Archives of microbiology*, 196. doi: 10.1007/s00203-014-0983-1
- Abee, T., & Wouters, J. A. (1999). Microbial stress response in minimal processing. *Int J Food Microbiol*, 50(1), 65-91. doi: [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(99\)00078-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(99)00078-1)
- Achinas, S., Charalampogiannis, N., & Euverink, G. J. W. (2019). A brief recap of microbial adhesion and biofilms *Applied Sciences* (Vol. 9): MDPI AG.
- Addis, M. (2015). Major Causes Of Meat Spoilage and Preservation Techniques: A Review. [Food Science and Quality Management]. *IISTE*, 41, 101-114.
- Agarwal, R., Singh, S., Bhilegaonkar, K. N., & Singh, V. (2011). Optimization of microtitre plate assay for the testing of biofilm formation ability in different Salmonella serotypes. *International Food Research Journal*, 18, 1493-1498.
- Akbaş, M. Y. (2015). *Bacterial biofilms and their new control strategies in food industry. The Battle Against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances and Educational Programs.*
- Álvarez-Ordóñez, A., Prieto, M., Bernardo, A., Hill, C., & López, M. (2012). The Acid Tolerance Response of Salmonella spp.: An adaptive strategy to survive in stressful environments prevailing in foods and the host. *Food Research International*, 45(2), 482-492. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.04.002>
- Andino, A., & Hanning, I. (2015). “Salmonella enterica: Survival, Colonization, and Virulence Differences among Serovars”. *The Scientific World Journal*, vol. 2015, Article ID 520179, 16 pages.
- Augustin, J.-C., & Carlier, V. (2000a). Mathematical modelling of the growth rate and lag time for *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol*, 56(1), 29-51. doi: [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00223-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00223-3)
- Augustin, J.-C., & Carlier, V. (2000b). Modelling the growth rate of *Listeria monocytogenes* with a multiplicative type model including interactions between environmental factors. *Int J Food Microbiol*, 56(1), 53-70. doi: [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00224-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00224-5)
- Azeredo, J., Azevedo, N. F., Briandet, R., Cerca, N., Coenye, T., Costa, A. R., *et al.* (2017). Critical review on biofilm methods. *Critical Reviews in Microbiology*, 43(3), 313-351. doi: 10.1080/1040841x.2016.1208146
- Baldry, M. G. C. (1983). The bactericidal, fungicidal and sporicidal properties of hydrogen peroxide and peracetic acid. *Journal of Applied Bacteriology*, 54(3), 417-423. doi: 10.1111/j.1365-2672.1983.tb02637.x
- Barco, L., Barrucci, F., Olsen, J. E., & Ricci, A. (2013). Salmonella source attribution based on microbial subtyping. *Int J Food Microbiol*, 163(2), 193-203. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.03.005>
- Barco, L., Lettini, A. A., Ramon, E., Longo, A., Saccardin, C., Pozza, M. C. D., *et al.* (2011). A rapid and sensitive method to identify and differentiate Salmonella enterica serotype Typhimurium and Salmonella enterica serotype 4,[5],12:i:- by combining traditional serotyping and multiplex polymerase chain reaction. *Foodborne pathogens and disease*, 8(6), 741-743. doi: 10.1089/fpd.2010.0776
- Beales, N. (2004). Adaptation of Microorganisms to Cold Temperatures, Weak Acid Preservatives, Low pH, and Osmotic Stress: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 3, 1-20. doi: 10.1111/j.1541-4337.2004.tb00057.x
- Beaubrun, J.-G. J., Cheng, C.-M., Chen, K.-S., Ewing, L., Wang, H., Agpaoa, M. C., *et al.* (2012). The evaluation of a PCR-based method for identification of Salmonella

- enterica serotypes from environmental samples and various food matrices. *Food Microbiol*, 31(2), 199-209. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.03.016>
- Bell, C., & Kyriakides, A. (2009). 18 - Salmonella. In C. d. W. Blackburn & P. J. McClure (Eds.), *Foodborne Pathogens (Second Edition)* (pp. 627-674): Woodhead Publishing.
- Bethesda. (2019). "Salmonella". NCBI taxonomy, MD: National Center for Biotechnology Information Retrieved 20 September 2019, from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Tree&id=590&lvl=3&keep=1&srchmode=1&unlock>
- Bhunia, A. K. (2008). *Foodborne microbial pathogens: Mechanisms and pathogenesis.* , .
- Bioscreen. (2009). User's Manual Bioscreen C Version 2.1.5. from <http://www.mbio.ncsu.edu/MB360/BioscreenUserManual0%20111.pdf>
- Bispo, P. J. M., Haas, W., & Gilmore, M. S. (2015). Biofilms in infections of the eye. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 4(1), 111-136. doi: 10.3390/pathogens4010111
- Blaser, M. J., & Newman, L. S. (1982). A review of human salmonellosis. I. Infective dose. *Rev. Infect. Dis*, 4, , 1096-1106.
- Blazheyevskiy, M., & Kovalska, O. (2017). A NOVEL COLORIMETRIC BIOSENSOR FOR DETERMINATION OF CATIONIC SURFACTANTS. *GISAP:Physics, Mathematics and Chemistry*. doi: 10.18007/gisap:pmc.v0i8.1550
- Borges, A., Abreu, A., Malheiro, J. F., Saavedra, M., & Simões, M. (2013). Biofilm prevention and control by dietary phytochemicals (pp. 32-41).
- Brenner, F. W., Villar, R. G., Angulo, F. J., Tauxe, R., & Swaminathan, B. (2000). Salmonella nomenclature. *Journal of clinical microbiology*, 38(7), 2465-2467.
- CDC. (2008). Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities, 2019, from <https://www.cdc.gov/infectioncontrol/guidelines/disinfection/disinfection-methods/chemical.html#>
- CDC. (2019). *Salmonella*, from <https://www.cdc.gov/salmonella/index.html>
- Chauret, C. (2014). Sanitization (pp. 360-364).
- Chen, Z. (2017). Stress Responses of Foodborne Pathogens and Implications in Food Safety. *Journal of Food: Microbiology, Safety & Hygiene*, 02. doi: 10.4172/2476-2059.1000e103
- Chia, T. W. R., Goulter, R. M., McMeehin, T., Dykes, G. A., & Fegan, N. (2009). Attachment of different Salmonella serovars to materials commonly used in a poultry processing plant. *Food Microbiol*, 26(8), 853-859. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.05.012>
- Coburn, B., Grassl, G. A., & Finlay, B. B. (2007). Salmonella, the host and disease: a brief review. *Immunology & Cell Biology*, 85(2), 112-118. doi: 10.1038/sj.icb.7100007
- Codex Alimentarius. (1993a). Draft revised code of hygienic practice for fresh meat. . In: *Report of the 7th Session of the Codex Committee on Meat Hygiene Alinorm 93/16A*, Codex Alimentarius Commission, FAO, Rome, pp. 32-57
- Codex Alimentarius. (1997). Hazard analysis and critical control point (HACCP) system and guidelines for its application. *Joint FAO/WHO Food Standards Program*.
- Dalgaard, P., & Koutsoumanis, K. (2001). Comparison of maximum specific growth rates and lag times estimated from absorbance and viable count data by different mathematical models. *Journal of Microbiological Methods*, 43(3), 183-196. doi: [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(00\)00219-0](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(00)00219-0)
- Doijad, S. P., Barbuddhe, S. B., Garg, S., Poharkar, K. V., Kalorey, D. R., Kurkure, N. V., *et al.* (2015). Biofilm-Forming Abilities of *Listeria monocytogenes* Serotypes Isolated from Different Sources. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *PLoS One*, 10(9), e0137046. doi: 10.1371/journal.pone.0137046

- Dong, H., Peng, D., Jiao, X., Zhang, X., Geng, S., & Liu, X. (2011). Roles of the spiA gene from *Salmonella enteritidis* in biofilm formation and virulence. *Microbiology (Reading, England)*, 157(Pt 6), 1798-1805. doi: 10.1099/mic.0.046185-0
- Donlan, R. M. (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging infectious diseases*, 8(9), 881-890. doi: 10.3201/eid0809.020063
- Donlan, R. M., & Costerton, J. W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical microbiology reviews*, 15(2), 167-193. doi: 10.1128/cmr.15.2.167-193.2002
- EFSA, & ECDC. (2018). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. *EFSA Journal*, 16(12), e05500. doi: 10.2903/j.efsa.2018.5500
- Evangelopoulou, G. (2010). *A concise history of Salmonella spp. nomenclature Evangelopoulou G. D., DVM1, Burriel A., DVM, MSc, MSc, PhD2, Spyrou V., DVM, PhD3.*
- Faille, C. (2002). Adhesion of *Bacillus* spores and *Escherichia coli* cells to inert surfaces: role of surface hydrophobicity. *Can J Microbiol*, v. 48(no. 8), pp. 728-738-2002 v.2048 no.2008. doi: 10.1139/w02-063
- FAO. (2014). Food and Agriculture Organization of the United Nations. Διαθέσιμο <http://www.fao.org/ag/againfo/home/en/index.html> (προσπελάστηκε 06.08.18)
- Fazlara, A., & Ekhtelat, M. (2012). The disinfectant effects of benzalkonium chloride on some important foodborne pathogens. *Am Eurasian J Agric Environ Sci*, 12, 23-29.
- Fletcher, D. L. (2002). Poultry meat quality. 58, 131-145. doi: 10.1079/wps20020013
- Fletcher, M. (1988). Attachment of *Pseudomonas fluorescens* to glass and influence of electrolytes on bacterium-substratum separation distance. *Journal of Bacteriology*, 170:2027-2030.
- Foster, J. W., & Hall, H. K. (1990). Adaptive acidification tolerance response of *Salmonella typhimurium*. *Journal of bacteriology*, 172(2), 771-778. doi: 10.1128/jb.172.2.771-778.1990
- FP™, P. S. (2019). PEROXYACETIC ACID SOLUTION, from https://www.spartanchemical.com/globalassets/sharepoint/product-literature--documentation--epidocuments/product-literature/13139_paa_sanitizer_fp.pdf
- Gandhi, M., & Chikindas, M. L. (2007). *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive: Review. *International Journal of Food Microbiology*, 113: , 1-15.
- Gawande, H., Dhotre, A., M, S., & M, K. (2013). Peroxyacetic Acid : A Potent Food Industry Sanitizer. 32, 26-30.
- Gómez, N. C., Ramiro, J. M. P., Quecan, B. X. V., & de Melo Franco, B. D. G. (2016). Use of Potential Probiotic Lactic Acid Bacteria (LAB) Biofilms for the Control of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium*, and *Escherichia coli* O157:H7 Biofilms Formation. [Original Research]. *Frontiers in Microbiology*, 7(863). doi: 10.3389/fmicb.2016.00863
- Gould, W. A. (1994). *Current good manufacturing practices: Food Plant Sanitation*. (Vol. 2nd edn). CTI Publications Inc., Baltimore
- Graziani, C., Losasso, C., Luzzi, I., Ricci, A., Scavia, G., & Pasquali, P. (2017). Chapter 5 - *Salmonella*. In C. E. R. Dodd, T. Aldsworth, R. A. Stein, D. O. Cliver & H. P. Riemann (Eds.), *Foodborne Diseases (Third Edition)* (pp. 133-169): Academic Press.
- Greenacre, E. J., Brocklehurst, T. F., Waspe, C. R., Wilson, D. R., & Wilson, P. D. G. (2003). *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Listeria monocytogenes* acid tolerance response induced by organic acids at 20 degrees C: optimization and modeling. *Appl Environ Microbiol*, 69(7), 3945-3951. doi: 10.1128/aem.69.7.3945-3951.2003

- Grimont, P., & Weill, F.-X. (2007). *Antigenic Formulae of the Salmonella serovars*, (9th ed.) Paris: WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella. *Institute Pasteur.*, 1-166.
- Hensel, M. (2004). Evolution of pathogenicity islands of *Salmonella enterica*. *International Journal of Medical Microbiology*, 294(2), 95-102. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2004.06.025>
- Herald, P., & Zottola, E. (1988). Scanning electron microscopic examination of *Yersinia enterocolitica* attached to stainless steel at elevated temperature and pH value. *Journal of Food Science*, 51: 445-448.
- Hoffman, M. D., Zucker, L. I., Brown, P. J. B., Kysela, D. T., Brun, Y. V., & Jacobson, S. C. (2015). Timescales and Frequencies of Reversible and Irreversible Adhesion Events of Single Bacterial Cells. *Analytical Chemistry*, 87(24), 12032-12039. doi: 10.1021/acs.analchem.5b02087
- Hood, S. K., & Zottola, E. A. (1995). Biofilms in food processing. *Food Control*, 6(1), 9-18. doi: [https://doi.org/10.1016/0956-7135\(95\)91449-U](https://doi.org/10.1016/0956-7135(95)91449-U)
- Humayoun, S. B., Hiott, L. M., Gupta, S. K., Barrett, J. B., Woodley, T. A., Johnston, J. J., *et al.* (2018). An assay for determining the susceptibility of *Salmonella* isolates to commercial and household biocides. *PLoS One*, 13(12), e0209072-e0209072. doi: 10.1371/journal.pone.0209072
- Hurley, D., McCusker, M., Fanning, S., & Martins, M. (2014). *Salmonella*–Host Interactions – Modulation of the Host Innate Immune System. *Frontiers in immunology*, 5, 481. doi: 10.3389/fimmu.2014.00481
- Inatsu, Y., Bari, L., Kawasaki, S., Isshiki, K., & Kawamoto, S. (2005). Efficacy of Acidified Sodium Chlorite Treatments in Reducing *Escherichia coli* O157:H7 on Chinese Cabbage. *J Food Prot*, 68, 251-255. doi: 10.4315/0362-028x-68.2.251
- ISO. (2017). ISO 6579-1:2017. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. Geneva, Switzerland: *International Organization for Standardization*.
- Jamal, M., Ahmad, W., Andleeb, S., Jalil, F., Imran, M., Nawaz, M. A., *et al.* (2018). Bacterial biofilm and associated infections. *Journal of the Chinese Medical Association*, 81(1), 7-11. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jcma.2017.07.012>
- Jay, J. (2000). Foodborne Gastroenteritis Caused by *Salmonella* and *Shigella* (pp. 511-530).
- Jay, J. M., Loessner, M. J., & Golden, D. A. (2008). *Modern Food Microbiology*. Springer Science & Business Media
- Juneja, V. K., Marks, H. M., & Huang, L. (2003). Growth and Heat Resistance Kinetic Variation Among Various Isolates of *Salmonella* and its Application to Risk Assessment. *Risk Analysis*, 23(1), 199-213. doi: 10.1111/1539-6924.00300
- Kadam, S. R., den Besten, H. M. W., van der Veen, S., Zwietering, M. H., Moezelaar, R., & Abee, T. (2013). Diversity assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation: Impact of growth condition, serotype and strain origin. *Int J Food Microbiol*, 165(3), 259-264. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.05.025>
- Kampf, G. (2018). Adaptive microbial response to low-level benzalkonium chloride exposure. *Journal of Hospital Infection*, 100(3), e1-e22. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2018.05.019>
- Kang, J.-H., Park, J.-B., & Song, K. B. (2019). Inhibitory activities of quaternary ammonium surfactants against *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, and *Listeria monocytogenes* inoculated on spinach leaves. *LWT*, 102, 284-290. doi: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.12.046>

- Karam, L., Jama, C., Dhulster, P., & Chihib, n. e. (2013). Study of surface interactions between peptides, materials and bacteria for setting up antimicrobial surfaces and active food packaging. *Journal of Materials and Environmental Science*, 4, 798-821.
- Kaur, J., & Jain, S. (2012). Vi antigen of Salmonella enterica serovar Typhi — biosynthesis, regulation and its use as vaccine candidate *Open Life Sciences* (Vol. 7, pp. 825).
- Kim, S., Frye, J. G., Hu, J., Fedorka-Cray, P. J., Gautom, R., & Boyle, D. S. (2006). Multiplex PCR-based method for identification of common clinical serotypes of Salmonella enterica subsp. enterica. *Journal of clinical microbiology*, 44(10), 3608-3615. doi: 10.1128/jcm.00701-06
- Kim, S. H., & Wei, C. I. (2009). Molecular characterization of biofilm formation and attachment of Salmonella enterica serovar typhimurium DT104 on food contact surfaces. *J Food Prot*, 72(9), 1841-1847. doi: 10.4315/0362-028x-72.9.1841
- Koutsoumanis, K., & Sofos, J. (2004). Comparative acid stress response of Listeria monocytogenes, Escherichia coli O157:H7 and Salmonella Typhimurium after habituation at different pH conditions. *Letters in applied microbiology*, 38, 321-326. doi: 10.1111/j.1472-765X.2004.01491.x
- Kuchma, S. L., & O'Toole, G. A. (2000). Surface-induced and biofilm-induced changes in gene expression. *Current Opinion in Biotechnology*, 11(5), 429-433. doi: [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(00\)00123-3](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(00)00123-3)
- Kumar, C. G., & Anand, S. K. (1998). Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *Int J Food Microbiol*, 42(1), 9-27. doi: [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(98\)00060-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(98)00060-9)
- Lee, K.-M., Runyon, M., Herrman, T. J., Phillips, R., & Hsieh, J. (2015). Review of Salmonella detection and identification methods: Aspects of rapid emergency response and food safety. *Food Control*, 47, 264-276. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.07.011>
- Lehmacher, A., Bockemühl, J., & Aleksic, S. (1995). Nationwide outbreak of human salmonellosis in Germany due to contaminated paprika and paprika-powdered potato chips. *Epidemiology and infection*, 115(3), 501-511. doi: 10.1017/s0950268800058660
- Leistner, L. (2000). Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *Int J Food Microbiol*, 55(1), 181-186. doi: [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00161-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00161-6)
- Leite, B., Werle, C. H., Carmo, C. P. d., Nóbrega, D. B., Milanez, G. P., Culler, H. F., et al. (2017). Integration host factor is important for biofilm formation by Salmonella enterica Enteritidis. *Pathog Dis*, 75(6). doi: 10.1093/femspd/ftx074
- Leriche, V., Sibille, P., & Carpentier, B. (2000). Use of an Enzyme-Linked Lectinsorbent Assay To Monitor the Shift in Polysaccharide Composition in Bacterial Biofilms. *Appl Environ Microbiol*, 66, 1851-1856. doi: 10.1128/aem.66.5.1851-1856.2000
- Lianou, A., & Koutsoumanis, K. P. (2011). Effect of the growth environment on the strain variability of Salmonella enterica kinetic behavior. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Food Microbiol*, 28(4), 828-837. doi: 10.1016/j.fm.2010.04.006
- Lianou, A., & Koutsoumanis, K. P. (2013). Strain variability of the behavior of foodborne bacterial pathogens: A review. *International Journal of Food Microbiology*, 167(3), 310-321. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.09.016>
- Liu, B., Knirel, Y., Feng, L., Perepelov, A., Senchenkova, S. y., Reeves, P., et al. (2013). Structural diversity in Salmonella O antigens and its genetic basis. *FEMS Microbiol Rev*, 38. doi: 10.1111/1574-6976.12034
- Long, M., Lai, H., Deng, W., Zhou, K., Li, B., Liu, S., et al. (2016). Disinfectant susceptibility of different Salmonella serotypes isolated from chicken and egg production chains. *Journal of Applied Microbiology*, 121. doi: 10.1111/jam.13184

- Loo, C.-Y., Young, P. M., Lee, W.-H., Cavaliere, R., Whitchurch, C. B., & Rohanizadeh, R. (2012). Superhydrophobic, nanotextured polyvinyl chloride films for delaying *Pseudomonas aeruginosa* attachment to intubation tubes and medical plastics. *Acta Biomaterialia*, 8(5), 1881-1890. doi: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.01.015>
- Lund, P., Tramonti, A., & De Biase, D. (2014). Coping with low pH: molecular strategies in neutralophilic bacteria. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *FEMS Microbiol Rev*, 38(6), 1091-1125. doi: 10.1111/1574-6976.12076
- Manios, S. G., Grivokostopoulos, N. C., Bikouli, V. C., Doultos, D. A., Zilelidou, E. A., Gialitaki, M. A., *et al.* (2015). A 3-year hygiene and safety monitoring of a meat processing plant which uses raw materials of global origin. *Int J Food Microbiol*, 209, 60-69. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.12.028>
- Marangoni, F., Corsello, G., Cricelli, C., Ferrara, N., Ghiselli, A., Lucchin, L., *et al.* (2015). Role of poultry meat in a balanced diet aimed at maintaining health and wellbeing: an Italian consensus document. *Food Nutr Res*, 59, 27606. doi: 10.3402/fnr.v59.27606
- Marin, C., Hernandez, A., & Lainez, M. (2009). Biofilm development capacity of *Salmonella* strains isolated in poultry risk factors and their resistance against disinfectants. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Poult Sci*, 88(2), 424-431. doi: 10.3382/ps.2008-00241
- Mataragas, M., Skandamis, P. N., & Drosinos, E. H. (2008). Risk profiles of pork and poultry meat and risk ratings of various pathogen/product combinations. *Int J Food Microbiol*, 126(1), 1-12. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.05.014>
- McDonnell, G., & Russell, A. D. (1999). Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clinical microbiology reviews*, 12(1), 147-179.
- McKellar, R. C., & Lu, X. (2003). Primary models (pp. 21-62).
- McQuiston, R. J., Waters, R. J., Dinsmore, A. B., Mikoleit, L. M., & Fields, I. P. (2011). Molecular determination of H antigens of *Salmonella* by use of a microsphere-based liquid array. *Journal of clinical microbiology*, 49(2), 565-573. doi: 10.1128/jcm.01323-10
- Meireles, A., Giaouris, E., & Simões, M. (2016). Alternative disinfection methods to chlorine for use in the fresh-cut industry. *Food Research International*, 82, 71-85. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.01.021>
- Merino, L., Procura, F., Trejo, F. M., Bueno, D. J., & Golowczyc, M. A. (2019). Biofilm formation by *Salmonella* sp. in the poultry industry: Detection, control and eradication strategies. *Food Research International*, 119, 530-540. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.11.024>
- Moat, A. G., Foster, J. W., & Spector, M. P. (2002). Microbial stress responses *Microbial Physiology* (Fourth Edition ed., pp. 582-609).
- Muhsin, Ö., Gudrun, H., & Rolf, R. (2019). *Salmonella enterica* Subspecies *enterica* Serovar Typhimurium (*Salmonella*), colony. Scanning electron microscopy., from https://www.rki.de/EN/Content/infections/Diagnostics/NatRefCentresConsultantLab/CONSULAB/EM-images/EM_Tab_Salmonellose_en.html
- NACMCF. (2005). Con-siderations for establishing safety-based consume-by date labels for refrigeratedready-to-eat foods. *J. Food Prot.*, 68 1761-1775.
- Nychas, G.-J., & Skandamis, P. (2005). Fresh meat spoilage and modified atmosphere packaging (MAP) (pp. 461-502).
- Nychas, G.-J. E., Skandamis, P. N., Tassou, C. C., & Koutsoumanis, K. P. (2008). Meat spoilage during distribution. *Meat science*, 78(1-2), 77-89.
- Nychas, G. J., Marshall, D., & Sofos, J. (2007). *Meat, Poultry, and Seafood*: in Doyle M, Beuchat L (ed), *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, Third Edition. ASM Press, Washington, DC.

- Nychas, G. J., Skandamis, P. N., Tassou, C. C., & Koutsoumanis, K. P. (2008). Meat spoilage during distribution. *Meat Science*, 78(1-2), 77-89. doi: 10.1016/j.meatsci.2007.06.020
- Oxoid. (2019a). Tryptone Soya Agar. *CM0131*, from http://www.oxoid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0131&c=UK&lang=EN
- Oxoid. (2019b). Tryptone Soya Broth. *CM0129*, from http://www.oxoid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0129
- Oxoid. (2019c). X.L.D Agar. *CM0469*, from http://www.oxoid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0469&c=UK&lang=EN
- Percival, S. L., & Williams, D. W. (2014). Salmonella. *Microbiology of Waterborne Diseases*, 209-222.
- Pereira, P. M., & Vicente, A. F. (2013). Meat nutritional composition and nutritive role in the human diet. *Meat Science*, 93, 586-592. doi: 10.1016/j.meatsci.2012.09.018
- Ross, T., & Dalgaard, P. (2004). Secondary models. *Modeling microbial response in food*, 63-150.
- Rossmannith, P., Krassnig, M., Wagner, M., & Hein, I. (2006). Detection of *Listeria monocytogenes* in food using a combined enrichment/real-time PCR method targeting the *prfA* gene. *Research in Microbiology*, 157(8), 763-771. doi: <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2006.03.003>
- Rosso, L., Lobry, J. R., Bajard, S., & Flandrois, J. P. (1995). Convenient Model To Describe the Combined Effects of Temperature and pH on Microbial Growth. *Appl Environ Microbiol*, 61(2), 610-616.
- Rosso, L., Lobry, J. R., & Flandrois, J. P. (1993). An Unexpected Correlation between Cardinal Temperatures of Microbial Growth Highlighted by a New Model. *Journal of Theoretical Biology*, 162(4), 447-463. doi: <https://doi.org/10.1006/jtbi.1993.1099>
- Rowe, R. C., Sheskey, P. J., Owen, S. C., & Association., A. P. (2006). *Handbook of pharmaceutical excipients*. London: Pharmaceutical Press. .
- Ryan, M. P., Dwyer, J., & Adley, C. C. (2017). Evaluation of the Complex Nomenclature of the Clinically and Veterinary Significant Pathogen *Salmonella*. *BioMed Research International*, 2017, 6. doi: 10.1155/2017/3782182
- Sansebastiano, G., Zoni, R., & Bigliardi, L. (2007). Cleaning and Disinfection Procedures in the Food Industry General Aspects and Practical Applications (pp. 253-280).
- Shi, C., Li, M., Ishfaq, M., Ma, X., Chang, Y., Li, R., *et al.* (2018). Combination of berberine and ciprofloxacin reduces multi-resistant *Salmonella* strain biofilm formation by depressing mRNA expressions of *luxS*, *rpoE*, and *ompR*. *Journal of veterinary science*, 19. doi: 10.4142/jvs.2018.19.6.808
- Sinde, E., & Carballo, J. (2000). Attachment of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluorethylene: the influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. *Food Microbiol*, 17(4), 439-447. doi: <https://doi.org/10.1006/fmic.2000.0339>
- Srey, S., Jahid, I. K., & Ha, S.-D. (2013). Biofilm formation in food industries: A food safety concern. *Food Control*, 31(2), 572-585. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.12.001>
- Sutherland, I. (2001). Sutherland IW.. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology 147: 3-9. Microbiology (Reading, England)*, 147, 3-9. doi: 10.1099/00221287-147-1-3
- Swinnen, I. A. M., Bernaerts, K., Dens, E. J. J., Geeraerd, A. H., & Van Impe, J. F. (2004). Predictive modelling of the microbial lag phase: a review. *Int J Food Microbiol*, 94(2), 137-159. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.01.006>

- Tamburro, M., Ripabelli, G., Vitullo, M., Dallman, T. J., Pontello, M., Amar, C. F. L., *et al.* (2015). Gene expression in *Listeria monocytogenes* exposed to sublethal concentration of benzalkonium chloride. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 40, 31-39. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2015.03.004>
- Tezel, B. U., Akçelik, N., Yüksel, F. N., Karatuğ, N. T., & Akçelik, M. (2016). Effects of sub-MIC antibiotic concentrations on biofilm production of *Salmonella* Infantis. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 30(6), 1184-1191. doi: 10.1080/13102818.2016.1224981
- Tindall, B., Grimont, P., Garrity, G., & Euzéby, J. (2005). Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 55, 521-524. doi: 10.1099/ijs.0.63580-0
- Tompkin, R. B. (1994). HACCP in the meat and poultry industry. *Food Control*, 5(3), 153-161. doi: [https://doi.org/10.1016/0956-7135\(94\)90075-2](https://doi.org/10.1016/0956-7135(94)90075-2)
- Tsola, E., Drosinos, E. H., & Zoiopoulos, P. (2008). Impact of poultry slaughter house modernisation and updating of food safety management systems on the microbiological quality and safety of products. *Food Control*, 19(4), 423-431. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2007.05.003>
- USDA. (1996). Meat and Poultry Products Hazards and Control Guide. <http://haccpalliance.org/alliance/haccpmodels/hzrdcontrolguid.pdf>.
- Vaidyanathan, S., & Goodacre, R. (2005). 1 - Understanding the behaviour of pathogenic cells: proteome and metabolome analyses. In M. Griffiths (Ed.), *Understanding Pathogen Behaviour* (pp. 3-52): Woodhead Publishing.
- Velge, P., Wiedemann, A., Rosselin, M., Abed, N., Boumart, Z., Chaussé, A. M., *et al.* (2012). Multiplicity of *Salmonella* entry mechanisms, a new paradigm for *Salmonella* pathogenesis. *MicrobiologyOpen*, 1(3), 243-258. doi: 10.1002/mbo3.28
- Verran, J., & Whitehead, K. (2005). Factors Affecting Microbial Adhesion to Stainless Steel and Other Materials Used in Medical Devices. *The International journal of artificial organs*, 28, 1138-1145. doi: 10.1177/039139880502801111
- Wain, J., House, D., Zafar, A., Baker, S., Nair, S., Kidgell, C., *et al.* (2005). Vi antigen expression in *Salmonella enterica* serovar Typhi clinical isolates from Pakistan. *Journal of clinical microbiology*, 43(3), 1158-1165. doi: 10.1128/jcm.43.3.1158-1165.2005
- Whiting, R. C., & Golden, M. H. (2002). Variation among *Escherichia coli* O157:H7 strains relative to their growth, survival, thermal inactivation, and toxin production in broth. *Int J Food Microbiol*, 75(1), 127-133. doi: [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00003-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00003-X)
- Wiedemann, A., Virlogeux-Payant, I., Chaussé, A.-M., Schikora, A., & Velge, P. (2015). Interactions of *Salmonella* with animals and plants. [Review]. *Frontiers in Microbiology*, 5(791). doi: 10.3389/fmicb.2014.00791
- Wiedmann, M. (2002). Molecular subtyping methods for *Listeria monocytogenes*. *Journal of AOAC International*, 85, 524-531.
- wiki. (2019). Possible-routes-of-salmonella-spp-transmission-from-wild-birds-to-humans, from https://wiki.ubc.ca/File:Possible-routes-of-salmonella-spp-transmission-from-wild-birds-to-humans_50412.jpg
- Wirtanen, G., & Salo, S. (2003). Disinfection in Food Processing – Efficacy Testing of Disinfectants. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 2, 293-306. doi: 10.1023/b:resb.0000040471.15700.03
- Wong, D. M. A., Hald, T., Van der Wolf, P., & Swanenburg, M. (2002). Epidemiology and control measures for *Salmonella* in pigs and pork. *Livestock Production Science*, 76, 215-222. doi: 10.1016/s0301-6226(02)00121-5

- Wu, V. C. H. (2008). A review of microbial injury and recovery methods in food. *Food Microbiol*, 25(6), 735-744. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2008.04.011>
- Yang, B., Qu, D., Zhang, X., Shen, J., Cui, S., Shi, Y., *et al.* (2010). Prevalence and characterization of Salmonella serovars in retail meats of marketplace in Shaanxi, China. *Int J Food Microbiol*, 141(1), 63-72. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.04.015>
- Yousef, A. E., & Juneja, V. K. (2002). *Microbial stress adaptation and food safety*. CRC Press.
- Zhao, X., Gao, Y., Ye, C., Yang, L., Wang, T., & Chang, W. (2016). Prevalence and Characteristics of Salmonella Isolated from Free-Range Chickens in Shandong Province, China. *BioMed research international*, 2016, 8183931-8183931. doi: 10.1155/2016/8183931
- Αρβανιτογιάννης, Ι. Σ., Σάνδρου, Δ., & Κούρτης, Λ. (2001). *Ασφάλεια τροφίμων. Εφαρμογή της ανάλυσης επικινδυνότητας και κρίσιμων σημείων ελέγχου (HACCP) στις βιομηχανίες τροφίμων και ποτών*. University Studio Press.
- ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΚ) Αριθ. 853/2004 ΤΟΥ ΕΥΡΩΠΑΪΚΟΥ ΚΟΙΝΟΒΟΥΛΙΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟΥ για τον καθορισμό ειδικών κανόνων υγιεινής για τα τρόφιμα ζωικής προέλευσης 853/2004 C.F.R. § L 139/55 (/2004).